

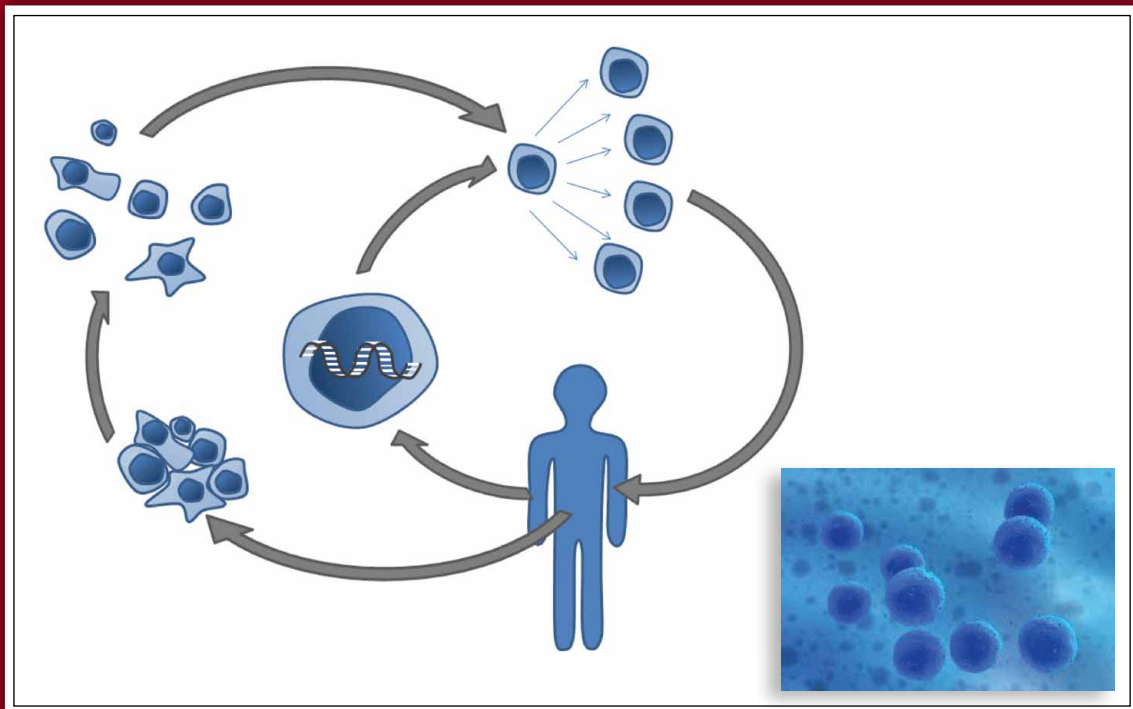
# Αίμα

## ΗΑΕΜΑ

ISSN: 1792-7110

Διευθυντής Σύνταξης:  
Καθηγητής Φώτης Ν. Μπερής

Συνεκδότες: Καθηγήτρια Ελένη Α. Παπαδάκη, Καθηγητής Κωνσταντίνος Τσαταλάς  
Αναπληρωτής Εκδότης: Επίκουρος Καθηγητής Θεόδωρος Π. Βασιλακόπουλος



### Κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία

Ευαγγελία Γιαννάκη, Γεώργιος Βασιλόπουλος  
*Guest Editors*

# Vidaza<sup>®</sup> στην Οξεία Μυελογενή Λευχαιμία (AML) με > 30% μυελοβλάστες<sup>1</sup>

VID-AML-KTX / 3-2016



- ✔ >10 μήνες ολικής επιβίωσης<sup>2</sup>
- ✔ Καλό προφίλ ανοχής και ασφάλειας<sup>2</sup>
- ✔ Πλεονέκτημα επιβίωσης ακόμα και επί απουσίας CR<sup>2</sup>
- ✔ Χωρίς να επιβαρύνεται η Ποιότητα Ζωής<sup>2</sup>

Περαιτέρω πληροφορίες διατίθενται από τη Γένεσις Φάρμα Α.Ε.  
Για συνταγογραφικές πληροφορίες ανατρέξτε στη σελίδα 123

1. Περίληψη των Χαρακτηριστικών του Προϊόντος  
2. Dombret H, et al. Blood 2015;126:291-9

CR: Complete remission

# Discover how far therapy can go

**imbruvica**<sup>®</sup>  
(ibrutinib) capsules

## CLL

Υποτροπιάζουσα/ανθεκτική ή υψηλού κινδύνου χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία

Το IMBRUVICA<sup>®</sup> ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), οι οποίοι έχουν λάβει τουλάχιστον μία προηγούμενη θεραπεία, ή ως πρώτης γραμμής θεραπεία επί παρουσίας εξάλειψης του 17p ή μετάλλαξης στο TP53 σε ασθενείς οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για χημειο-ανοσοθεραπεία.<sup>1</sup>

**84% ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΧΩΡΙΣ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ (PFS)**

στους 12 μήνες έναντι 19% με την οφρατουμουμάμπη<sup>2†</sup>

**85% ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ (OS)**

στους 18 μήνες έναντι 78% με την οφρατουμουμάμπη<sup>2†,‡</sup>

## MCL

Υποτροπιάζον/ανθεκτικό λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα

Το IMBRUVICA<sup>®</sup> ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα (ΛΚΜ).<sup>1</sup>

**13 ΜΗΝΕΣ ΔΙΑΜΕΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΧΩΡΙΣ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ (PFS)<sup>3\*</sup>**

**22,5 ΜΗΝΕΣ ΔΙΑΜΕΣΗ ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ (OS)<sup>3\*</sup>**

## WM

Μακροσφαιριναίμια του Waldenström

Το IMBRUVICA<sup>®</sup> ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με μακροσφαιριναίμια του Waldenström (WM), οι οποίοι έχουν λάβει τουλάχιστον μία προηγούμενη θεραπεία, ή ως πρώτης γραμμής θεραπεία για ασθενείς οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για χημειο-ανοσοθεραπεία.<sup>1</sup>

**69% ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΧΩΡΙΣ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ (PFS)<sup>4†</sup>**

**95% ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗ (OS)<sup>4†</sup>**

<sup>1</sup> RESONATE: Συγκριτική μελέτη του IMBRUVICA έναντι της οφρατουμουμάμπης σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα/ανθεκτική CLL/SLL (N=391).

<sup>2</sup> 61% των ασθενών στην ομάδα της οφρατουμουμάμπης πέρασαν σε θεραπεία με IMBRUVICA.

<sup>3</sup> Διάμεση παρακολούθηση 26,7 μηνών.

<sup>4</sup> Στα 2 έτη.

Η Περίληψη των Χαρακτηριστικών του Προϊόντος βρίσκεται σε επόμενη σελίδα.

Βοηθήστε να γίνουν τα φάρμακα πιο ασφαλή και  
Αναφέρετε  
ΟΛΕΣ τις ανεπιθύμητες ενέργειες για  
ΟΛΑ τα φάρμακα  
Συμπληρώνοντας την «ΚΙΤΡΙΝΗ ΚΑΡΤΑ»

**Βιβλιογραφία:** 1. IMBRUVICA<sup>®</sup> Περίληψη των Χαρακτηριστικών του Προϊόντος, 2. Brown JR, et al. Updated efficacy including genetic and clinical subgroup analysis and overall safety in the phase 3 RESONATE<sup>™</sup> trial of ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. Abstract presented at the 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology; 6-9 December 2014; San Francisco, CA, USA. 3. Wang M, et al. Single-agent ibrutinib demonstrates safety and durability of response at 2 years follow-up in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: updated results of an international, multicenter, open-label phase 2 study. Abstract presented at the 56th Annual Meeting of the American Society of Hematology; 6-9 December 2014; San Francisco, CA, USA. 4. Treon SP, et al. Ibrutinib in previously treated patients with Waldenström's Macroglobulinemia. N Eng J Med 2015;372(15):1430-1440.

# DACOGEN®

ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

▼ Το φάρμακο αυτό τελεί υπό συμπληρωματική παρακολούθηση. Αυτό θα επιτρέψει τον ταχύ προσδιορισμό νέων πληροφοριών ασφάλειας. Ζητείται από τους επαγγελματίες του τομέα της υγειονομικής περίθαλψης να αναφέρουν οποιοσδήποτε πιθανολογούμενος ανεπιθύμητος ενέργειες. Βλ. παράγραφο 4.8 για τον τρόπο αναφοράς ανεπιθύμητων ενεργειών.

**ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ:** Dacogen 50 mg κόνις για πυκνό σκεύασμα για παρασκευή διαλύματος προς έγχυση. **ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ:** Κάθε φιαλίδιο κόνεως περιέχει 50 mg δεσπαβίνης. Μετά από ανασύσταση με 10 ml ύδατος για ενέσιμα, κάθε ml πυκνού σκευάσματος περιέχει 5 mg δεσπαβίνης. Έκδοχα με γνωστή δράση: Κάθε φιαλίδιο περιέχει 0,5 mmol καλίου (E340) και 0,29 mmol νατρίου (E524). Για τον πλήρη κατάλογο των εκδόχων, βλ. παράγραφο 6.1. **ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ:** Κόνις για πυκνό σκεύασμα για παρασκευή διαλύματος προς έγχυση (κόνις για διάλυμα προς έγχυση). Λευκή έως υπόλευκη λυοφιλοποιημένη κόνις. **ΚΑΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΑΔΕΙΑΣ**

**ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ:** Janssen-Cilag International NV, Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse, Βέλγιο. **ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ:** EU/1/12/792/001. **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ:** 27 Μαρτίου 2015. Λεπτομερή πληροφοριακά στοιχεία για το παρόν φαρμακευτικό προϊόν είναι διαθέσιμα στον δικτυακό τόπο του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων: <http://www.ema.europa.eu>. **ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ:** Με περιορισμένη ιατρική συνταγή. Μόνο για Νοσοκομειακή χρήση.

## ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ/ΤΙΜΗ

Περιεκτικότητα	Μέγεθος συσκευασίας	Νοσοκομειακή Τιμή	Λιανική Τιμή
50 mg/Vial	BT x 1 Vial x 20ML	1.013,62€	1.254,79€

Για περισσότερες πληροφορίες παρακαλούμε επικοινωνήστε με την εταιρεία Janssen-Cilag Φαρμακευτική Α.Ε.Β.Ε., Λ. Ειρήνης 56, 151 21 Πεύκη, τηλ. 210 80.90.000.

Η πλήρης Περιλήψη των Χαρακτηριστικών του Προϊόντος διατίθεται από την Janssen-Cilag.

## JANSSEN-CILAG ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ Α.Ε.Β.Ε.

Λεωφόρος Ειρήνης 56, 151 21, Πεύκη, Αθήνα, Τηλ.: 210 8090000  
[www.janssen.com.gr](http://www.janssen.com.gr)

Βοηθήστε να γίνουν τα φάρμακα πιο ασφαλή και  
Αναφέρετε  
ΟΛΕΣ τις ανεπιθύμητες ενέργειες για  
ΟΛΑ τα φάρμακα  
Συμπληρώνοντας την «ΚΙΤΡΙΝΗ ΚΑΡΤΑ»

**janssen**  
PHARMACEUTICAL COMPANIES  
of **Johnson & Johnson**

# No Compromise

Βέλτιστη επιλογή στη θεραπεία 1ης γραμμής στο ΠΜ\*



\*VMP έναντι MP (μελέτη VISTA)<sup>1,2</sup>

**Βιβλιογραφία:** 1. San Miguel JF, et al. J Clin Oncol. 2013;31:448-55.  
2. Mateos MV, et al. J Clin Oncol. 2010;28:2259-66.

Η πλήρης Περίληψη των Χαρακτηριστικών του Προϊόντος διατίθεται από την Janssen-Cilag.

**JANSSEN-CILAG ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ Α.Ε.Β.Ε.**  
Λεωφόρος Ειρήνης 56, 151 21, Πεύκη, Αθήνα, Τηλ.: 210 8090000  
[www.janssen.com.gr](http://www.janssen.com.gr)

Βοηθήστε να γίνουν τα φάρμακα πιο ασφαλή και  
Αναφέρετε  
ΟΛΕΣ τις ανεπιθύμητες ενέργειες για  
ΟΛΑ τα φάρμακα  
Συμπληρώνοντας την «ΚΙΤΡΙΝΗ ΚΑΡΤΑ»

**VELCADE®**  
(bortezomib)

**janssen**  
PHARMACEUTICAL COMPANIES  
OF **Johnson & Johnson**



ΣΤΗ ΝΟΣΟ GAUCHER

**ΔΥΝΑΜΙΚΗ  
ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ  
ΜΕΧΡΙ ΚΑΙ  
ΤΑ ΟΣΤΑ<sup>1-5</sup>**

Βιβλιογραφικές αναφορές:

1. Mistry PK, et al. Br J Haematol. 2009;147(4):561-570. 2. Sims KB, et al. Clin Genet. 2008;73(5):430-440.
3. Wenstrup RJ, et al. J Bone Miner Res. 2007;22(1):119-126. 4. Charrow J, et al. Clin Genet. 2007;71(3):205-211.
5. Cerezyme EU SmPC 10/2010.

Η Περίληψη Χαρακτηριστικών του Προϊόντος περιλαμβάνεται  
στις παρακάτω σελίδες του εντύπου

Βοηθήστε να γίνουν τα φάρμακα πιο ασφαλή και  
Αναφέρετε  
ΟΛΕΣ τις ανεπιθύμητες ενέργειες για  
ΟΛΑ τα φάρμακα  
Συμπληρώνοντας την "ΚΙΤΡΙΝΗ ΚΑΡΤΑ"

SANOFI GENZYME 

Λ. Συγγρού 348 - Κτίριο Α, 17674, Καλλιθέα,  
Τηλ.: 210-9001830/888, Fax 210-9944062, [www.sanofi.com](http://www.sanofi.com)

The Journal  
of the Hellenic Society of  
HEMATOLOGY

*Αίμα*  
HÆMA

Περιοδική Έκδοση της  
Ελληνικής ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ  
Εταιρείας

HELLENIC SOCIETY OF HAEMATOLOGY



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ

**BOARD OF THE HELLENIC  
SOCIETY OF HAEMATOLOGY**

**President:** Konstantinos Tsatalas  
**Vice Presidents:** Charis Matsouka  
Ioanna Sakellari  
**General Secretary:** Elisavet Grouzi  
**Executive Secretary:** Ioannis Mpaltadakis  
**Treasurer:** Maria Pagoni  
**Members:** Ioannis Kakkas  
Alexandros Spyridonidis  
Panagiotis Tsaftaridis  
Georgios Vasilopoulos

**EDITOR**

**Photis N. Beris**

Professor of Haematology  
Medical School Geneva University, Switzerland  
Mobile: +41 79 957 5461  
e-mail: photis.beris@unilabs.com

**CO-EDITORS**

**Helen A. Papadaki**

Professor of Haematology  
University of Crete School of Medicine  
Head of Department of Haematology  
University Hospital of Heraklion, Crete  
Tel.: +30 2810 394629  
Fax.: +30 2810 394632  
e-mail: epapadak@med.uoc.gr

**Konstantinos Tsatalas**

Professor of Haematology  
University Haematology Clinic  
University General Hospital of Alexandroupolis  
E-mail: ktsatala@med.duth.gr

**ASSOCIATE EDITOR**

**Theodoros P. Vassilakopoulos**

Assistant Professor  
Haematology Clinic  
National and Kapodistrian University of Athens

**PAST CO-EDITORS**

**Nicolaos C. Zoumbos**

**ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ  
ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ**

**Πρόεδρος:** Κωνσταντίνος Τσαταλάς  
**Αντιπρόεδροι:** Χάρις Ματσούκα  
Ιωάννα Σακελλάρη  
**Γεν. Γραμματέας:** Ελισάβετ Γρουζή  
**Ειδ. Γραμματέας:** Ιωάννης Μπαλταδάκης  
**Ταμίας:** Μαρία Παγώνη  
**Μέλη:** Γεώργιος Βασιλόπουλος  
Ιωάννης Κάκκας  
Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης  
Παναγιώτης Τσαφταρίδης

**ΕΚΔΟΤΗΣ**

**Φώτης Ν. Μπερής**

Καθηγητής Αιματολογίας  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Γενεύης  
Κινητό: +41 79 957 5461  
e-mail: photis.beris@unilabs.com

**ΣΥΝ-ΕΚΔΟΤΕΣ**

**Ελένη Α. Παπαδάκη**

Καθηγήτρια Αιματολογίας  
Επικεφαλής Αιματολογικού Τμήματος  
Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης  
Τηλ.: 2810 394629  
Fax.: 2810 394632  
e-mail: epapadak@med.uoc.gr

**Κωνσταντίνος Τσαταλάς**

Καθηγητής Αιματολογίας  
Πανεπιστημιακή Αιματολογική Κλινική  
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Αλεξανδρούπολης  
E-mail: ktsatala@med.duth.gr

**ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΕΚΔΟΤΗΣ**

**Θεόδωρος Π. Βασιλακόπουλος**

Επίκουρος Καθηγητής  
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών  
Αιματολογική Κλινική, ΓΝΑ Λαϊκό

**ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΟΙ ΣΥΝ-ΕΚΔΟΤΕΣ**

**Νικόλαος Κ. Ζούμπος**



SAGRPLE 16.02.0132

Πριν τη συνταγογράφηση συμβουλευτείτε την ΠΧΠ που διατίθεται στην ιστοσελίδα του EMA: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)

**SANOFI GENZYME** 

Sanofi-aventis A.E.B.E. Λεωφ. Συγγρού 348, Κτήριο Α', 176 74 Καλλιθέα  
Τηλ.: 210 90 01 600, Fax: 210 92 49 088 [www.sanofi.gr](http://www.sanofi.gr)

 **MOZOBI<sup>®</sup>**  
(plerixafor injection)



# Πρόλογος

---

*Αγαπητοί Συνάδελφοι,*

*Η τεχνολογία της μεταφοράς και προσθήκης γονιδίων στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού, έχει εξελιχθεί σημαντικά τα τελευταία 30 χρόνια. Η πρόοδος ήλθε σαν επιστέγασμα των προσπαθειών και της επιμονής των ερευνητών που πίστεψαν στις δυνατότητες της βιοτεχνολογίας. Η γονιδιακή μεταφορά είναι αφοπλιστικά απλή στη σύλληψή της, αλλά ο «διάβολος» κρύβεται στις λεπτομέρειες. Και ήταν συχνά μια απογοήτευση όταν οι προσδοκίες δεν επαληθεύονταν και νέα προβλήματα ανέκυπταν. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα, το πεδίο της γονιδιακής θεραπείας να περάσει από δύσκολες ατραπούς και να δεχθεί έντονη κριτική. Πολλά όμως από αυτά τα προβλήματα αντιμετωπίστηκαν και η κατάσταση πλέον αλλάζει. Υπάρχουν ήδη δυο εν εξελίξει κλινικές δοκιμές για τη γονιδιακή θεραπεία της β-Μεσογειακής Αναιμίας με ενθαρρυντικά αποτελέσματα ενώ με την ίδια τεχνολογία έχουν θεραπευτεί περισσότεροι από 50 ασθενείς με ανοσοανεπάρκειες. Στο πεδίο των αιματολογικών κακοηθειών και της μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων, η κυτταρική θεραπεία ή ο συνδυασμός γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας, προσφέρουν αποτελεσματικές εναλλακτικές θεραπευτικές προσεγγίσεις με τη χρήση T-λεμφοκυττάρων που φέρουν χιμαιρικούς αντιγονικούς υποδοχείς ή γονίδια αυτοκτονίας ή κατέχουν ειδικότητα έναντι ιών.*

*Το πεδίο της γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας βρίσκεται σε άνθηση και αναμένονται εξελίξεις που θα υλοποιήσουν «σενάρια επιστημονικής φαντασίας» όπως η γενετική επιδιόρθωση *in situ*. Στο τεύχος αυτό, καλέσαμε ερευνητές που δραστηριοποιούνται στο πεδίο της γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας, να αποτυπώσουν την τρέχουσα τεχνογνωσία και τις μελλοντικές δράσεις που θα δούμε να υλοποιούνται. Για τη συνεισφορά τους, θέλουμε να τους ευχαριστήσουμε. Φιλοδοξία μας ήταν να καταχωρηθεί και στην ελληνική βιβλιογραφία μια βέλτιστη ανασκόπηση του πεδίου σε ένα τεύχος αναφοράς. Έχουμε την πεποίθηση ότι τα καταφέραμε.*

**Ευαγγελία Γιαννάκη**  
Προσκεκλημένη Εκδότρια

**Γεώργιος Βασιλόπουλος**  
Προσκεκλημένος Εκδότης

## CELL AND GENE THERAPY

Guest editors: *Evangelia Giannaki, George Vassilakopoulos*

### CONTENTS

Preface .....	vii
<i>Evangelia Giannaki, George Vassilakopoulos</i>	
Introduction	
Hellenic Society of Gene Therapy and Regenerative Medicine .....	1
<i>Achileas Anagnostopoulos</i>	
1. Mesenchymal stromal cells for acute graft versus host disease .....	6
<i>Anastasia Papadopoulou, Ioannis Batsis</i>	
2. Mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine.....	18
<i>Maria G. Roumpelaki, Nikolaos P. Anagnou</i>	
3. Genetic modified, with chimeric antigen receptor, T lymphocytes therapies in hematological malignancies.....	27
<i>Panagiotis Kaloyiannidis</i>	
4. Multi-virus specific T-cells .....	37
<i>Anastasia Karela, Alexandros Spyridonidis</i>	
5. The development of gene therapy.....	45
<i>Evangelia Giannaki, Varnavas Constantinou, George Stamatoyannopoulos</i>	
6. Basic principles of viral gene therapy vectors .....	57
<i>George Vassilopoulos, Emmanouil Simantirakis</i>	
7. Technology of gene transfer: non-viral vectors .....	72
<i>Aristidis Giannakopoulos, Eleana F. Stavrou, Aglaia Athanasiadou</i>	
8. Gene therapy for thalassemia .....	81
<i>Garyfalia Karponi, Evangelia Yannaki</i>	
9. Gene therapy for cancer: Promises or reality? .....	92
<i>Elena K. Siapati, Konstantina Vaitsi, George Vassilopoulos</i>	
10. Gene and cell therapy for beta-thalassemia and sickle cell disease with induced pluripotent stem cells (iPSCs): the next frontier .....	100
<i>Eirini P. Papapetrou</i>	
11. Gene targeting and gene repair .....	111
<i>Eleni Papanicolaou, Nicholas P. Anagnou</i>	

## ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Guest Editors: Ευαγγελία Γιαννάκη, Γεώργιος Βασιλόπουλος

### ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος .....	vii
<i>Ευαγγελία Γιαννάκη, Γεώργιος Βασιλόπουλος</i>	
Εισαγωγή	
Ελληνική Εταιρεία Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής (ΕΕΓΘ-ΑΙ).....	1
<i>Αχιλλεύς Αναγνωστόπουλος</i>	
1. Μεσεγγυματικά στρωματικά κύτταρα για την οξεία νόσο του μοσχεύματος κατά ξενιστή .....	6
<i>Αναστασία Παπαδοπούλου, Ιωάννης Μπάτσης</i>	
2. Ο ρόλος των μεσεγγυματικών στρωματικών κυττάρων στην αναγεννητική ιατρική .....	18
<i>Μαρία Γ. Ρουμπελάκη, Νικόλαος Π. Ανάγνου</i>	
3. Γενετικά τροποποιημένα, με χιμαιρικούς αντιγονικούς υποδοχείς, T-λεμφοκύτταρα στην αντιμετώπιση αιματολογικών κακοθηριών .....	27
<i>Παναγιώτης Καλογιαννίδης</i>	
4. T - λεμφοκύτταρα με ειδικότητα έναντι πολλών ιών.....	37
<i>Αναστασία Καρέλα, Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης</i>	
5. Η εξέλιξη της γονιδιακής θεραπείας .....	45
<i>Ευαγγελία Γιαννάκη, Βαρνάβας Κωνσταντίνου, George Stamatoyannopoulos</i>	
6. Βασικές αρχές των ιικών φορέων της γονιδιακής θεραπείας.....	57
<i>Γιώργος Βασιλόπουλος, Εμμανουήλ Σημαντηράκης</i>	
7. Η τεχνολογία της γονιδιακής μεταφοράς: Μη-ϊικοί φορείς.....	72
<i>Αριστείδης Γιαννακόπουλος, Ελένα Φ. Σταύρου, Αγλαΐα Αθανασιάδου</i>	
8. Γονιδιακή θεραπεία για τη θαλασσαιμία.....	81
<i>Γαρυφαλιά Καρπώνη, Ευαγγελία Γιαννάκη</i>	
9. Γονιδιακή Θεραπεία για τον Καρκίνο: Υποσχέσεις ή πραγματικότητα; .....	92
<i>Έλενα Κ. Σιαπάτη, Κωνσταντίνα Βαΐτση, Γιώργος Βασιλόπουλος</i>	
10. Γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία για τη β-Μεσογειακή Αναιμία και τη Δρεπανοκυτταρική Νόσο με επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs): Οι νέοι ορίζοντες .....	100
<i>Ειρήνη Παπαπέτρου</i>	
11. Γονιδιακή στόχευση και γονιδιακή επιδιόρθωση .....	111
<i>Ελένη Παπανικολάου, Νικόλαος Π. Ανάγνου</i>	

Εικόνα εξωφύλλου: Κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία: τα κύτταρα-στόχος απομονώνονται και στη συνέχεια εκπύσσονται ή τροποποιούνται γενετικά σε καλλιέργεια και εγχύονται στον ασθενή. Στην κυτταρική θεραπεία, προσδίδονται στα κύτταρα πρόσθετες ιδιότητες επιβίωσης ή διαφοροποίησης ή εξειδίκευσης, ενώ κατά τη γονιδιακή θεραπεία, παθολογικά κύτταρα τροποποιούν τον φαινότυπό τους με μεταφορά σε αυτά ενός φυσιολογικού αντιγράφου του πάσχοντος γονιδίου.

## ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΤΕΥΧΗ

### **Έτος 2016**

Ιούνιος

Θέμα

**Αλλογενής Μεταμόσχευση Μυελού των Οστών**

Guest editos

Δημήτρης Καρακάσης, Γιάννης Μπαλταδάκης

Σεπτέμβριος

Θέμα

**Μεταβολισμός σιδήρου και σχετικές διαταραχές**

Guest editos

Φώτης Μπερής, Αντώνης Καττάμης

## Ελληνική Εταιρεία Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής (ΕΕΓΘ-ΑΙ)

Αχιλλεύς Αναγνωστόπουλος

### Αναγκαία η ύπαρξη της ΕΕΓΘ-ΑΙ

Η δημιουργία της νέας εταιρείας είναι γεγονός εν εξελίξει. Η ΕΕΓΘ-ΑΙ έρχεται να καλύψει πραγματικές ανάγκες και να εκφράσει υπαρκτές επιστημονικές δυνάμεις στην χώρα μας. Ερευνητικές ομάδες έχουν ήδη αναπτυχθεί στον ελληνικό χώρο, οι οποίες εντρυφούν σταθερά σε κυτταρικούς και γονιδιακούς χειρισμούς με τελικό σκοπό την θεραπεία παθήσεων ή την αναγέννηση ιστών και οργάνων και την αποκατάσταση κατεστραμμένων λειτουργιών. Η πλειονότητά τους ασχολείται -σε επίπεδο βασικής ή προκλινικής ή κλινικής έρευνας - με τα πεδία της κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας. Μικρότερη είναι η έρευνα στην αναγεννητική ιατρική. Μεθόδους κυτταρικής θεραπείας σε κλινικό επίπεδο χρησιμοποιούν επί μακρόν οι μεταμοσχευτές αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων (εγχύσεις λεμφοκυττάρων, κ.λπ.).

Υπάρχουν ορισμένοι που προπαγανδίζουν την αναγεννητική ιατρική παραπλανητικά και αντιδεοντολογικά για αύξηση των εισοδημάτων τους, εκμεταλλευόμενοι την άγνοια των πολιτών και την αδράνεια των αρμοδίων αρχών και οργάνων. Προέρχονται κυρίως από τον χώρο των ιδιωτικών Τραπεζών Ομφαλιοπλακουντικού Αίματος, ιδιωτικών νοσηλευτηρίων και ιδιωτών ιατρών. Η δραστηριότητά τους αυτή προκαλεί σύγχυση στους σκοπούς και τα μέσα της πολλά υποσχόμενης αναγεννητικής ιατρικής και τη δυσφημεί κάνοντας το έργο των ερευνητών δυσκολότερο.

Οι επιστήμονες που απασχολούνται στους τομείς της γονιδιακής - κυτταρικής θεραπείας και της αναγεννητικής ιατρικής προέρχονται από διαφορετικούς κλάδους και ειδικότητες. Καμία πρωτογενής επιστημονική εταιρεία δεν καλύπτει το σύνολο των δραστηριοτήτων και των επιστημόνων των τομέων αυτών. Επομένως καμία δεν μπορεί να εκφράσει και να προωθήσει τα ιδιαίτερα επιστημονικά τους συμφέροντα στο σύνολό τους. Η Ελληνική Αι-

ματολογική Εταιρεία στην καταστατική τροποποίηση του 2008 πρόσθεσε στους σκοπούς της τη γονιδιακή θεραπεία. Δεν έχει, όμως, τη δυνατότητα να συσπειρώσει το σύνολο του επιστημονικού δυναμικού, επειδή δέχεται ως τακτικά μέλη μόνο Αιματολόγους.

### Ιστορικό Δημιουργίας της ΕΕΓΘ-ΑΙ

Συζητήσεις για την ανάγκη δημιουργίας μιας εταιρείας γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας διεξήχθησαν στο παρελθόν, βασικά μεταξύ αιματολόγων που ασχολούνται με τη γονιδιακή θεραπεία και βιολόγων που συνεργάζονται με αιματολόγους (Γ. Σταματογιαννόπουλος, Α. Αθανασιάδου, Ν. Ανάγνου, Γ. Βασιλόπουλος, Ε. Γιαννάκη και Α. Αναγνωστόπουλος). Δεν προχώρησαν σε στάδιο υλοποίησης.

Το φθινόπωρο του 2013 μετά από συνεννόηση με τους προαναφερθέντες συναδέλφους, ο συγγραφέας του κειμένου ανέλαβε την ευθύνη να διαμορφώσει ένα σχέδιο καταστατικού και να συντονίσει τις διαδικασίες προς την δημιουργία της νέας εταιρείας. Όπερ και εγένετο. Είχε την εμπειρία δημιουργίας καταστατικών και συλλόγων, χειρίστηκε επίσης την τελευταία τροποποίηση του καταστατικού της ΕΑΕ, κατά τη θητεία του ως πρόεδρός της. Το σχέδιο καταστατικού της νέας εταιρείας βασίστηκε σε ιδέες της αμερικανικής εταιρείας γονιδιακής εταιρείας (ASGCT, ιδρυτικός πρόεδρος ο Γ. Σταματογιαννόπουλος), άλλων εταιρειών του εξωτερικού και της Ελληνικής Αιματολογικής Εταιρείας. Η δομή του μοιράζεται πάρα πολλά σημεία με τη δομή του καταστατικού της ΕΑΕ, το οποίο είναι δοκιμασμένο στις ελληνικές συνθήκες. Η βασική διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι στο νέο καταστατικό έχουν εισαχθεί εκσυγχρονιστικά στοιχεία στη διοίκηση και στην εκλογή των οργάνων, με σκοπό να μεγιστοποιηθεί η συμμετοχή και να βελτιωθεί η λειτουργικότητα και η απόδοσή της.

Ευρύς και γόνιμος διάλογος διεξάχθηκε διαδικτυακά με ωριμότητα, στον οποίον συμμετείχαν τα ιδρυτικά μέλη. Εκφράστηκαν ποικίλες απόψεις με επιχειρήματα. Στο τέλος επιτεύχθηκε η σύνθεση των διαφορετικών απόψε-

---

Συντονιστής Διευθυντής Αιματολογικής Κλινικής, ΜΜΑΚ, Μονάδας Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Δημόσιας Τράπεζας Ομφαλιοπλακουντικού Αίματος, Νοσοκομείο Γεώργιος Παπανικολάου, Θεσσαλονίκη

ων και προέκυψε ένα λειτουργικό καταστατικό, εργαλείο προόδου, συνεργασίας και ανάδειξης των ελληνικών επιστημονικών ομάδων και του έργου τους. Η σοφία και η εμπειρία του Γιώργου Σταματογιαννόπουλου βοήθησαν σε βασικές πτυχές του καταστατικού και σε κρίσιμα σημεία της συζήτησης. Γενικά υπήρξε σύμπνοια και ενθουσιασμός σε όλα τα στάδια του διαλόγου. Στα πλαίσια του διαλόγου, αποφασίστηκε να συμπεριληφθεί και η Αναγεννητική Ιατρική. Τα ερευνητικά οχήματα και οι μέθοδοι είναι παρεμφερή με της «κλασσικής» γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας, επιπλέον η χώρα μας είναι ερευνητικά «μικρή», δεν έχει την πολυτέλεια δύο μικρών και αδυνάμων εταιρειών. Η ισχύς εν τη ενώσει. Εκφράστηκε η ανάγκη και η επιθυμία συνεργασίας της μικρής ΕΕΓΘ-ΑΙ με τις μεγάλες συναφείς επιστημονικές εταιρείες για την ευόδωση των κοινών σκοπών.

Η Ιδρυτική Συνέλευση έγινε στο Βόλο στις 29 Ιουνίου 2014. Εκεί εξελισσόταν η ημερίδα του τμήματος Λεμφοπερπλαστικών νόσων της ΕΑΕ. Το σώμα ενέκρινε το καταστατικό και εξέλεξε την προσωρινή διοικούσα επιτροπή ομόφωνα. Το καταστατικό και τα έγγραφα που απαιτούνταν κατατέθηκαν τον Ιούλιο στο πρωτοδικείο Αθήνας.

## Ιδρυτικά Μέλη

### Κατ' αλφαβητική σειρά:

Αθανασιάδου Αγλαΐα  
 Ανάγνου Νικόλαος  
 Αναγνωστόπουλος Αχιλλεύς  
 Αποστολίδης Ιωάννης  
 Βασιλόπουλος Γεώργιος  
 Γιαννάκη Ευαγγελία  
 Γιαννακόπουλος Αριστείδης  
 Γιγάντες Σταύρος  
 Γουσέτης Ευγένιος  
 Γραφάκος Στέλιος  
 Καρακάσης Δημήτριος  
 Κωνσταντίνου Βαρνάβας  
 Μαλλουρή Δέσποινα  
 Μπαλταδάκης Ιωάννης  
 Μπάτσης Ιωάννης  
 Παπαγιαννοπούλου Θάλεια  
 Παπαδοπούλου Αναστασία  
 Παπανικολάου Ελένη  
 Παπαπέτρου Ειρήνη  
 Πουλή Αναστασία  
 Ρουμπελάκη Μαρία  
 Σακελλάρη Ιωάννα  
 Σιαπάτη Έλενα  
 Σμίας Χρήστος  
 Σπυριδωνίδης Αλέξανδρος  
 Σταματογιαννόπουλος Γεώργιος

Σωτηρόπουλος Δαμιανός  
 Σταύρου Ελεάνα  
 Τσαταλάς Κωνσταντίνος  
 Τσιριγώτης Παναγιώτης  
 Χαρχαλάκης Νικόλαος

## Προσωρινή Διοικούσα Επιτροπή

Η ΠΔΕ έχει ως καθήκοντα την κατάθεση στο πρωτοδικείο των απαραίτητων εγγράφων για την έγκριση του καταστατικού και την αναγνώριση της εταιρείας. Μετά τη νομική αναγνώριση της εταιρείας οφείλει να εγγράψει μέλη και να επιβλέψει την εκλογική διαδικασία και την εκλογή ΔΣ. Εκεί λήγει η θητεία της.

### Τα μέλη της κατ' αλφαβητική σειρά είναι:

Αθανασιάδου Αγλαΐα  
 Ανάγνου Νικόλαος  
 Αναγνωστόπουλος Αχιλλεύς  
 Βασιλόπουλος Γεώργιος  
 Γουσέτης Ευγένιος  
 Μπαλταδάκης Ιωάννης  
 Σπυριδωνίδης Αλέξανδρος

## Καταστατικό ΕΕΓΘ-ΑΙ

Το καταστατικό χαρακτηρίζεται από δύο δυνατά στοιχεία που αφορούν την εκλογή οργάνων και τη διοίκηση της εταιρείας. Στις εκλογές, που διεξάγονται αρχικά επιστολικά και αργότερα ηλεκτρονικά διά του διαδικτύου, εκλέγεται σε ξεχωριστό ψηφοδέλτιο από το υπόλοιπο ΔΣ ο Αναπληρωτής Πρόεδρος (President-elect), ο οποίος στην αμέσως επόμενη θητεία καθίσταται Πρόεδρος. Με τη ρύθμιση αυτή ενισχύεται η ομαλή και αδιακύματη λειτουργία του ΔΣ, ο πρόεδρος καθίσταται έμπειρος, γνώστης των θεμάτων και του τρόπου διοίκησης, όταν αναλαμβάνει τα ηνία της εταιρείας. Με την επιστολική και διαδικτυακή ψηφοφορία διευκολύνονται όλα τα μέλη να ψηφίσουν και να συμβάλλουν στην ενδυνάμωση του ΔΣ και της εταιρείας.

Είναι ενδιαφέρον και σημαντικό ότι περιλαμβάνονται στο αντικείμενο της εταιρείας και τα φάρμακα προηγμένων θεραπειών (advanced therapy medicinal products), όπως φάρμακα γονιδιακής θεραπείας, φάρμακα σωματοκυτταρικής θεραπείας, προϊόντα μηχανικής ιστών, συνδυασμένα φάρμακα προηγμένων θεραπειών.

Τακτικά μέλη γίνονται Έλληνες επιστήμονες που εργάζονται στην Ελλάδα ή στο εξωτερικό και ασχολούνται σε σταθερή βάση με τα αντικείμενα της εταιρείας.

Παρακάτω παρατίθενται μερικά από τα άρθρα του καταστατικού:

## Καταστατικό της Ελληνικής Εταιρείας Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής

### Άρθρο 1ο

Ιδρύεται Σωματείο, μη κερδοσκοπικού χαρακτήρα, με την επωνυμία «ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ».

Το Σωματείο έχει έδρα την Αθήνα.

Το Σωματείο έχει σφραγίδα σχήματος κυκλικού, που θα τίθεται σε όλα τα επίσημα έγγραφα του.

Η σφραγίδα αυτή έχει στο μέσο την χρονολογία ίδρυσης της Εταιρείας 2014 και γύρω-γύρω τις λέξεις «ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ». Διαθέτει επίσης και μία (1) ακόμη σφραγίδα στην Αγγλική με τις λέξεις «HELLENIC SOCIETY OF GENE THERAPY AND REGENERATIVE MEDICINE».

Υπόδειγμα της σφραγίδας βρίσκεται στην πρώτη και στην τελευταία σελίδα του Καταστατικού αυτού.

### Άρθρο 2ο

#### Σκοποί της Εταιρείας είναι:

α) η υποστήριξη γενικά του ερευνητικού πεδίου και η μελέτη όλων των αντικειμένων, που περιλαμβάνει η Γονιδιακή Θεραπεία, η Κυτταρική Θεραπεία, η Αναγεννητική Ιατρική, καθώς και των φαρμάκων προηγμένων θεραπειών (advanced therapy medicinal products), όπως τα φάρμακα γονιδιακής θεραπείας, σωματοκυτταρικής θεραπείας, προϊόντα μηχανικής ιστών, συνδυασμένα φάρμακα προηγμένων θεραπειών κ.ο.κ.

β) η προώθηση της επαγγελματικής και της δημόσιας εκπαίδευσης, η εκπόνηση, η εκτέλεση και η εποπτεία προγραμμάτων συνεχιζόμενης και μεταπτυχιακής εκπαίδευσης σε όλους τους τομείς της Γονιδιακής Θεραπείας και Κυτταρικής Θεραπείας, της Αναγεννητικής Ιατρικής, συμπεριλαμβανομένων των φαρμάκων προηγμένων θεραπειών.

γ) Η με κάθε κατάλληλο μέσο αξιοποίηση στον ανώτατο βαθμό της εξειδίκευσης στην Γονιδιακή και Κυτταρική Θεραπεία και στην Αναγεννητική Ιατρική για ωφέλεια της επιστήμης, της κοινωνίας και των ασθενών.

δ) Η διαρκής ενημέρωση και επιμόρφωση των γιατρών και άλλων επιστημόνων διαφόρων ειδικοτήτων στα θέματα της Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, της Αναγεννητικής Ιατρικής και των φαρμάκων προηγμένων θεραπειών για να βοηθήσουν αποτελεσματικότερα στην αντιμετώπιση ιατρικών προβλημάτων του πληθυσμού.

ε) Η ενημέρωση της κοινής γνώμης και κάθε αρμοδίου με κάθε διαθέσιμο μέσο (έντυπο, ηλεκτρονικό) για την σημασία της αντιμετώπισης διαφόρων νοσημάτων με επιστημονικές προσεγγίσεις και στρατηγικές Γονιδιακής

και Κυτταρικής Θεραπείας, Αναγεννητικής Ιατρικής και των φαρμάκων προηγμένων θεραπειών.

στ) Η τήρηση των κανόνων που απορρέουν από την Ιατρική Δεοντολογία.

ζ) Η συμβολή και συνεργασία ξένων επιστημόνων και οργανώσεων στις δραστηριότητες της Εταιρείας.

### Άρθρο 3ο

#### Δραστηριότητες της Εταιρείας:

α) Τα μέλη της Εταιρείας συνέρχονται σε Γενικές (τακτικές και έκτακτες) Συνελεύσεις (Γ.Σ.), ή σε δημόσιες επιστημονικές συνεδριάσεις. Σ' αυτές τις τελευταίες ανακοινώνονται κλινικές, εργαστηριακές εργασίες και πειραματικές έρευνες, επιδεικνύονται ενδιαφέροντες άρθρωσι, φάρμακα ή όργανα, γίνονται διαλέξεις και συζητήσεις επί επιστημονικών θεμάτων και, τέλος, κρίσεις επιστημονικών εργασιών ή ιατρικών βιβλίων.

β) Η Εταιρεία γνωμοδοτεί επί θεμάτων σχετικών με τη Γονιδιακή Θεραπεία, την Κυτταρική Θεραπεία και την Αναγεννητική Ιατρική, όταν της υποβάλλουν ερωτήματα η Κυβέρνηση ή άλλα αρμόδια όργανα, αλλά και με δική της πρωτοβουλία. Μεταξύ άλλων γνωμοδοτεί και για τα φάρμακα προηγμένων θεραπειών (advanced therapy medicinal products), όπως φάρμακα γονιδιακής θεραπείας, φάρμακα σωματοκυτταρικής θεραπείας, προϊόντα μηχανικής ιστών, συνδυασμένα φάρμακα προηγμένων θεραπειών.

γ) Η Εταιρεία, αν οι πόροι της το επιτρέπουν, μπορεί να εκδίδει δικό της περιοδικό, μη κερδοσκοπικού χαρακτήρα, ή να συνεργάζεται με άλλο συγγενές, με σκοπό τη δημοσίευση των επιστημονικών εργασιών των μελών της. Η λειτουργία του περιοδικού θα διέπεται από εσωτερικό κανονισμό που καταρτίζεται από το Διοικητικό Συμβούλιο (Δ.Σ.).

δ) Η Εταιρεία, ανάλογα με τους πόρους της, μπορεί να αποκτήσει ιδιότητα γραφεία και να διατηρεί βιβλιοθήκη και αναγνωστήρια, που επιτρέπεται να χρησιμοποιούνται ελεύθερα από τα μέλη της, αλλά και μη μέλη, ύστερα από άδεια του Προέδρου.

ε) Η Εταιρεία οργανώνει Επιστημονικά Συνέδρια, Συμπόσια ή Σεμινάρια κ.λπ. μόνη της ή σε συνεργασία με άλλες επιστημονικές εταιρείες. Επίσης, συμμετέχει σε Παγκόσμια και Διεθνή Συνέδρια με ανακοινώσεις των μελών της.

στ) Η Εταιρεία, για την πληρέστερη εκπλήρωση των σκοπών της, ενδιαφέρεται και διεκδικεί τη βελτίωση των ήδη υπαρχόντων τμημάτων (Κλινικών, Εργαστηρίων), που ασχολούνται με το αντικείμενο της ΕΕΓΘ-ΑΙ, καθώς και την ίδρυση νέων όπου κρίνεται αναγκαίο.

ζ) Η συνεργασία με όλους τους εθνικούς και διεθνείς δημόσιους και ιδιωτικούς φορείς που έχουν παρεμφερείς σκοπούς.

η) Η έγκαιρη πληροφόρηση, ενθάρρυνση και διευκόλυνση των ενδιαφερομένων για τη συμμετοχή τους στις επιστημονικές, επαγγελματικές εκδηλώσεις που γίνονται στην Ευρώπη, όπως σεμινάρια, συνέδρια, μετεκπαιδευτικά προγράμματα, ερευνητικά προγράμματα, προγράμματα ανταλλαγών, εκθέσεις τεχνολογικού εξοπλισμού και αναλώσιμων κ.λπ.

θ) Η δημιουργία ομάδων εργασίας και επιτροπών, όπως επιτροπή εκπαίδευσης, επιτροπή συνεχούς επαγγελματικής ανάπτυξης και ποιοτικής εκτίμησης προσφερόμενων υπηρεσιών, επιτροπή ανταλλαγών ανθρώπινου δυναμικού, επιτροπή επικοινωνίας, επιτροπή μελών, κ.α. Οι επιτροπές αυτές και οποιεσδήποτε άλλες κριθεί σκόπιμο να συσταθούν, μελετούν τα προβλήματα που απασχολούν τον χώρο της Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας και της Αναγεννητικής Ιατρικής και εισηγούνται στο Δ.Σ τα προσφερόμενα μέτρα για την υλοποίηση των σκοπών της Εταιρείας.

ι) Κάθε άλλο πρόσφορο μέσο για την πραγμάτωση των σκοπών του σωματείου κατά την κρίση του Δ.Σ και της Γ.Σ.

#### Άρθρο 4ο

Η εταιρεία αποτελείται από Τακτικά, Αντεπιστέλλοντα, Αρωγά και Επίτιμα μέλη, για τα οποία τηρείται σχετικό μητρώο, στο οποίο εγγράφονται τα εν λόγω μέλη μετά την τήρηση των διαδικασιών που προβλέπονται στα άρθρα 5 και 6 του παρόντος Καταστατικού.

α) Τακτικά μέλη εγγράφονται Επιστήμονες (Ιατροί, Βιολόγοι, Βιοχημικοί, Φαρμακοποιοί, Χημικοί, Τεχνολόγοι Εργαστηρίων, νοσηλευτές ΠΕ και άλλοι Βιοεπιστήμονες) που απασχολούνται σε σταθερή βάση στο πεδίο της Γονιδιακής ή/και της Κυτταρικής Θεραπείας ή/και της Αναγεννητικής Ιατρικής στην Ελλάδα. Επιστήμονες ελληνικής καταγωγής που απασχολούνται στην αλλοδαπή σε σταθερή βάση στο πεδίο της Γονιδιακής ή/και της Κυτταρικής Θεραπείας ή/και της Αναγεννητικής Ιατρικής εγγράφονται ως Τακτικά μέλη.

β) Αντεπιστέλλοντα μέλη εγγράφονται ιατροί και άλλοι επιστήμονες στην Ελλάδα που απασχολούνται σε συναφείς ή συνεργαζόμενους τομείς με τη Γονιδιακή ή/και Κυτταρική Θεραπεία ή/και την Αναγεννητική Ιατρική. Οι ειδικευόμενοι ιατροί εγγράφονται ως αντεπιστέλλοντα μέλη. Φοιτητές προπτυχιακοί ή μεταπτυχιακοί σε μάστερ ή διατριβή ή σε ερευνητική εργασία του αντικείμενου της Εταιρείας εγγράφονται στα αντεπιστέλλοντα μέλη. Ως αντεπιστέλλοντα μέλη εγγράφονται ιατροί και άλλοι επιστήμονες του εξωτερικού μη ελληνικής καταγωγής, που αποδεδειγμένα απασχολούνται στο πεδίο της Γονιδιακής ή/και της Κυτταρικής Θεραπείας ή/και της Αναγεννητικής Ιατρικής.

γ) Αρωγά μέλη ανακηρύσσονται φυσικά ή νομικά πρόσωπα, τα οποία έχουν προσφέρει αξιόλογη οικονο-

μική ενίσχυση στην Εταιρεία. Αρωγά μέλη ονομάζονται είτε απλά μέλη, είτε δωρητές, είτε ευεργέτες, είτε μεγάλοι ευεργέτες. Η διάρκεια της ιδιότητας του δωρητή, του ευεργέτη και του μεγάλου ευεργέτη είναι προσωρινή. Ορίζεται για το επόμενο της οικονομικής ενίσχυσης ημερολογιακό έτος. Το Δ.Σ ορίζει τα ποσά που καθιστούν τα φυσικά ή νομικά πρόσωπα απλά μέλη, δωρητές, ευεργέτες, ή μεγάλοι ευεργέτες.

δ) Επίτιμα μέλη μπορούν να εκλεγούν Έλληνες ή Ξένοι Επιστήμονες που έχουν εξόχως διαπρέψει επιστημονικά, σε τομείς συναφείς με τους σκοπούς της Εταιρείας, οι οποίοι συμβάλλουν άμεσα ή έμμεσα στην πρόοδο της Γονιδιακής Θεραπείας, της Κυτταρικής Θεραπείας της Αναγεννητικής Ιατρικής ή των φαρμάκων προηγμένων θεραπειών και έχουν διαπρέψει στους ερευνητικούς τομείς της.

ε) Επίτιμος Πρόεδρος μπορεί να εκλεγεί ένα άτομο που έχει συμβάλει εξαιρετικά στην ανάπτυξη της Εταιρείας.

#### Άρθρο 5ο

α) Τα Τακτικά και τα Αντεπιστέλλοντα μέλη εγγράφονται στην Εταιρεία μετά από συμπλήρωση και υποβολή αίτησης και μετά από έγκριση του Διοικητικού Συμβουλίου. Μόλις αναπτυχθεί σχετικό πρόγραμμα, η αίτηση θα είναι ηλεκτρονική.

β) Τα Αρωγά μέλη ανακηρύσσονται μετά από απόφαση του Διοικητικού Συμβουλίου

γ) Ο Επίτιμος Πρόεδρος εκλέγεται μετά από απόφαση του Διοικητικού Συμβουλίου και την έγκριση της πρότασης από την πλειοψηφία της Γενικής Συνέλευσης.

δ) Τα Επίτιμα μέλη εκλέγονται μετά από πρόταση του Διοικητικού Συμβουλίου και την έγκριση της πρότασης από την πλειοψηφία της Γενικής Συνέλευσης.

Εντός εξήντα (60) ημερών από την υποβολή της αίτησης το Δ.Σ πρέπει να εγκρίνει ή να απορρίψει την αίτηση του ενδιαφερομένου. Σε περίπτωση μη έγκρισης ο υποψήφιος μπορεί να καταθέσει ένσταση ενώπιον της Γ.Σ και του Δ.Σ και να υπακούσει στην απόφαση της Γ.Σ.

#### Άρθρο 10ο

α) Η Εταιρεία διοικείται από επταμελές Διοικητικό Συμβούλιο που εκλέγεται από τα Τακτικά μέλη της Εταιρείας, μετά από μυστική καθολική ψηφοφορία με ενιαίο ψηφοδέλτιο και μετά από σχετική πλειοψηφία. Οι εκλογές διεξάγονται αρχικά επιστολικά και διά του διαδικτύου μόλις αναπτυχθεί σχετικό ηλεκτρονικό πρόγραμμα. Σε κάθε περίπτωση διασφαλίζεται η μυστικότητα της ψηφοφορίας.

β) Η θητεία του είναι διετής.

γ) Υπάρχουν δύο ξεχωριστά ψηφοδέλτια και διεξάγονται δύο ξεχωριστές ψηφοφορίες. Στη μία ψηφοφορία με



ξεχωριστό ψηφοδέλτιο εκλέγεται ο Αναπληρωτής Πρόεδρος με μονοσταυρία.

Σε άλλη ψηφοφορία εκλέγονται τα 6 μέλη του ΔΣ με κοινό ψηφοδέλτιο. Δεν μπορούν να εκλεγούν περισσότερα από τρία μέλη με αμιγή δραστηριότητα στην κυτταρική θεραπεία ούτε περισσότερα από τρία με αμιγή δραστηριότητα στη γονιδιακή θεραπεία ακόμη και αν πλειοψηφήσουν. Σχετική δήλωση δραστηριότητας υποβάλλουν οι υποψήφιοι μαζί με την υποψηφιότητά τους, η οποία ελέγχεται από το ΔΣ και την Εφορευτική Επιτροπή. Ο ανωτέρω όρος δεν ισχύει, αν δεν υπάρχουν επαρκείς υποψηφιότητες.

Στις πρώτες εκλογές μετά την έγκριση του παρόντος καταστατικού εκλέγονται ξεχωριστά και ο Πρόεδρος και ο Αναπληρωτής Πρόεδρος.

### **Άρθρο 11ο**

Ο Αναπληρωτής Πρόεδρος μετά θητεία δύο ετών γίνεται Πρόεδρος την επόμενη θητεία.

Το νέο Διοικητικό Συμβούλιο συνεδριάζει εντός 15 ημερών από την εκλογή του, μετά από πρόσκληση του Προέδρου και εκλέγει από τα μέλη του το Γενικό Γραμματέα, τον Ειδικό Γραμματέα και τον Ταμία του.

Το Διοικητικό Συμβούλιο αναλαμβάνει τα καθήκοντά του και παραλαμβάνει κανονικά με πρωτόκολλο, που υπογράφεται από το απερχόμενο Διοικητικό Συμβούλιο, την περιουσία της Εταιρείας. Μέχρι την ανάληψη της διοίκησης από το νέο Διοικητικό Συμβούλιο οι δραστηριότητες διεξάγονται από το παλαιό.

Απαγορεύεται η εκλογή στη θέση του Αναπληρωτή Προέδρου και κατά συνέπεια του Προέδρου της Εταιρείας ενός μέλους που έχει ήδη διατελέσει Πρόεδρος την αμέσως προηγούμενη θητεία.

Απαγορεύεται η επανεκλογή στη θέση του μέλους του Διοικητικού Συμβουλίου αυτού που έχει εκλεγεί για δύο συνεχείς διετίες, όμως το μέλος αυτό μπορεί να επανεκλεγεί για δύο συνεχείς διετίες ως μέλος του Διοικητικού Συμβουλίου μετά από διακοπή.

### **Άρθρο 36ο**

#### **Μεταβατική Διάταξη**

α) Το παραπάνω καταστατικό αφού διαβάστηκε άρθρο προς άρθρο στο σύνολό του εγκρίθηκε και επικυρώθηκε κατά τη συνεδρίαση των ιδρυτών της Εταιρείας και υπογράφηκε από αυτούς στο Βόλο και σε αίθουσα του ξενοδοχείου ΠΑΡΚ, Δεληγιώργη 2, όπου συνήλθαμε σήμερα στις 29 Ιουνίου 2014, ημέρα Κυριακή και ώρα 09.00.

β) Η προσωρινή επταμελής Διοικούσα Επιτροπή που εξελέγη από τους ιδρυτές θα επιμεληθεί για τη δικαστική αναγνώριση της Εταιρείας και θα διοικεί την Εταιρεία, υποχρεούμενη να καλέσει μέσα σε τρεις μήνες από την έκδοση της οριστικής απόφασης του Πρωτοδικείου, Γενική Συνέλευση με θέματα:

1) Λογοδοσία των πεπραγμένων,

2) Προκήρυξη Εκλογών Προέδρου, Αναπληρωτή Προέδρου, μελών Διοικητικού Συμβουλίου, Πειθαρχικού Συμβουλίου και Εξελεγκτικής Επιτροπής.

Το Διοικητικό Συμβούλιο θα αναλάβει τη διοίκηση της Εταιρείας μετά την εκλογή του.

*Βόλος, 29 Ιουνίου 2014*

#### **Επόμενα Βήματα**

Οι πραγματικές δυσκολίες και οι προκλήσεις ξεκινούν με τα πρώτα βήματα της εταιρείας. Οικονομική αυτοδυναμία για τη στέγαση και τη λειτουργία της, αύξηση των μελών και ένταξη όλων των ερευνητικών ομάδων, διοργάνωση επιστημονικών εκδηλώσεων, επιτυχής προώθηση της συνεργασίας των μελών και των ομάδων, καταξίωση στην επιστημονική κοινότητα και στην κοινωνία είναι μερικά από τα προβλήματα που επιζητούν σωστούς χειρισμούς και λύση.

Η επίτευξη των φιλόδοξων και χρήσιμων σκοπών της εταιρείας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, ο σπουδαιότερος των οποίων είναι η βούληση των μελών της.

## Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα για την οξεία νόσο του μοσχεύματος κατά ξενιστή

Αναστασία Παπαδοπούλου, Ιωάννης Μπάτσος

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η οξεία νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή (aGvHD) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αιτίες νοσηρότητας και θνητότητας μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCT). Η δυνατότητα των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων (MSCs) να ασκούν ισχυρή ανοσορρυθμιστική δράση, έχει εγείρει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για την πιθανή χρήση τους στην αντιμετώπιση της aGvHD μετά από HSCT. Ένας αξιολόγος αριθμός προ-κλινικών και κλινικών μελετών φάσης I-II φανερώνουν ότι η χορήγηση MSCs είναι ασφαλής και εν δυνάμει αποτελεσματική στην πρόληψη ή/και τη θεραπεία της aGvHD. Ωστόσο, η χρήση τους εξακολουθεί να υπόκειται σε περιορισμούς ενώ απαιτούνται ισχυρότερα δεδομένα της αποτελεσματικότητάς τους. Στην παρούσα ανασκόπηση παραθέτουμε τα δημοσιευμένα αποτελέσματα χορήγησης MSCs σε πειραματικά ζωικά μοντέλα αλλογενούς HSCT και κλινικών μελετών χορήγησης MSCs ως μέσο πρόληψης ή θεραπείας της aGvHD. Τα δεδομένα αυτά τονίζουν τη σημαντικότητα της θεραπευτικής στρατηγικής με MSCs στο πλαίσιο αλλογενούς HSCT ωστόσο υποδηλώνουν ότι απαιτούνται πρόσθετες, πολυκεντρικές, τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες ώστε να διασαφηνιστεί η αποτελεσματικότητα χορήγησης MSCs στον έλεγχο της aGvHD.

Haema 2016; 7(1): 6-17 Copyright EAE

---

### Εισαγωγή

Η αλλογενής μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Hematopoietic Stem Cell Transplantation – HSCT) αποτελεί σήμερα τη μόνη θεραπευτική επιλογή με δυνατότητα ίασης σε πληθώρα νεοπλασματικών ή μη παθήσεων. Βασίζεται στην εκρίζωση του παθολογικού κλώνου από το συνδυασμό χημειο/ακτινοθεραπείας που προηγείται (προπαρασκευαστικό σχήμα) της έγχυσης μοσχεύματος και κυρίως τη δράση του αλλογενούς μοσχεύματος έναντι του κλώνου<sup>1,2</sup>. Ωστόσο, τα T-λεμφοκύτταρα του μοσχεύματος επάγουν τη νόσο μοσχεύματος κατά ξενιστή (Graft versus Host Disease – GvHD), μία σοβαρή φλεγμονώδη κατάσταση ως συνέπεια της ανοσολογικής αντίδρασης των T-λεμφοκυττάρων του δότη έναντι ιστών του λήπτη, η οποία αποτελεί τη σοβαρότερη και συχνά θανατηφόρα επιπλοκή της αλλογενούς HSCT<sup>3</sup>. Εάν δεν υπάρξει παρέμβαση πριν και μετά την αλλογενή HSCT, σχεδόν όλοι οι λήπτες θα αναπτύξουν σοβαρή GvHD.

Παρ' ότι η χρήση ανοσοκατασταλτικών βελτίωσε τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με GvHD, ορισμένες περιπτώσεις σοβαρής νόσου δεν απαντούν σε υψηλές δόσεις στεροειδών. Η κλινική έκβαση αυτών των ασθενών είναι φτωχή, με υψηλά ποσοστά θνητότητας λόγω λοιμώξεων και παρατεταμένης, σχετιζόμενης με GvHD, κυτταροπενίας και ανεπάρκειας πολλαπλών οργάνων<sup>4</sup>. Από την άλλη πλευρά, η αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων από το μόσχευμα μπορεί να μειώσει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα της GvHD, ωστόσο, μπορεί να οδηγήσει σε απόρριψη του μοσχεύματος<sup>5</sup>, υποτροπή της νόσου<sup>6</sup> και σοβαρές λοιμώξεις<sup>7</sup>. Συνεπώς, ο στόχος της HSCT είναι η ρύθμιση της αλλοαντιδραστικότητας με τη χορήγηση αλλογενών T-λεμφοκυττάρων, τα οποία δεν θα επάγουν GvHD, αλλά θα διατηρούν τη δράση έναντι των λευχαιμικών κυττάρων (graft vs leukemia) και έναντι των λοιμώξεων (graft vs infection).

Τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (Mesenchymal Stromal Cells – MSCs) είναι ένας πολυδύναμος πληθυσμός προγονικών κυττάρων που εδράζονται στον μυελό των οστών, καθώς και σε άλλους ιστούς, και έχουν ως βασικό ρόλο τη ρύθμιση της αιμοποίησης<sup>8</sup>. Μπορούν να απομονωθούν εύκολα, χάρη στην ικανότητά τους να προ-

---

Αιματολογική Κλινική-ΜΜΜΟ, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Γενικό Νοσοκομείο «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη  
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Ιωάννης Μπάτσος, e-mail: iobats@yahoo.gr

σκολλώνται σε πλαστικές επιφάνειες και να εκπτυχθούν αποτελεσματικά, αποδίδοντας γρήγορα υψηλούς αριθμούς. Οι αναγνωρισμένες δυνατότητές τους να μπορούν να διαφοροποιούνται προς ένα ευρύ φάσμα κυττάρων<sup>9</sup> και να ξεπερνούν τους φραγμούς του συστήματος ιστοσυμβατότητας έχουν εγείρει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη χρήση τους στην ιστική αναγέννηση και ιστική μηχανική, στη γονιδιακή θεραπεία ως οχήματα γονιδιακής μεταφοράς και στη μεταμόσχευση μυελού οστών ως υποστηρικτικά κύτταρα για την εμφύτευση των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων. Επιπρόσθετα, η ανακάλυψη της ανοσορρυθμιστικής τους δράσης<sup>10-13</sup> τα καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο στον έλεγχο της GvHD μετά από αλλογενή HSCT. Στην ανασκόπηση που ακολουθεί, παρουσιάζεται η προκλινική και κλινική έρευνα των τελευταίων χρόνων στην αντιμετώπιση της οξείας GvHD (aGvHD) με MSCs και αναπτύσσονται προβληματισμοί και εκτιμήσεις που πρέπει να ληφθούν υπόψη πριν την επίσημη ένταξη των MSCs στα θεραπευτικά πρωτόκολλα των μεταμοσχευτικών κέντρων.

### Προ-κλινικά ευρήματα χρήσης των MSCs ως θεραπεία της aGvHD

Η *in vitro* ανοσορρυθμιστική δράση των MSCs πρωτοαναφέρθηκε στις αρχές του 2000<sup>14</sup> και πλέον θεωρείται αναμφισβήτητη. Η ιδιότητά τους αυτή οδήγησε πολλές επιστημονικές ομάδες στη διερεύνηση της χρήσης τους ως πρόληψη ή/και θεραπεία της aGvHD σε ποικίλα πειραματικά μοντέλα (Πίνακας 1). Παρά τη γενική ομοφωνία περί της ανοσορρυθμιστικής *in vitro* δράσης των MSCs, τα αποτελέσματα των *in vivo* μελετών παραμένουν διφορούμενα. Το 2004 ανακοινώθηκε ότι η συγχωρήγηση MSCs ταυτόχρονα με το μόσχευμα σε ζωικό πειραματικό μοντέλο μυών μπορεί να αποτρέψει την GvHD και άνοιξε το δρόμο για την κλινική τους χρήση<sup>15</sup>. Πολύ σύντομα όμως, άλλη μελέτη ανέφερε ότι τα MSCs ανέστειλαν με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο τον πολλαπλασιασμό των διεγερμένων με αλλοαντιγόνο T-λεμφοκυττάρων *in vitro*, ωστόσο, δεν επηρέασαν την εξέλιξη της aGvHD όταν χορηγήθηκαν σε διάφορες δόσεις ταυτόχρονα με το αιμοποιητικό μόσχευμα, υποδηλώνοντας αναποτελεσματικότητα στην πρόληψη της νόσου<sup>16</sup>. Την ίδια χρονιά, οι Yañez et al παρατήρησαν θεραπευτικό όφελος μετά από έγχυση τριών εβδομαδιαίων δόσεων MSCs προερχόμενων από λιπώδη ιστό, ξεκινώντας από την ημέρα της μεταμόσχευσης. Κανένα όφελος δεν επετεύχθη όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν σε εγκατεστημένη νόσο οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η πρόληψη της aGvHD με MSCs είναι ευκολότερη της θεραπείας<sup>17</sup>. Ένα χρόνο αργότερα, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από τους Tisato et al με MSCs ομφάλιου λώρου. Οι τελευταίοι παρατήρησαν κλινικό όφελος στην aGvHD μετά από πολλαπλές

εγχύσεις MSCs πριν την HSCT με εβδομαδιαία μεσοδιαστήματα και καμία βελτίωση της νόσου όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν εφάπαξ ή με την έναρξη της GvHD<sup>18</sup>. Αναμφίβολα, τα αποτελέσματα των προ-κλινικών μελετών φανερώνουν ότι παράγοντες όπως ο χρόνος έγχυσης των κυττάρων, η δόση και η πηγή προέλευσής τους είναι καθοριστικοί για την αποτελεσματικότητα των κυττάρων έναντι της νόσου και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη πριν μεταφραστούν κλινικά.

A) *Προσδιορίζοντας τη βέλτιστη δόση MSCs*: Δεδομένου ότι ο αριθμός των διαθέσιμων για χορήγηση MSCs μπορεί να είναι περιορισμένος, αρχικά θα πρέπει να προσδιοριστεί η βέλτιστη δόση για τη θεραπεία της GvHD. Πολλές μελέτες κάνουν λόγο για δόσο-εξαρτώμενη δράση των MSCs (Πίνακας 1). Χαρακτηριστικά οι Joo et al χρησιμοποιώντας μικτές λεμφοκυτταρικές καλλιέργειες προσδιόρισαν την αναλογία 0.5 MSCs: 1 σπληνοκύτταρα ως τη βέλτιστη αναλογία αναστολής του πολλαπλασιασμού των σπληνοκυττάρων *in vitro*. Στη συνέχεια προσπαθώντας να προσομοιώσουν τις *in vitro* συνθήκες *in vivo* σε μοντέλο aGvHD μυών που έλαβαν  $5 \times 10^6$  κύτταρα μυελού και  $1 \times 10^6$  σπληνοκύτταρα, χορήγησαν χαμηλή ( $0.5 \times 10^6$ ), ενδιάμεση ( $1 \times 10^6$ ) ή υψηλή ( $2 \times 10^6$ ) δόση MSCs. Μόνο η ενδιάμεση και η υψηλή δόση MSCs βελτίωσαν σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης των ζώων<sup>19</sup>, υποδηλώνοντας ότι υψηλές δόσεις MSCs θα απαιτηθούν για κλινική χρήση στην aGvHD.

B) *Προσδιορίζοντας τον βέλτιστο χρόνο έγχυσης των MSCs*: Αρκετές επιστημονικές ομάδες διερεύνησαν τον βέλτιστο χρόνο χορήγησης MSCs στη θεραπεία της aGvHD (Πίνακας 1). Αξιοσημείωτα, οι Polchert et al μελέτησαν τη δράση των MSCs σε μοντέλο BALB/c χορηγώντας τα σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την HSCT (ημέρα +0 ή +2 ή +20 ή +30). Κανένα κλινικό όφελος δεν παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν την ημέρα 0 ή σε βαριά νόσο (ημέρα +30). Η ομάδα απέδωσε την παρατηρούμενη από άλλες επιστημονικές ομάδες αναποτελεσματικότητα των MSCs να θεραπεύσουν την aGvHD στο μικροπεριβάλλον και συγκεκριμένα στην απουσία προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως της IFN- $\gamma$ , τη στιγμή χορήγησής τους. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, τα MSCs αύξησαν το ποσοστό επιβίωσης των μυών μόνο εφόσον χορηγήθηκαν μετά την αναγνώριση του αντιγόνου από τα T-λεμφοκύτταρα, όταν δηλαδή τα επίπεδα της IFN- $\gamma$  ήταν αρκετά υψηλά (ημέρες +2 ή +20 μετά την HSCT). Ακόμη και μία έγχυση ήταν αρκετή όταν πραγματοποιούνταν την κατάλληλη χρονική στιγμή<sup>20</sup>. Στην ίδια εργασία αναφέρεται ότι η έκθεση των MSCs σε IFN- $\gamma$  πριν τη χορήγησή τους μπορεί να προστατεύσει πλήρως τα ζώα από τη σχετιζόμενη με GvHD θνητότητα, υπογραμμίζοντας ότι οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες μπορούν να ενισχύσουν την εν δυνάμει θεραπευτική δράση των MSCs. Πληθώρα αναφορών ενισχύει τα δεδομένα ότι οι ανοσο-

**Πίνακας 1. Προ-κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.**

Βιολογιογραφία	Δέκτης	Δότης	Πηγή MSCs	Οδός χορήγησης	Δόση	Χρόνος χορήγησης	Παρατηρήσεις
<b>Μελέτες που καταδεικνύουν αποτελεσματικότητα των MSCs στην GvHD</b>							
Chenet al. <sup>50</sup>	BALB/c	C57BL/6	Εμπορικά διαθέσιμα C57BL/6 MSCs	iv	2x10 <sup>5</sup>	D+1,7	Η χορήγηση MSCs μείωσε τη θνητότητα και άμβλυνε τις αλλοιώσεις που προκαλεί η GvHD σε διάφορους ιστούς. Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα των γενετικά τροποποιημένων MSCs (CXCR4+).
Chung et al. <sup>15</sup>	BALB/c	C3H/he	BM δότη	iv	1x10 <sup>5</sup>	D+0	Πρόληψη της GvHD από χορήγηση MSCs κατά τη μεταμόσχευση.
Gao et al. <sup>51</sup>	BALB/c	C57BL/6	MSCs δέρματος από τον δότη	iv	2x10 <sup>6</sup>	D+0	Μη καλλιεργημένα MSCs δέρματος μείωσαν τη συχνότητα εμφάνισης και σοβαρότητα της aGvHD σε μοντέλο σύμβατης μεταμόσχευσης.
Gregoire-Gauthier et al. <sup>52</sup>	NSG	PBMC ανθρώπου	MSCs ομφάλιου λώρου ανθρώπου	iv	1x10 <sup>6</sup>	D+0	Μία εφάπαξ έγχυση MSCs μπορεί να αναστείλει τα κλινικά συμπτώματα και τη σχετιζόμενη με GvHD θνητότητα.
Jang et al. <sup>53</sup>	BALB/c	C57BL/6	MSCs ανθρώπινου πλάκουντα	iv	5x10 <sup>5</sup> και 1x10 <sup>6</sup>	D+0	Αποτελεσματικότητα της υψηλής δόσης MSCs πλακούντα στον έλεγχο της aGvHD σε ζωικό μοντέλο μη συμβατούς μεταμόσχευσης.
Jang et al. <sup>54</sup>	NSG	PBMC ανθρώπου	UCB ανθρώπου	iv	5x10 <sup>5</sup>	D+0, D+0,3,6, D+0,7,14, D+18, D+18,21,24, D+18,25,32	Ως πρόληψη, μόνο οι πολλαπλές εγχύσεις MSCs βελτίωσαν την επιβίωση των ζώων σε μοντέλο ξενομεταμόσχευσης. Ως θεραπεία, τόσο η εφάπαξ όσο και οι επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις αύξησαν τα ποσοστά επιβίωσης και μετράσαν τις αλλοιώσεις στους ιστούς-στόχους της GvHD. Προσδιορισμός του βέλτιστου χρόνου χορήγησης MSCs για την πρόληψη και την θεραπεία της GvHD.
Jo et al. <sup>19</sup>	BALB/c	C3H/he	BM δότη	iv	5x10 <sup>5</sup> , 1x10 <sup>6</sup> και 2x10 <sup>6</sup>	D+0 και D+0	Δοσο-εξαρτώμενη δράση των MSCs και αποτελεσματικότητα τους σε υψηλές δόσεις.
Li et al. <sup>55</sup>	CB6F1	C57BL/6	BM δότη	iv	2x10 <sup>4</sup> , 2x10 <sup>5</sup> , 1x10 <sup>6</sup> και 2x10 <sup>6</sup>	D+3	Σημαντική και δοσο-εξαρτώμενη καθυστέρηση της εξέλιξης της GvHD από τα MSCs.
Li et al. <sup>56</sup>	BALB/c	ομφάλια C57/BL	BM δότη	iv	2x10 <sup>7</sup>	D+0	Χαμηλότερο σκορ aGvHD και καλύτερα ποσοστά επιβίωσης ζώων που έλαβαν MSCs ταυτόχρονα με το ομφαλοπλακουντιακό μόσχευμα.

UCB, αίμα ομφάλιου λώρου; PBMCs, μονοπύρνα περιφερικού αίματος; MSCs, μεσεγχυματικά κίτταρα; BM, μυελός των οστών; GvHD, νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή; iv, ενδοφλέβια; ip, ενδοπεριτοναϊκά; D+, ημέρα.

**Πίνακας 1.** (συνέχεια) Προ-κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.

Βιβλιογραφία	Δέκτης	Δότης	Πηγή MSCs	Οδός χορήγησης	Δόση	Χρόνος χορήγησης	Παρατηρήσεις
Nevruz et al <sup>57</sup> .	Wistar επίμυς	Sprague Dawley επίμυς	BM δότη		2x10 <sup>6</sup> /kg	D+1 και με τα πρώτα κλινικά συμπτώματα GvHD	Η χορήγηση MSCs προφυλακτικά ή ως θεραπεία με την εμφάνιση των πρώτων κλινικών συμπτωμάτων της GvHD αύξησε σημαντικά τη βιωσιμότητα επίμυων μετά από αλλογενή μεταμόσχευση. Τα MSCs ήταν εξίσου αποτελεσματικά με το πάγιο προφυλακτικό σχήμα στην αποφυγή της GvHD.
Polchert et al <sup>20</sup>	C57BL/6	BALB/c	BM δότη	iv	1x10 <sup>5</sup> και 5x10 <sup>5</sup>	D+0, D+2, D+20 και D+30	Αναποτελεσματικότητα των MSCs όταν εγχύθηκαν την D+0 ή σε βραία νόσο D+30 λόγω ανεπαρκούς IFN-γ. Σημαντική βελτίωση της θνησιμότητας με χορήγηση των κυττάρων σε υπό εξέλιξη νόσο, D+2 και D+20.
Ren et al <sup>23</sup>	C57BL/6 x C3H	C57BL/6	BM δότη	iv	0.5x10 <sup>6</sup>	D+3,7	Η χορήγηση MSCs απέτρεψε την GvHD. Η δράση των MSCs εξαρτάται από την παρουσία προ-φλεγμονωδών κυτοκινών.
Tisato et al. <sup>18</sup>	NOD/SCID	PBMC ανθρώπου	UCB ανθρώπου	iv	3x10 <sup>6</sup>	D-5,-4,-3,-2,-1	Μία εφάπαξ δόση MSCs δεν ήταν αποτελεσματική στη θεραπεία της GvHD. Βελτίωση της νόσου όταν τα MSCs χορηγήθηκαν με εβδομαδιαία μεσοδιαστήματα. Μη παρατηρηθέν όφελος από την χορήγηση MSCs κατά την έναρξη της νόσου.
Tobinet al. <sup>30</sup>	NSG	PBMC ανθρώπου	BM ανθρώπου	iv	4.4x10 <sup>4</sup> /g	D+0 και D+7	Ο χρόνος έναρξης των MSCs καθορίζει την αποτελεσματικότητά τους. Κλινικό όφελος μόνο όταν τα MSCs χορηγήθηκαν την D+7 και όχι την D+0, εκτός αν ήταν διεγερμένα με IFN-γ.
Xishanet al. <sup>58</sup>	C57BL/6	-	BM BALB/c	iv	1x10 <sup>5</sup> και 1x10 <sup>6</sup>	D+0	Δοσο-εξαρτώμενη αποτελεσματικότητα των MSCs στην aGvHD.
Yañez et al <sup>17</sup>	B6D2F1	C57BL/6	Λιπώδης ιστός	iv	5x10 <sup>4</sup>	D+0,7,14 ή D+14,21,28	Κλινικό όφελος μετά από πολλαπλές εγχύσεις MSCs με έναρξη την D+0. Μη παρατηρηθέν όφελος με έναρξη των εγχύσεων μετά τη σταθεροποίηση της GvHD.
Yoo et al <sup>33</sup>	BALB/c	C57BL/6	BM ανθρώπου ή BM μυών C3H/HeN	iv	5x10 <sup>5</sup>	D+1, 3	Πολλαπλές εγχύσεις MSCs μιών ή ανθρώπου βελτιώνουν σημαντικά τη σοβαρότητα της GvHD. Το πρωτοκόλλο απομόνωσης των MSCs επηρεάζει την ανοσο-ρυθμιστική τους δράση.
<b>Μελέτες που καταδεικνύουν αναποτελεσματικότητα των MSCs στην GvHD</b>							
Badillo et al <sup>59</sup>	CB6F1	C57BL/6	BM δότη	iv	5x10 <sup>4</sup> , 1x10 <sup>5</sup> και 1x10 <sup>6</sup>	D+0, D+2, D+0,7,14, D+10 και D+21	Αναποτελεσματικότητα των MSCs, μετά από χορήγηση σε διάφορες δόσεις και χρονικές στιγμές, τόσο στην πρόληψη όσο και τη θεραπεία της GvHD.

UCB, αίμα ομφάλιου λώρου; PBMCs, μονοπύρνα περιφερικού αίματος; MSCs, μεσεγχυματικά κύτταρα; BM, μυελός των οστών; GvHD, νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή; iv, ενδοφλέβια; ip, ενδοπεριτοναϊκή; D+, ημέρα.

**Πίνακας 1.** (συνέχεια) Προ-κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.

Βιβλιογραφία	Δέκτης	Δότης	Πηγή MSCs	Οδός χορήγησης	Δόση	Χρόνος χορήγησης	Παρατηρήσεις
Bruck et al <sup>60</sup>	NSG	PBMCs ανθρώπου	BM ανθρώπου	ip ή iv	2x10 <sup>6</sup> και 3x10 <sup>6</sup>	D+0, D+0, 7, 14 και D+0, 7, 14, 21	Η χορήγηση MSCs δεν προσέφερε κλινικό όφελος στην πρόληψη της GvHD σε δύο εξανθρωπισμένα μοντέλα ξενομεταμόσχευσης.
Jeon et al <sup>32</sup>	BALB/c	C57BL/6	BM ανθρώπου	iv	1x10 <sup>6</sup>	D+0 και D+7	Μία έγχυση MSCs ανθρώπου δεν ήταν αρκετή να μειώσει τη σχετιζόμενη με GvHD θνητότητα μυών σε μόντελο αλλογενούς μεταμόσχευσης.
Min et al <sup>61</sup>	B6D2F1	C57BL/6	BM και MSCs δότη	iv	1x10 <sup>6</sup> , 2x10 <sup>6</sup> και 2x10 <sup>6</sup>	D+1, D+1, 3, 5 και D+1	Μη μετριασμός της σοβαρότητας της GvHD μετά από πρώιμη χορήγηση διαφόρων δόσεων MSCs.
Prigozhina et al <sup>62</sup>	CB6F1	C57BL/6	BM δότη και δέκτη	iv	5x10 <sup>4</sup> και 5x10 <sup>5</sup>	D+0, 7, 14	Αδυναμία των MSCs να ελέγξουν την GvHD λόγω έλλειψης της ανοσορυθμιστικής τους δράσης σε ασύμβατες μεταμοσχεύσεις.
Sudres et al <sup>16</sup>	BALB/c	C57BL/6	BM δότη	iv	5x10 <sup>5</sup> , 3x10 <sup>6</sup> και 4x10 <sup>6</sup>	D+0	Κανένα παρατηρηθέν όφελος στη συχνότητα εμφάνισης και τη σοβαρότητα της GvHD, παρά την ανίχνευση των MSCs στον λήπτη.

UCB, αίμα ομφάλιου λώρου; PBMCs, μονοπύρνα περιφερικού αίματος; MSCs, μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα; BM, μυελός των οστών; GvHD, νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή; iv, ενδοπεριτοναικά; D+, ημέρα.

ρυθμιστικές ιδιότητες των MSCs δεν είναι έμφυτες, αλλά πιθανότατα ενεργοποιούνται από κυτοκίνες και άλλους παράγοντες του φλεγμονώδους μικροπεριβάλλοντος<sup>21-28</sup>. Η παραδοχή ότι τα MSCs πρέπει να «αδειοδοτηθούν» από το μικροπεριβάλλον για να δράσουν ανοσορυθμιστικά, καθιστά σαφές ότι ο χρόνος χορήγησης τους είναι μία πρόσθετη παράμετρος που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη στην κλινική εφαρμογή τους<sup>18,29,30</sup>. Επιπρόσθετα, εκτός από την ενεργοποίηση της ανοσορυθμιστικής δράσης των MSCs, το φλεγμονώδες περιβάλλον αποτελεί πόλο έλξης τους<sup>31</sup>. Με την προσέλευσή τους λοιπόν σε ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη, τους δίνεται η δυνατότητα να ασκήσουν τη δεύτερη σημαντική τους δράση, τη συμμετοχή τους στην αναγέννηση των υπό βλάβη ιστών, μέσω έκκρισης παραγόντων, μεταδιαφοροποίησης και κυτταρικής σύντηξης. Σε μία μελέτη βιοαπεικόνισης με στόχο την παρακολούθηση της μετανάστευσης των κυττάρων, σπληνοκύτταρα σημασμένα με την φθορίζουσα EGFP χρωστική, χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή GvHD σε ζώα, τα οποία στη συνέχεια έλαβαν MSCs σημασμένα με την RFP χρωστική. Με ανίχνευση των χρωστικών βρέθηκε ότι τα σπληνοκύτταρα μετανάστευσαν αρχικά στους πνεύμονες και ακόλουθα στο γαστρεντερικό σύστημα, το ήπαρ, το δέρμα και τους λεμφαδένες, ιστούς-στόχους της aGvHD. Μετά την έγχυση MSCs, η RFP χρωστική εντοπίστηκε στα ίδια σημεία, αποδεικνύοντας ότι τα MSCs μπορούν να μεταναστεύσουν στους ιστούς που πλήττονται από aGvHD και εν δυνάμει να συμμετέχουν στην ιστική αναγέννηση μέσω κυτταρικής επαφής αλλά και παρακρινούς δράσης.

Το πόσο καθοριστικοί μπορεί να είναι οι παράγοντες, δόση και χρόνος χορήγησης των κυττάρων, γίνεται επίσης φανερό από το γεγονός ότι μία επιστημονική ομάδα που αρχικά δημοσίευσε αναποτελεσματικότητα των MSCs σε ζωικό μοντέλο GvHD<sup>32</sup>, ανέφερε αργότερα αποτελεσματικότητα των κυττάρων στο ίδιο ζωικό μοντέλο μετά από χορήγηση πολλαπλών δόσεων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές<sup>33</sup>.

### Κλινική χρήση των MSCs στη θεραπεία της aGvHD

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο σημαντικότερος περιορισμός στην επιτυχή έκβαση της αλλογενούς μεταμόσχευσης είναι η εκδήλωση της νόσου του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή. Η πρώτη γραμμή θεραπείας της aGvHD είναι η χορήγηση υψηλών δόσεων κορτικοειδών, αλλά μόνο το 50% των ασθενών θα ανταποκριθούν<sup>34</sup>. Δεν υπάρχει καθιερωμένη δεύτερη γραμμή θεραπείας για ασθενείς με ανθεκτική

**Πίνακας 2. Κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.**

Βιβλιογραφία	Φάση μελέτης	Ασθενείς	Βαθμός (grade)	Πηγή MSCs	Αποτελέσματα	Σχόλια
LeBlanc et al <sup>37</sup>	I	1	IV	BM	ΠΥ (100%)	Πιλοτική μελέτη θεραπείας ανθεκτικού σε στεροειδή GvHD με MSCs τρίτου χώρου.
Lazarus et al <sup>63</sup>	I	46	Προφύλαξη	BM	13 εμφανίσεις aGvHD (28%)	Η συγχρήγηση εκτυποσόμενων MSCs από συμβατό δότη ως πρόληψη της GvHD είναι ασφαλής και εφικτή.
Ringden et al <sup>38</sup>	I	8	III-IV	BM	6 ΠΥ (75%)	Ανίχνευση των MSCs του δότη σε παχύ έντερο και λεμφαδένια ασθενούς. Βελτίωση του συνολικού ποσοστού επιβίωσης σε σύγκριση με την ομάδα αναφοράς.
LeBlanc et al <sup>39</sup>	II	55	II-IV	BM	30 ΠΥ (54%), 9 ΜΥ (16%)	Μικρότερη σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση θνητότητα και υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης 2-ετών στους ασθενείς με ΠΥ. Καλύτερη απάντηση παιδιατρικών ασθενών.
Fang et al <sup>64</sup>	I	6	III-IV	Λιπώδης ιστός	5 ΠΥ (83%)	Διερεύνηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας MSCs προερχόμενων από λιπώδη ιστό ως θεραπεία διάσωσης του ανθεκτικού aGvHD.
Muller et al <sup>65</sup>	I	2	III-IV	BM	1 ΠΥ (50%)	Η πρώτη μελέτη χρήσης MSCs σε παιδιατρικούς ασθενείς.
Ning et al <sup>48</sup>	I	10	Προφύλαξη	BM	1 ανάπτυξη	Η συγχρήγηση η MSCs κατά την HSCT απέτρεψε την ανάπτυξη GvHD, αν και αύξησε το ποσοστό υποτροπής σε σύγκριση με την ομάδα αναφοράς.
Kebrl et al <sup>43</sup>	II	32	II-IV	BM (Prochymal)	24 ΠΥ (77%), 5 ΜΥ (16%)	Απόκριση του μεγαλύτερου ποσοστού ασθενών με de novo GvHD στον συνδυασμό «off the shelf» MSCs τρίτου χώρου και κορτικοστεροειδών.
VonBonin et al <sup>66</sup>	I	13	III-IV	BM	1ΠΥ (7%), 1ΜΥ (7%)	Μικρή αποτελεσματικότητα MSCs καλλεργημένων σε θρεπτικό εμπλουτισμένο με αιμοπετάλια μη συμβατών δοτών.
Osiris Therapeutics, Inc <sup>67</sup>	III	192	II-IV	BM (Prochymal)	86 ΠΥ (45%) ομάδα MSCs. 88 ΠΥ (45%) ομάδα placebo	Η ομάδα που έλαβε MSCs για ανθεκτικό σε στεροειδή και de novo GvHD δεν διέφερε σημαντικά έναντι της placebo. Σημαντική βελτίωση ασθενών με ανθεκτικό σε στεροειδή GvHD ήπατος και GI. Τάση καλύτερης απόκρισης παιδιατρικών ασθενών.
Baron et al <sup>66</sup>	I	20	Προφύλαξη	BM	9 εμφανίσεις aGvHD (45%)	Η χορήγηση MSCs είναι καλά ανεκτή σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες μετά από ασύμβατη, μη μυελοκατασταλτική HSCT, χωρίς να παρεμποδίζεται η GvL δράση.
Lucchini et al <sup>68</sup>	I	11	I-IV	BM	2 ΠΥ (23,8%), 5 ΜΥ (47,6%)	Ασφαλής χορήγηση MSCs καλλεργημένων σε θρεπτικό εμπλουτισμένο με αιμοπετάλια σε παιδιατρικούς ασθενείς.

UCB: αίμα ομφάλιου λώρου, MSCs: μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, BM: μυελός των οστών, GvHD: νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή, ΠΥ: πλήρης ύφεση, ΜΥ: μερική ύφεση, GI: γαστροεντερικό.

**Πίνακας 2.** (συνέχεια) Κλινικές μελέτες χορήγησης MSCs ως θεραπεία της GvHD.

Βιβλιογραφία	Φάση μελέτης	Ασθενείς	Βαθμός (grade)	Πηγή MSCs	Αποτελέσματα	Σχόλια
Prasad et al <sup>44</sup>	I	12	III-IV	BM (Prochymal)	7 ΠΥ (58%), 2 ΜΥ (17%)	Η πρώτη μελέτη χρήσης προπαρασκευασμένων MSCs σε παιδιατρικούς ασθενείς. Καλύτερη κλινική απάντηση στο GI σύστημα.
Wu et al <sup>69</sup>	I	2	IV	UCB	2 ΠΥ (100%)	Η πρώτη κλινική μελέτη χρήσης MSCs προερχόμενων από UCB. Σημαντική βελτίωση ασθενών με aGvHD μετά από χορήγηση MSCs.
Kuzmina et al <sup>70</sup>	II	37	Προφύλαξη	BM	1/ 19 aGvHD (5,3%)	Ο συνδυασμός MSCs με την τυπική πρακτική προφύλαξης GvHD απέτρεψε σημαντικά το οξύ όχι όμως και το χρόνιο GvHD.
Resnick et al <sup>40</sup>		50	IV (42 ασθενείς) II-III (8 ασθενείς)	BM	17 ΠΥ (34%)	Καλύτερη απόκριση ασθενών με aGvHD <grade IV, ασθενών οι οποίοι απάντησαν από την 1η έγχυση και παιδιατρικών ασθενών.
Ball et al <sup>41</sup>	Αναδρομική	37	III-IV	BM	24 ΠΥ (65%), 8 ΜΥ (22%)	Η μεγαλύτερη μελέτη σε παιδιατρικούς ασθενείς.
Introna et al <sup>45</sup>	I	40	II-IV	BM	11 ΠΥ (27,5%), 16 ΜΥ (40%)	Χορήγηση MSCs τρίτου χώρου που έχουν εκπυχθεί σε έκπλυμα αιμοπεταλίων.

UCB: αίμα ομφάλιου λώρου, MSCs: μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα, BM: μυελός των οστών, GvHD: νόσος του μοσχεύματος κατά ξενιστή, ΠΥ: πλήρης ύφεση, ΜΥ: μερική ύφεση, GI: γαστροεντερικό.

στα κορτικοειδή aGvHD και παρά την ύπαρξη εναλλακτικών θεραπευτικών επιλογών, η πρόγνωση σε αυτή την περίπτωση είναι φτωχή, με μόλις το 16% των ασθενών να επιβιώνει στα δύο χρόνια ενώ ασθενείς με ανθεκτική στα κορτικοειδή grIV aGvHD καταλήγουν, στην πλειονότητά τους, μερικές εβδομάδες μετά.

Η χορήγηση MSCs σε αυτή την ομάδα ασθενών αποτελεί ελκυστική θεραπευτική επιλογή παρά τα περιορισμένα και πολλές φορές αντικρουόμενα αποτελέσματα των προκλινικών μελετών. Η επιλογή της κλινικής χορήγησης MSCs μπορεί να υποστηριχθεί από τα ακόλουθα δεδομένα: την επιβεβαιωμένη *in vitro* ικανότητα των MSCs να καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενεργοποιημένων αλλοαντιδραστικών λεμφοκυττάρων<sup>10</sup>, την ασφαλή συγχώρηση αυτόλογων MSCs και αρχεγόνων αιμοποιητικών κυττάρων σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αυτόλογη μεταμόσχευση για καρκίνο του μαστού<sup>35</sup> και τα προκαταρκτικά αποτελέσματα που καταδεικνύουν μείωση της aGvHD σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες που υποβλήθηκαν σε αλλογενή μεταμόσχευση και έλαβαν μαζί με το μυελικό μόσχευμα και MSCs από τον ίδιο δότη<sup>36</sup>.

Σημείο αναφοράς αποτελεί το case report που δημοσιεύθηκε το 2004 από την ομάδα της Le Blanc<sup>37</sup>, όπου και αναφέρθηκε η επιτυχής αντιμετώπιση σε 9-χρονο ασθενή ανθεκτικής grIV aGvHD με τη χορήγηση MSCs από «τρίτο χώρο». Σταθερή και πλήρης ύφεση επιτεύχθηκε μετά τη δεύτερη έγχυση MSCs. Η σηματικότητα της παρουσίασης του περιστατικού έγκειται στο γεγονός ότι τα κύτταρα προερχόταν από την απλοταυτόσημη μητέρα και όχι από το δότη του μοσχεύματος. Στηριζόμενοι στην επιτυχή έκβαση του ασθενούς η ίδια ομάδα χορήγησε MSCs σε άλλους οχτώ ασθενείς με ανθεκτική aGvHD και έξι από αυτούς εμφάνισαν κλινική απάντηση<sup>38</sup>.

Υπό την αιγίδα του EBMT διενεργήθηκε μελέτη φάσης II όπου και αξιολογήθηκε η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της χορήγησης MSCs σε 55 ασθενείς με ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD<sup>39</sup>. Η Δm δόση χορηγούμενων κυττάρων ήταν  $1 \times 10^6/\text{kg}$ . Οι ασθενείς έλαβαν MSCs από HLA-συμβατό δότη ή από απλοταυτόσημο δότη ή από HLA-μερικώς συμβατό δότη. Σε 27 ασθενείς έγινε μια έγχυση MSCs ενώ σε 28 ασθενείς πραγματοποιήθηκαν 2 ή περισσότερες εγχύσεις. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια κατά την έγχυση. Τριάντα ασθενείς εμφάνισαν πλήρη απάντη-



ση της aGvHD (55%). Δεν υπήρξε καμία συσχέτιση της απάντησης με το είδος του δότη των MSCs, αλλά τα ποσοστά απάντησης ήταν υψηλότερα στα παιδιά (84%) έναντι των ενηλίκων (60%). Οι ασθενείς που παρουσίασαν πλήρη απάντηση είχαν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη θνητότητα σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση στον 1 χρόνο (37 vs 72%,  $p=0,002$ ) και υψηλότερη επιβίωση (53 vs 16%) έναντι των υπολοίπων. Στη βάση των ενθαρρυντικών αυτών αποτελεσμάτων, διενεργείται σήμερα, πάλι υπό την αιγίδα του EBMT, προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, όπου και θα αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα των MSCs στη θεραπεία ανθεκτικής στα κορτικοειδή aGvHD.

Πρόσφατα δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα της δεύτερης μεγαλύτερης ακαδημαϊκής πολυκεντρικής μελέτης με χρήση MSCs στη θεραπεία ανθεκτικής στα κορτικοειδή aGvHD<sup>40</sup>. Σε 50 ασθενείς χορηγήθηκαν 74 (1-4) εγχύσεις MSCs για 54 επεισόδια ανθεκτικής στα κορτικοειδή aGvHD. Η νόσος ήταν gr IV σε 42 επεισόδια. Η Δm δόση χορηγούμενων κυττάρων ήταν  $1,14 \times 10^6/\text{kg}$ , ενώ στην πλειονότητα των περιπτώσεων χορηγήθηκαν έτοιμα ψυγμένα κύτταρα. Δεν αναφέρθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια κατά την έγχυση. Αρχική απάντηση παρατηρήθηκε στο 66% των ασθενών αλλά πλήρης υποχώρηση των συμπτωμάτων στο 34%. Από τη μελέτη διαπιστώθηκε καλύτερη ανταπόκριση σε ασθενείς που είχαν aGvHD < gr IV, σε αυτούς που η νόσος απάντησε από την πρώτη έγχυση και στην παιδιατρική ομάδα των ασθενών. Η πολυπαραγοντική ανάλυση κατέδειξε ως ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες για τη επιβίωση, την απάντηση στη πρώτη έγχυση των MSCs και τη νεαρή (<18 ετών) ηλικία.

Και οι δύο μελέτες που προαναφέρθηκαν έδειξαν καλύτερη ανταπόκριση των MSCs στον παιδιατρικό πληθυσμό. Η μεγαλύτερη όμως μελέτη που αξιολόγησε τη δράση των MSCs σε παιδιά δημοσιεύθηκε το 2013 από Ιταλική ομάδα<sup>41</sup>. Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκε η δράση των MSCs σε 37 παιδιά (3 μηνών – 17 ετών) που εμφάνιζαν ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD. Τα κύτταρα στην πλειονότητα των περιπτώσεων προερχόταν από HLA-μερικώς συμβατό δότη, ενώ το Δm διάστημα χορήγησης των κυττάρων ήταν 13 (5 – 85) ημέρες από την έναρξη χορήγησης των κορτικοειδών. Τα 34/37 παιδιά έλαβαν πολλαπλές εγχύσεις MSCs. Πλήρης απάντηση παρατηρήθηκε σε 24 παιδιά (65%), μερική απάντηση σε 8 και καμία απάντηση μόνο σε 5 παιδιά. Η θνητότητα σχετιζόμενη με τη μεταμόσχευση (TRM) ήταν 17% στα παιδιά που παρουσίασαν πλήρη ύφεση μετά την έγχυση των MSCs έναντι 69% των ασθενών που δεν είχαν καμία ανταπόκριση ( $p=0,001$ ). Με Δm διάστημα παρακολούθησης τα 2,9 χρόνια, η ολική επιβίωση (OS) ήταν 65% στα παιδιά με τη πλήρη ύφεση, έναντι 0% των ασθενών χωρίς ανταπόκριση ( $p=0,001$ ). Τα παιδιά που έλαβαν νωρίς τα MSCs (μεταξύ 5<sup>ης</sup> και 12<sup>ης</sup> ημέρας μετά τη χορή-

γηση των κορτικοειδών) παρουσίασαν ισχυρή τάση για καλύτερη OS και χαμηλότερη TRM έναντι των ασθενών που έλαβαν αργά τα κύτταρα (μετά τη 13<sup>η</sup> ημέρα από την έναρξη χορήγησης των κορτικοειδών).

Πολυκεντρική τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, η οποία όμως διενεργήθηκε από ιδιωτική εταιρεία που παράγει MSCs, αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα πολλαπλών εγχύσεων MSCs προερχόμενων από τρίτο χώρο, έναντι χορήγησης placebo σε ασθενείς που εμφανίζουν ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD<sup>42</sup>. Ενώ δε παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην επίτευξη πλήρους ύφεσης μεταξύ των 2 σκελών της μελέτης (35 έναντι 30%), σε υποανάλυση που διενεργήθηκε διαπιστώθηκε ότι ασθενείς που είχαν προσβολή ήπατος και εντέρου παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης μετά τη χορήγηση των MSCs έναντι αυτών που έλαβαν εικονικό φάρμακο.

Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των MSCs που προέρχονται από HLA-μερικώς συμβατό δότη, που αποδίδεται κατά κύριο λόγο στην απουσία έκφρασης στην επιφάνεια των μεσεγγυματικών κυττάρων αντιγόνων τάξης II (MHC II), έχει οδηγήσει αρκετούς δημόσιους και ιδιωτικούς φορείς στη δημιουργία τράπεζας MSCs έτσι ώστε να είναι άμεσα διαθέσιμα όταν θα τα χρειασθεί ο κλινικός ιατρός. Η ιδιωτική και εγκεκριμένη από το FDA εταιρεία Osiris, αξιολόγησε τη δραστηριότητα έτοιμων, προπαρασκευασμένων MSCs (Prochymal) ως θεραπεία πρώτης γραμμής, σε συγχορήγηση με κορτικοειδή, σε πρωτοδιαγνωσθείσα aGvHD<sup>43</sup>. Παρατηρήθηκε αρχική απάντηση στο 94% των ασθενών, ενώ το 77% από τους 31 διαθέσιμους ασθενείς εμφάνισε πλήρη ύφεση. Δεν παρατηρήθηκε καμία τοξικότητα κατά την έγχυση ούτε δημιουργία έκτοπου ιστού, έως και 2 χρόνια μετά τις εγχύσεις. Τα κύτταρα από την ίδια εταιρεία αξιολογήθηκαν στη συνέχεια σε παιδιατρικό πληθυσμό που εμφάνιζε ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD με προσβολή κυρίως του εντέρου. Δώδεκα ασθενείς ηλικίας κάτω των 18 ετών έλαβαν πολλαπλές εγχύσεις έτοιμων MSCs (δύο ανά εβδομάδα για 4 εβδομάδες). Συνολικά 7 από τους 12 ασθενείς κατέδειξαν πλήρη ύφεση (58%), ενώ 9/12 ασθενείς παρουσίασαν πλήρη υποχώρηση των νοσημάτων τους από το ΓΕΣ<sup>44</sup>.

Σημαντικός περιορισμός στην κλινική εφαρμογή των MSCs είναι η χρήση, κατά την έκπτυξή τους στην καλλιέργεια, προϊόντων ζωικής προέλευσης, γεγονός που ενέχει το δυνητικό κίνδυνο άνοσης απάντησης του ασθενούς σε ζωικές πρωτεΐνες που προσκολλώνται στην επιφάνεια των MSCs, αλλά και την πιθανότητα λοιμωδών επιπλοκών από ξένα προς τον ανθρώπινο οργανισμό παράγωγα. Πρόσφατη πολυκεντρική μελέτη φάσης I αξιολόγησε την ασφάλεια χορήγησης MSCs που έχουν εκπτυχθεί σε έκπλυμα αιμοπεταλίων (platelet lysate) σε 40 ασθενείς (15 παιδιά – 25 ενήλικες) που εμφάνισαν ανθεκτική στα κορτικοειδή aGvHD<sup>45</sup>. Η Δm δόση των χορηγούμενων κυττάρων

ήταν  $1,5 \times 10^6/\text{kg}$ , ενώ ο Δm αριθμός εγχύσεων ανά ασθενή, 3. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια ή αντίδραση κατά και αμέσως μετά την έγχυση, ενώ οι 86 ανεπιθύμητες ενέργειες που καταγράφηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης οφειλόταν κατά κύριο λόγο σε λοιμώξεις (72,1%) και κατά δεύτερο λόγο (6,9%) σε οργανική ανεπάρκεια, ως συνέπεια της προόδου της aGvHD.

### Κλινική χρήση των MSCs στη προφύλαξη της aGvHD

Αντικρουόμενα αποτελέσματα παρουσιάζουν εργασίες που αξιολόγησαν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των MSCs ως προφύλαξη έναντι της aGvHD. Ο κύριος λόγος για την ασυμφωνία των αποτελεσμάτων αποτελεί το γεγονός ότι οι περισσότερες μελέτες περιλαμβάνουν μικρό αριθμό ασθενών και δεν υπάρχει ομάδα control για συγκριτικό έλεγχο. Μελέτη εκτίμησε την ασφάλεια της συγχρόνησης MSCs και περιφερικών αρχηγόνων αιμοποιητικών κυττάρων (PBSCs) και έκανε σύγκριση στην έκβαση της μεταμόσχευσης με ομάδα ιστορικού control ασθενών με παρόμοια χαρακτηριστικά<sup>46</sup>. Είκοσι ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες έλαβαν MSCs από τρίτο χώρο, 30-120 λεπτά πριν την έγχυση των PBSCs αφού είχε προηγηθεί μειωμένης έντασης σχήμα προετοιμασίας. Δεν παρατηρήθηκε καμία ανεπιθύμητη αντίδραση κατά ή και μετά την έγχυση, ενώ 19 από τους 20 ασθενείς είχαν ταχεία και ικανοποιητική εμφύτευση (σε έναν ασθενή παρατηρήθηκε απόρριψη του μοσχεύματος). Η επίπτωση της aGvHD στις 100 ημέρες ήταν 35%, ενώ η επίπτωση της aGvHD στην ομάδα του ιστορικού control που έλαβε μόνο PBSCs ήταν 56%. Από την ίδια μελέτη ο κίνδυνος θανάτου στο έτος από aGvHD ή λοίμωξη σε έδαφος aGvHD ήταν 10% ενώ στην ομάδα του ιστορικού control ο κίνδυνος θανάτου στο έτος ήταν 31% ( $p=0,04$ ). Πρόσφατα αξιολογήθηκε η συγχρόνηση μεσεγγυματικών κυττάρων προερχόμενων από ομφαλοπλακουντικό αίμα (UC-MSCs) μαζί με PBSCs από απλοταυτόσημο δότη, χωρίς αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων σε 21 ασθενείς που έπασχαν από σοβαρή απλαστική αναιμία<sup>47</sup>. Η μη αφαίρεση των T-λεμφοκυττάρων από δότη που μοιράζεται τον ένα μόνο απλότυπο με τον ασθενή, αποσκοπούσε στη διασφάλιση υψηλού ποσοστού εμφύτευσης, θα περίμενε όμως κανείς να αυξήσει τα ποσοστά της aGvHD. Πράγματι όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν ταχεία και πλήρη εμφύτευση του αλλογενούς μοσχεύματος ενώ ενθαρρυντικό είναι ότι μόλις 9/21 ασθενείς (42,8%) εκδήλωσαν aGvHD (gr II-IV) και ένας μόνο κατέληξε. Προβληματισμός βέβαια υπάρχει σχετικά με το ρόλο των MSCs προς την κατεύθυνση της δράσης του μοσχεύματος έναντι της λευχαιμίας (Graft-Versus-Leukemia- GVL) ιδιαίτερα όταν χορηγούνται σε ασθενείς προφυλακτικά έναντι της aGvHD. Μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2008 και

αξιολόγησε τη συγχρόνηση αιμοποιητικών κυττάρων με MSCs που προερχόταν από τον δότη, ενώ επιβεβαίωσε τα χαμηλότερα ποσοστά της aGvHD στους ασθενείς που έλαβαν MSCs, κατέδειξε υψηλότερα ποσοστά υποτροπής της λευχαιμίας στην ίδια ομάδα ασθενών<sup>48</sup>. Περιορισμός βέβαια της μελέτης αποτελεί το γεγονός ότι συμπεριέλαβε μικρό αριθμό ασθενών (25) και επομένως τα συμπεράσματά της θα πρέπει να αξιολογούνται με προσοχή.

### Προβληματισμοί - Μελλοντικές κατευθύνσεις

Παρά τα 40 χρόνια που μεσολαβούν από την ταυτοποίηση των MSCs από τον Friedenstein έως σήμερα, τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των διαφόρων μελετών που καταγράφονται στη διεθνή βιβλιογραφία, καθιστούν σαφές ότι τα αναπάντητα ερωτήματα είναι περισσότερα σε σχέση με αυτά που έχουν αποσαφηνισθεί. Η απουσία ενός ειδικού δείκτη που θα ταυτοποιεί τα MSCs, καθιστά επισφαλές κατά πόσο απομονώνεται και χρησιμοποιείται ομοιογενής ομάδα κυττάρων από τις διάφορες ερευνητικές ομάδες. Κρίνεται σήμερα ως επιτακτική η ανάγκη να εφαρμοστούν πιο αυστηροί όροι στην ταυτοποίηση των MSCs, πέραν των φαινοτυπικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών. Η επιβεβαιωμένη ανοσοκατασταλτική δράση των MSCs «γεννά» ερωτήματα κατά πόσο μπορεί να επηρεάζει τη δράση του μοσχεύματος έναντι του κακοήθους κλώνου (GVL). Επιπρόσθετα, αν και η ομάδα των Karlsson et al. κατέδειξε ότι η έγχυση MSCs δεν επηρεάζει τη δράση των ειδικών έναντι ιών T-λεμφοκυττάρων<sup>49</sup>, δεν είναι ακόμη σαφές αν η χορήγησή τους καθιστά τους ασθενείς επιρρεπείς σε λοιμώξεις μετά τη μεταμόσχευση. Ασαφής παραμένει και ο ρόλος του μικροπεριβάλλοντος στη δράση των MSCs. Έχει αναφερθεί ότι, απουσία IFN- $\gamma$  τα MSCs είναι ευάλωτα στη λύση από ενεργοποιημένα NK κύτταρα. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από προκλινικά δεδομένα που κάνουν λόγο για ανάγκη «αδειοδότησης» των MSCs από το φλεγμονώδες περιβάλλον για ενίσχυση της θεραπευτικής τους δράσης. Είναι γνωστό, ότι αυξημένα επίπεδα IFN- $\gamma$  προάγουν την έκφραση αντιγόνων τάξης II στα MSCs, αυξάνοντας τον κίνδυνο ταχείας απόρριψής τους. Από την άλλη πλευρά, καθώς η ανοσορυθμιστική τους δράση ασκείται κύρια μέσω διαλυτών παραγόντων, ο κίνδυνος αυτός ενδεχομένως να μην είναι ιδιαίτερα επίσημος. Παρ' όλα αυτά, είναι σαφές ότι το χρονικό διάστημα χορήγησης των κυττάρων για την αντιμετώπιση μιας φλεγμονώδους – ανοσολογικής διεργασίας καθώς και το πόσο ασφαλής είναι η χορήγηση μη συμβατών προς τον λήπτη MSCs δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Η χαμηλή ανοσογονικότητα των MSCs φαίνεται πως επηρεάζεται από τις συνθήκες καλλιέργειας των κυττάρων για αυτό γίνεται σήμερα προσπάθεια αντικατάστασης ζωικών ορών (δυσνητικός κίνδυνος μετάδοσης

ζωικών παθήσεων, ευαισθητοποίηση σε αντιγόνα ζωικής προελεύσεως) με αυτόλογο ορό, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, ΑΒ πλάσμα, με αντικρουόμενα ως τώρα αποτελέσματα. Η ανάγκη χορήγησης ικανοποιητικού αριθμού κυττάρων (ο οποίος δεν έχει προσδιοριστεί σαφώς), ωθεί σε διαδοχικές ανακαλλιέργειες των κυττάρων (passages). Οι διαδοχικές ανακαλλιέργειες όμως φαίνεται ότι επηρεάζουν την ποιότητα τους, καθώς κύτταρα που χορηγούνται μετά από αρκετά passages ενέχουν τον κίνδυνο της γενετικής αστάθειας και των μειωμένων λειτουργικών ιδιοτήτων, ενώ αντιθέτως κύτταρα που προέρχονται από αρχικά passages αποτελούν ίσως πιο ανομοιογενή πληθυσμό. Προβληματισμό επίσης δημιουργεί η ανάγκη έγχυσης επαναληπτικών δόσεων MSCs για την αντιμετώπιση υποτροπιάζουσών παθήσεων όπως η aGvHD. Λαμβάνο-

ντας υπόψη τον περιορισμένο χρόνο ζωής των κυττάρων, καθώς και το ότι η δράση τους ασκείται πιθανότατα μέσω διαλυτών παραγόντων, γεννάται το ερώτημα, κατά πόσο μια δόση χορηγούμενων κυττάρων θα επιτρέψει την ασφαλή προοδευτική διακοπή της υπόλοιπης ανοσοκατασταλτικής αγωγής που λαμβάνει ο ασθενής.

Είναι επομένως απολύτως κατανοητό, ότι ο δρόμος που έχουμε ακόμη να διανύσουμε είναι μακρύς αλλά πιθανόν μέσα από τη διενέργεια προοπτικών τυχαιοποιημένων μελετών να δοθούν απαντήσεις που θα επιτρέψουν την χορήγηση των MSCs στη θεραπεία σημαντικών επιπλοκών της αλλογενούς μεταμόσχευσης με υψηλό ποσοστό αποτελεσματικότητας καθιστώντας την τελευταία ελκυστική θεραπευτική επιλογή σε περισσότερους ασθενείς που την έχουν ανάγκη.

## Mesenchymal stromal cells for acute graft versus host disease

by Anastasia Papadopoulou, Ioannis Batsis

*Haematology Department - Bone Marrow Transplantation Unit, Gene and Cell Therapy Center, "G. Papanikolaou" General Hospital, Thessaloniki, Greece*

**ABSTRACT:** Severe acute graft versus host disease (aGvHD) is a major cause of morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Mesenchymal stromal cells (MSCs) exhibit strong immunomodulatory properties that prompted their clinical use in severe aGvHD. A number of pre-clinical and clinical phase I-II studies have suggested that infusion of MSCs is safe and potentially effective in preventing or treating aGvHD. However, MSCs still present limitations and definitive proof of their efficacy is lacking thus far. This article reviews the literature on the administration of MSCs in animal models of allogeneic HSCT and the results of clinical trials investigating the use of MSCs to prevent or treat aGvHD. The data emphasize the significance of this therapeutic approach and indicate that large, multicenter, randomized clinical trials are needed to more precisely assess the impact of MSCs infusion on the control of aGvHD.

## Βιβλιογραφία

1. Thomas ED, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N Engl J Med.* 1975; 292:895-902.
2. Thomas E, Storb R, Clift RA, et al. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med.* 1975; 292:832-843.
3. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet.* 2009; 373:1550-1561.
4. Ringdén O, Nilsson B. Death by graft-versus-host disease associated with HLA mismatch, high recipient age, low marrow cell dose, and splenectomy. *Transplantation.* 1985; 40:39-44.
5. Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD, et al. Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood.* 1985; 66:664-672.
6. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1990; 75:555-562.
7. Small TN, Papadopoulos EB, Boulad F, et al. Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood.* 1999; 93:467-480.
8. Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8:111-137.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284:143-147.
10. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99:3838-3843.
11. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006; 107:367-372.
12. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007; 110:3499-3506.

13. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007; 83:71–76.
14. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002; 30:42–48.
15. Chung NG, Jeong DC, Park SJ, et al. Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2004; 80:370–376.
16. Sudres M, Norol F, Trenado A, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2006; 176:7761–7767.
17. Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006; 24:2582–2591.
18. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2007; 21:1992–1999.
19. Joo S-Y, Cho K-A, Jung Y-J, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner. *Cytotherapy*. 2010; 12:361–370.
20. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008; 38:1745–1755.
21. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; 24:386–398.
22. Ren G, Su J, Zhang L, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009; 27:1954–1962.
23. Ren G, Zhang L, Zhao X, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008; 2:141–150.
24. Sheng H, Wang Y, Jin Y, et al. A critical role of IFN-gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*. 2008; 18:846–857.
25. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett*. 2007; 110:91–100.
26. Meisel R, Zibert A, Laryea M, et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004; 103:4619–4621.
27. Mouggiakakos D, Jitschin R, Johansson CC, et al. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2011; 117:4826–4835.
28. Djouad F, Plence P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003; 102:3837–3844.
29. Dazzi F, Marelli-Berg FM. Mesenchymal stem cells for graft-versus-host disease: close encounters with T cells. *Eur J Immunol*. 2008; 38:1479–1482.
30. Tobin LM, Healy ME, English K, Mahon BP. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*. 2013; 172:333–348.
31. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med*. 2003; 5:1028–1038.
32. Jeon M-S, Lim H-J, Yi T-G, et al. Xenoreactivity of human clonal mesenchymal stem cells in a major histocompatibility complex-matched allogeneic graft-versus-host disease mouse model. *Cell Immunol*. 2010; 261:57–63.
33. Yoo HS, Yi T, Cho YK, et al. Mesenchymal stem cell lines isolated by different isolation methods show variations in the regulation of Graft-versus-host disease. *Immune Netw*. 2013; 13:133–140.
34. Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood*. 2007; 109:4119–4126.
35. Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2000; 18:307–316.
36. Frassoni F, Labopin M, Bacigalupo A, et al. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical hematopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: A matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2002; 29(Suppl. 2):S2.
37. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; 363:1439–1441.
38. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006; 81:1390–1397.
39. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008; 371:1579–1586.
40. Resnick IB, Barkats C, Shapira MY, et al. Treatment of severe steroid resistant acute GVHD with mesenchymal stromal cells (MSC). *Am J Blood Res*. 2013; 3:225–238.
41. Ball LM, Bernardo ME, Roelofs H, et al. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 2013; 163:501–509.
42. Martin PJ, Uberti JP, Soiffer RJ, et al. Prochymal improves response rates in patients with steroid-refractory acute graft versus host disease (SR-GVHD), involving the liver and gut: Results of a randomized, placebo-controlled, multicenter phase trial in GVHD. *Biol Blood Marrow Transplantat*. 2010; 16:S169–S170.

43. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15:804–811.
44. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, et al. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal™) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2011; 17:534–541.
45. Introna M, Lucchini G, Dander E, et al. Treatment of graft versus host disease with mesenchymal stromal cells: a phase I study on 40 adult and pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20:375–381.
46. Baron F, Lechanteur C, Willems E, et al. Cotransplantation of mesenchymal stem cells might prevent death from graft-versus-host disease (GVHD) without abrogating graft-versus-tumor effects after HLA-mismatched allogeneic transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:838–847.
47. Wu Y, Cao Y, Li X, et al. Cotransplantation of haploidentical hematopoietic and umbilical cord mesenchymal stem cells for severe aplastic anemia: successful engraftment and mild GVHD. *Stem Cell Res.* 2014; 12:132–138.
48. Ning H, Yang F, Jiang M, et al. The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. *Leukemia.* 2008; 22:593–599.
49. Karlsson H, Samarasinghe S, Ball LM, et al. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood.* 2008; 112:532–541.
50. Chen W, Li M, Li Z, et al. CXCR4-transduced mesenchymal stem cells protect mice against graft-versus-host disease. *Immunol Lett.* 2012; 143:161–169.
51. Gao L, Liu F, Tan L, et al. The immunosuppressive properties of non-cultured dermal-derived mesenchymal stromal cells and the control of Graft-versus-host disease. *Biomaterials.* 2014; 35:3582–3588.
52. Gregoire-Gauthier J, Selleri S, Fontaine F, et al. Therapeutic efficacy of cord blood-derived mesenchymal stromal cells for the prevention of acute graft-versus-host disease in a xenogenic mouse model. *Stem Cells Dev.* 2012; 21:1616–1626.
53. Jang MJ, Kim H-S, Lee H-G, et al. Placenta-derived mesenchymal stem cells have an immunomodulatory effect that can control acute graft-versus-host disease in mice. *Acta Haematol.* 2013; 129:197–206.
54. Jang YK, Kim M, Lee Y-H, et al. Optimization of the therapeutic efficacy of human umbilical cord blood-mesenchymal stromal cells in an NSG mouse xenograft model of graft-versus-host disease. *Cytotherapy.* 2014; 16:298–308.
55. Li H, Guo Z, Jiang X, et al. Mesenchymal stem cells alter migratory property of T and dendritic cells to delay the development of murine lethal acute graft-versus-host disease. *Stem Cells.* 2008; 26:2531–2541.
56. Li ZY, Wang CQ, Lu G, Pan XY, Xu KL. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on hematopoietic recovery and acute Graft-Versus-Host Disease in murine allogeneic umbilical cord blood transplantation model. *Cell Biochem Biophys.* 2014; 70:115-122.
57. Nevruz O, Avcu F, Ural AU, et al. Immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells on graft-versus-host disease in rats following allogeneic bone marrow transplantation. *Turkish J. Haematol. Off J Turkish Soc Haematol.* 2013; 30:256–262.
58. Xishan Z, Haojun Y, Baoxin H, et al. Mouse flk-1+sca-1-mesenchymal stem cells: functional plasticity in vitro and immunoregulation in vivo. *Transplantation.* 2014; 97:509–517.
59. Badillo AT, Peranteau WH, Heaton TE, Quinn C, Flake AW. Murine bone marrow derived stromal progenitor cells fail to prevent or treat acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol.* 2008; 141:224–234.
60. Bruck F, Belle L, Lechanteur C, et al. Impact of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on experimental xenogeneic graft-versus-host disease. *Cytotherapy.* 2013; 15:267–279.
61. Min C-K, Kim B-G, Park G, Cho B, Oh I-H. IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 39:637–645.
62. Prigozhina TB, Khitrin S, Elkin G, et al. Mesenchymal stromal cells lose their immunosuppressive potential after allotransplantation. *Exp Hematol.* 2008; 36:1370–1376.
63. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005; 11:389–398.
64. Fang B, Song YP, Liao LM, Han Q, Zhao RC. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant.* 2006; 38:389–390.
65. Müller I, Kordowich S, Holzwarth C, et al. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis.* 2008; 40:25–32.
66. Von Bonin M, Stölzel F, Goedecke A, et al. Treatment of refractory acute GVHD with third-party MSC expanded in platelet lysate-containing medium. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43:245–251.
67. Investor Relations | Osiris Therapeutics Announces Preliminary Results for Prochymal Phase III GvHD Trials. Available at <http://investor.osiris.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=407404>
68. Lucchini G, Intron M, Dander E, et al. Platelet-lysate-expanded mesenchymal stromal cells as a salvage therapy for severe resistant graft-versus-host disease in a pediatric population. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010; 16:1293–1301.
69. Wu K-H, Chan C-K, Tsai C, et al. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2011; 91:1412–1416.
70. Kuzmina LA, Petinati NA, Parovichnikova EN, et al. Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for the Prophylaxis of Acute Graft-versus-Host Disease-A Phase II Study. *Stem Cells Int.* 2012; 2012:968213.

## Ο ρόλος των μεσεγγυματικών στρωματικών κυττάρων στην αναγεννητική ιατρική

Μαρία Γ. Ρουμπελάκη<sup>1</sup>, Νικόλαος Π. Ανάγνου<sup>2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η Αναγεννητική Ιατρική, αποτελεί τον τέταρτο και πολλά υποσχόμενο πυλώνα για την παγκόσμια υγεία και μαζί με την Εμβιομηχανική Ιστών και την Κυτταρική Θεραπεία, αναμένεται να συνεισφέρουν στην παραγωγή νέων προγνωστικών και θεραπευτικών μέσων καθώς και καινοτόμων λύσεων για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών. Τα τελευταία χρόνια, τα μεσεγγυματικά στρωματικά/βλαστικά κύτταρα (MSCs) είναι στο επίκεντρο αυτού του επιστημονικού πεδίου. Τα MSCs αποτελούν μία υποομάδα προγονικών κυττάρων, που εμφανίζουν τη δυνατότητα της διαφοροποίησης σε επιμέρους ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης (όπως οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα) και της *in vivo* αποκατάστασης του ομόλογου ιστού. Παρ' όλο που τα καλύτερα χαρακτηρισμένα MSCs είναι τα προερχόμενα από τον μυελό των οστών (BM), πρόσφατα το ενδιαφέρον έχει στραφεί και σε εναλλακτικές πηγές εμβρυϊκής προέλευσης, όπως το αμνιακό υγρό (AF), ο ομφάλιος λώρος (UC), οι αμνιακές μεμβράνες (AM) και ο πλακούντας. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, αλλά και της δυνατότητας χρήσης τους σε *in vitro* και *in vivo* πειραματικές προσεγγίσεις, τα MSCs φαίνεται να αποτελούν ένα ελκυστικό εργαλείο στο πλαίσιο της Εμβιομηχανικής των Ιστών και της Κυτταρικής Θεραπείας. Στην παρούσα ανασκόπηση γίνεται εκτενής αναφορά στις ιδιότητες αυτών των κυττάρων, στην προέλευσή τους και παρουσιάζονται τα μέχρι τώρα δεδομένα που ενισχύουν την ενδεχόμενη χρήση τους στα πλαίσια της Αναγεννητικής Ιατρικής.

Haema 2016; 7(1): 18-26 Copyright EAE

---

### Αναγεννητική ιατρική

Τα τελευταία χρόνια, εκτός των θεραπειών που βασίζονται σε φαρμακευτικά και βιολογικά προϊόντα ή ιατρικά μηχανήματα<sup>1</sup>, η Αναγεννητική Ιατρική έχει εισέλθει εντυπωσιακά στην κλινική θεραπευτική, και μέσω της Κυτταρικής Θεραπείας αποτελεί τον τέταρτο και πολλά υποσχόμενο πυλώνα για την παγκόσμια υγεία. Η Εμβιομηχανική Κυττάρων και Ιστών, μαζί με την Κυτταρική Θεραπεία και τη χρήση των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων, μπορεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις πολλών σοβαρών ασθενειών και των συναφών προβλημάτων της δημόσιας υγείας<sup>1</sup>. Η διεπιστημονική προσέγγιση διαφορετικών πεδίων όπως η Εμβιομηχανική Ιστών, η Κυτταρική και Μοριακή Βιολογία υπόσχεται να οδηγήσει στη

δημιουργία νέων προγνωστικών και θεραπευτικών μέσων για την αντιμετώπιση σοβαρών ασθενειών<sup>2</sup>.

Το ενδιαφέρον έχει πρόσφατα στραφεί στο πεδίο της Αναγεννητικής Ιατρικής και συγκεκριμένα στη χρήση βλαστικών κυττάρων για την αποκατάσταση της ιστικής βλάβης σε διάφορες νόσους, ιστικές δυσλειτουργίες ή τραυματισμούς<sup>1</sup>. Είναι φανερό πως τα βλαστικά κύτταρα μονοπωλούν το ενδιαφέρον περισσότερο από κάθε άλλο πεδίο στη Βιολογία τα τελευταία χρόνια και αποτελούν σημαντικά εργαλεία στην ανεύρεση δυναμικών θεραπειών με εφαρμογή στα εκφυλιστικά νοσήματα και στην Αναγεννητική Ιατρική.

Η Αναγεννητική Ιατρική έχει εισαγάγει νέες μεθόδους για την αντικατάσταση ή την αναγέννηση κυττάρων, ιστών ή οργάνων που περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων κυτταρική θεραπεία, χρήση βιοϋλικών ή χρήση ικριωμάτων<sup>2</sup>. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται αυτόλογα ή αλλογενή κύτταρα (cell replacement), γενετικά τροποποιημένα κύτταρα (cell based gene therapy), βλαστικά ή πρόδρομα κύτταρα καλλιεργημένα σε ικριώματα (tissue engineering)<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών και

<sup>2</sup>Εργαστήριο Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Μαρία Γ. Ρουμπελάκη, DPhil, Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Μικράς Ασίας 75, 11527 Αθήνα, Τηλ: +30210 7462145, +30-210-6597013, Fax: +30 210 6597545, E-mail: roubel@med.uoa.gr

Η κυτταρική θεραπεία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα καθώς είναι λιγότερο επεμβατική μέθοδος, σχετίζεται με μικρότερα ποσοστά θνητότητας και νοσηρότητας, προκαλεί χαμηλότερη ανοσολογική αντίδραση και επιπλέον δυνητικά μπορεί να αποτελέσει ιδανική θεραπεία αφού δεν απαιτείται να πραγματοποιηθεί ολοκληρωτική αντικατάσταση του οργάνου, αλλά μία μικρή ποσότητα κυττάρων μπορεί να συντελέσει στην ανάκτηση της μεταβολικής λειτουργίας του κατεστραμμένου ιστού<sup>1</sup>. Παρ' όλα αυτά, η επιτυχής εφαρμογή της κυτταρικής θεραπείας εξαρτάται από πολυάριθμους παράγοντες, οι οποίοι σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να μελετούνται λεπτομερώς. Ακόμη απαιτείται (i) εις βάθος μελέτη της βιολογίας των βλαστικών/πρόδρομων κυττάρων, (ii) διαθεσιμότητα καλά καθορισμένων ζωικών προτύπων για προκλινικές μελέτες και (iii) ανάπτυξη της γενετικής τροποποίησης ή γονιδιακής μεταφοράς σε βλαστικά κύτταρα<sup>1</sup>. Επομένως, οι προοπτικές της κυτταρικής θεραπείας στα πλαίσια της Αναγεννητικής Ιατρικής είναι τεράστιες, παρά το ότι υπάρχουν σημαντικά εμπόδια μέχρι στιγμής, τα οποία θα πρέπει να επιλυθούν, πριν μεταφερθεί η τεχνολογία αυτή στην κλινική πράξη.

Στο πλαίσιο αυτό, ένας πολλά υποσχόμενος κυτταρικός τύπος είναι τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (mesenchymal stem/stromal cells - MSCs). Είναι ένας πληθυσμός πολυδύναμων κυττάρων, με δυνατότητα διαφοροποίησης κυρίως σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, που θεωρούνται ένα ιδιαίτερα ελκυστικό εργαλείο για νέες θεραπευτικές προσπελάσεις<sup>4</sup>.

### Μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (MSCs)

Ο όρος «μεσέγχυμα» αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί ο αναπτυσσόμενος χαλαρός συνδετικός ιστός του εμβρύου, ο οποίος προέρχεται κυρίως από το μεσόδερμα και έχει τη δυνατότητα να δίνει γένεση σε κύτταρα του συνδετικού ιστού του ενήλικου. Τα MSCs χαρακτηρίστηκαν για πρώτη φορά από τον Friedenstein και συν. στο μυελό των οστών αρουραίου και απεδείχθη ότι ήταν ικανά να διαφοροποιηθούν αρχικώς σε οστεοκύτταρα<sup>5</sup>. Έκτοτε, MSCs έχουν απομονωθεί και στον άνθρωπο από διάφορους ιστούς κατά τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης, όπως το αμνιακό υγρό, ο ομφάλιος λώρος, το αίμα του ομφάλιου λώρου, ο μυελός των οστών και ο λιπώδης ιστός<sup>6-14</sup>.

Όπως προαναφέρθηκε, τα MSCs αποτελούν υποομάδα προγονικών κυττάρων, έχουν τη δυνατότητα της διαφοροποίησης σε επιμέρους ιστούς της μεσοδερμικής σειράς και της *in vivo* αποκατάστασης του ιστού, τον οποίο δημιουργούν<sup>15</sup>. Πρόσφατα απεδείχθη και η ικανότητα αυτοανανέωσης των κυττάρων αυτών σε *in vivo* πειραματικές προσεγγίσεις<sup>16-18</sup>. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων τους, τα MSCs φαίνεται να αποτελούν ένα ιδιαίτερα χρήσιμο

και πολλά υποσχόμενο εργαλείο στο πλαίσιο της εμβιομηχανικής ιστών και της κυτταρικής θεραπείας<sup>4,15,19-21</sup>.

Με τα σημερινά δεδομένα, ο μυελός των οστών (bone marrow-BM) αποτελεί την πλέον διαδεδομένη πηγή μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα BM-MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί σε ζωικά πρότυπα σήψης, ηπατικής, καρδιακής ή νεφρικής ανεπάρκειας καθώς και σε προκλινικές δοκιμές με αξιοσημείωτα αποτελέσματα<sup>22</sup>. Εντούτοις, ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός εναλλακτικών πηγών αξιοποιήσιμων MSCs είναι μεγάλης σπουδαιότητας. Τελευταίες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε MSCs που προέρχονται από εμβρυϊκές πηγές, όπως το αμνιακό υγρό (amniotic fluid - AF), ο ομφάλιος λώρος (umbilical cord - UC), ο πλακούντας (Placenta - P) ή οι αμνιακές μεμβράνες (amniotic membrane - AM)<sup>14,23,24</sup>.

Οι μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωσή των MSCs βασίζονται στην ικανότητά τους: (α) να προσκολλώνται σε καλλιεργητικές επιφάνειες, (β) να πολλαπλασιάζονται *in vitro* σε βασικό καλλιεργητικό μέσο, (γ) να δημιουργούν αποικίες με ινοβλαστική μορφή και (δ) να έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και χονδροκύτταρα<sup>25</sup>. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί ως προς τον πλήρη χαρακτηρισμό των ετερογενών αυτών πληθυσμών που σχετίζονται με την απουσία ταυτοποιημένων επιφανειακών δεικτών, ειδικών για τα κύτταρα αυτά<sup>26,27</sup>. Τα MSCs είναι ένας διακριτός πληθυσμός από τα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα, καθώς δεν εκφράζουν τα μόρια επιφανείας CD14, CD34, και CD45 (δείκτης των αιμοποιητικών κυττάρων)<sup>28</sup>. Συνεπώς, ο χαρακτηρισμός τους βασίζεται στην έκφραση ενός συνόλου δεικτών όπως το μόριο Stro-1, το οποίο εκφράζεται στα μη αιμοποιητικά στρωματικά κύτταρα του μυελού των οστών<sup>29</sup>, τα αντιγόνα επιφανείας CD105 (ενδογλίνη) και CD73, το μόριο CD166 (ALCAM) καθώς και τα μόρια CD90/Thy-1, CD44 και CD29 (β1-ιντεγκρίνη)<sup>13,30,31</sup>.

### Ενήλικες Πηγές MSCs

Η πιο καλά χαρακτηρισμένη πηγή MSCs είναι ο μυελός των οστών. Όμως, MSCs έχουν απομονωθεί επίσης και από άλλους ενήλικους ιστούς, όπως ο λιπώδης ιστός<sup>32,33</sup>, το τριχωτό της κεφαλής<sup>34</sup>, το δέρμα<sup>35</sup>, ο μυϊκός ιστός<sup>36</sup>, ο συνδετικός ιστός, τα περικύτταρα<sup>37</sup>, η αρθρική μεμβράνη<sup>38</sup>, το περιόστεο<sup>39</sup> και το περιφερικό αίμα<sup>40</sup>. Παρ' όλη τη φαινοτυπική ομοιογένεια, τα κύτταρα αυτά ενδεχομένως να παρουσιάζουν ετερογένεια στην ικανότητα διαφοροποίησης, γεγονός που σχετίζεται με την πηγή προέλευσής τους<sup>30</sup>.

### MSCs του μυελού των οστών (BM-MSCs)

Τα BM-MSCs παρέχουν στρωματική υποστήριξη και κατάλληλο μικροπεριβάλλον για τον πολλαπλασιασμό

και τη διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων, ενώ συγχρόνως δίνουν γένεση στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, των χόνδρων και στα κύτταρα του οστίτη ιστού<sup>41,42</sup>. Τα MSCs αντιπροσωπεύουν ένα μικρό τμήμα (0,001-0,01%) του συνολικού πληθυσμού των εμπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών<sup>20</sup>. Τα ανθρώπινα BM-MSCs απομονώνονται συνήθως από τη στοιβάδα μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών, που προκύπτει μετά από επιστοιβασία δείγματος του μυελού σε φικόλη, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση<sup>43</sup>. Εντούτοις, ένα μείζον πρόβλημα της απομόνωσης των MSCs από το μυελό των οστών είναι το γεγονός ότι ο αριθμός αυτών μειώνεται σημαντικά με την πάροδο της ηλικίας του δότη, ενώ τα κύτταρα που απομονώνονται έχουν περιορισμένο δυναμικό έκπτυξης και διαφοροποίησης και βραχύτερο χρόνο ζωής, σε σχέση με τα MSCs που προέρχονται από εμβρυϊκές πηγές. Επίσης, η διαδικασία λήψης μυελού των οστών είναι αρκετά επίπονη για το δότη, γεγονός που καθιστά επιτακτική την ανάγκη της αναζήτησης νέων εναλλακτικών πηγών MSCs για αυτόλογη ή αλλογενή θεραπευτική χρήση.

### Εμβρυϊκές πηγές MSCs

Τα τελευταία χρόνια τα εμβρυϊκά (fetal) μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (fMSCs), αποτελούν ένα πληθυσμό πολυδύναμων (multipotent) κυττάρων τα οποία έχουν τη δυνατότητα να απομονωθούν και να εκπτυχθούν εύκολα στην καλλιέργεια. Οι μέχρι τώρα *in vivo* και *in vitro* πειραματικές προσεγγίσεις έχουν δείξει ότι τα fMSCs, οντολογικά βρίσκονται ανάμεσα στα εμβρυονικά (ES) και τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα (adult stem cells). Τα εμβρυϊκά μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (fMSCs) έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές όπως το αμνιακό υγρό, ο ομφάλιος λώρος, ο πλακούντας, το αίμα του ομφαλίου λώρου, οι εμβρυϊκές μεμβράνες (άμνιον, χόριον) ή το έλυτρο του Wharton<sup>12</sup>. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα κύτταρα αυτά, ανάλογα με την πηγή προέλευσης, εμφανίζουν την ικανότητα διαφοροποίησης *in vitro* σε οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, λιποκύτταρα, καθώς και σε άλλους τύπους κυττάρων όπως ηπατοκύτταρα, μυϊκά ή νευρικά κύτταρα<sup>12</sup>. Επίσης δεν σχηματίζουν τερατώματα σε *in vivo* ανοσοκατασταλμένα ζωικά μοντέλα και χαρακτηρίζονται από σταθερό καρύοτυπο κατά τις *in vitro* διαδικασίες έκπτυξης και καλλιέργειας. Επιπροσθέτως, εμφανίζουν σημαντική ικανότητα αναγέννησης κατεστραμμένων ιστών, εκκρίνουν παράγοντες ανάπτυξης, κυτοκίνες και άλλα μόρια τα οποία ρυθμίζουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες<sup>12</sup>. Τέλος, σημαντική είναι και η χαμηλή ανοσογονικότητα που παρουσιάζουν, γεγονός που ενισχύει την πιθανή χρήση τους σε πρωτόκολλα κυτταρικής θεραπείας. Αυτά τα ιδιάζοντα χαρακτηριστικά, καθιστούν τα MSCs ένα ελκυστικό

εργαλείο για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών κυτταρικής θεραπείας σε κλινικές εφαρμογές<sup>14</sup>.

Πηγές εμβρυϊκών MSCs αποτελούν:

### Το έλυτρο του Wharton (UC-MSCs)

Πηγή MSCs αποτελεί και το έλυτρο του Wharton (Wharton Jelly- WJ), το οποίο συνιστά το συνδετικό ιστό που περιβάλλεται από τις δύο αρτηρίες και τη μία φλέβα του ομφαλίου λώρου<sup>12,44</sup>. Εκτεταμένες μελέτες έχουν δείξει ότι τα UC-MSCs εκφράζουν τους δείκτες που χαρακτηρίζουν τα MSCs και επιπρόσθετα, εκφράζουν τους δείκτες βλαστικότητας Sox2, Oct4 και Nanog<sup>45</sup>. Τα UC-MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς *in vitro* προς λιποκύτταρα, οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και νευρικά κύτταρα<sup>46-48</sup>.

### Ο πλακούντας (pMSCs)

Η απομόνωση των MSCs του πλακούντα (pMSCs) πραγματοποιείται από τις χοριακές λάχνες μετά από ειδική επεξεργασία<sup>49</sup>. Τα pMSCs εκφράζουν τους MSCs δείκτες και δείκτες πολυδυναμικότητας όπως οι SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-60 και TRA-1-81<sup>50,51</sup>. Επίσης, έχειδειχτεί ότι τα pMSCs εκκρίνουν κυτοκίνες όπως οι IL-1Ra, IL6, IL8, IL10, IL11 και IL15 και ότι παρουσιάζουν την ικανότητα να μεταναστεύουν προσελκυσμένα από χημειοτακτικά μόρια όπως τα SDF-1, PDGF, HGF και MCP-1<sup>49</sup>.

### Η αμνιακή μεμβράνη (AM-MSCs)

Τα MSCs της αμνιακής μεμβράνης προέρχονται από το αμνιακό επιθήλιο και τα αμνιακά μεσεγχυματικά στρώματα, αντίστοιχα<sup>13,44</sup>. Τα AM-MSCs διαθέτουν παρόμοιες ιδιότητες με τα MSCs που προέρχονται από ενήλικες πηγές<sup>52</sup>. Περαιτέρω ανάλυση έδειξε ότι τα AM-MSCs εκτός από τους MSCs δείκτες εκφράζουν και τον δείκτη βλαστικότητας Oct-3/4<sup>13</sup>.

### Το αμνιακό υγρό (AF-MSCs)

Το αμνιακό υγρό αποτελεί μια εναλλακτική εμβρυϊκή πηγή πλούσια σε MSCs. Η συχνότητα των κυττάρων αυτών προσεγγίζει το 0,9 - 1,5% όλων των κυτταρικών πληθυσμών του αμνιακού υγρού<sup>53,54</sup>. Πρόσφατα, από την ερευνητική μας ομάδα και άλλες ομάδες, πραγματοποιήθηκε α) επιτυχής απομόνωση δύο διακριτών AF-MSC πληθυσμών<sup>8,10,54-56</sup>, β) συστηματικός φαινοτυπικός χαρακτηρισμός και εκτίμηση του φάσματος διαφοροποίησης τους<sup>56-58</sup> καθώς και γ) ανάλυση για πρώτη φορά του πρωτεομικού τους προτύπου<sup>56,57</sup>. Τα AF-MSCs εκφράζουν μόρια επιφανείας χαρακτηριστικά των MSCs, δεν εκφράζουν αιμοποιητικούς δείκτες ενώ εκφράζουν τους παράγοντες βλαστικότητας Sox2, Nanog, SSEA-4, Oct-3/4, Klf4 και c-Myc. Τα AF-MSCs είναι πολυδύναμα, με υψηλό ρυθ-



μό πολλαπλασιασμού, ευρύ φάσμα διαφοροποίησης και φυσιολογικό καρύοτυπο μετά από συνεχείς ανακαλλιέργειες<sup>14</sup>. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η ανάλυση και αξιοποίηση του προτύπου έκφρασης των microRNAs όλων των πληθυσμών MSCs με σκοπό την κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης που ρυθμίζουν τις διαδικασίες διαφοροποίησης των κυττάρων αυτών<sup>59</sup>.

### Βασικά κριτήρια για τη χρήση των MSCs στην αναγεννητική ιατρική

Ο αριθμός, οι ιδιότητες, το δυναμικό διαφοροποίησης, ο τρόπος απομόνωσης και έκπτυξης των MSCs προερχόμενων από ενήλικες ή εμβρυϊκές πηγές θα πρέπει να ελέγχονται ενδελεχώς πριν την πιθανή χρήση τους στην αναγεννητική ιατρική<sup>60</sup>. Ο Gimble και συν<sup>60-62</sup> πρότειναν ότι η χρήση των βλαστικών/πρόδρομων κυττάρων στην Κυτταρική Θεραπεία και Αναγεννητική Ιατρική θα πρέπει να ικανοποιεί τα ακόλουθα προαπαιτούμενα.

Τα χρησιμοποιούμενα κύτταρα θα πρέπει:

1. Να είναι διαθέσιμα σε μεγάλο αριθμό ( $10^6$  -  $10^9$  κύτταρα).
2. Να μπορούν να απομονωθούν με τη λιγότερο επίπονη μέθοδο.
3. Να έχουν μεγάλο δυναμικό διαφοροποίησης σε πολλαπλές σειρές.
4. Να μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς σε αυτόλογες ή αλλογενείς μεταμοσχεύσεις.
5. Να είναι η δυνατή η χρήση τους σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες γραμμές ορθής παρασκευαστικής πρακτικής (Good Manufacturing Practice guidelines).

Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται τα μέχρι τώρα αποτελέσματα που σχετίζονται με τη χρήση των MSCs σε διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

### Εμβιομηχανική ιστών

Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε εφαρμογές που στηρίζονται σε μεταμόσχευση βλαστικών ή πρόδρομων κυττάρων μέσω ικρίωμάτων<sup>63</sup>. Τα ικρίωματα, συνήθως κατασκευάζονται από φυσικά ή συνθετικά υλικά με ποικίλες βιοδραστικές και μηχανικές ιδιότητες και παρέχουν το κατάλληλο περιβάλλον για την κυτταρική ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση καθώς και την οργανογένεση. Είναι φανερό πως ο τύπος των κυττάρων μαζί με την επιλογή του κατάλληλου βιοϋλικού είναι θεμελιώδους σημασίας για το αποτέλεσμα της εν λόγω θεραπείας<sup>63</sup>.

Έχουν προταθεί και εφαρμοστεί τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί τρόποι για τη χρήση MSCs σε ικρίωματα. Στην πρώτη μέθοδο τα MSCs προσδένονται στα ικρίωματα *in vitro*, και μετά από μία σύντομη επώαση για να διασφαλιστεί η επιτυχής πρόσδεση, εμφυτεύονται στην

περιοχή της ιστικής βλάβης<sup>64</sup>. Κατά τη δεύτερη μέθοδο, το ικρίωμα με τα κύτταρα επωάζονται σε καλλιεργητικό μέσο που επάγει τη διαφοροποίηση προς συγκεκριμένες κυτταρικές προβαθμίδες (κυρίως πρόδρομα οστεοκύτταρα, χονδροκύτταρα και λιποκύτταρα) και μετά την πάροδο 7-14 ημερών εμφυτεύεται στην προκαθορισμένη θέση βλάβης του ιστού ή οργάνου<sup>22,64</sup>. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μαζί με το ικρίωμα περιλαμβάνονται σε προστατευτικά «καλύμματα» (π.χ. υδρογέλη - hydrogel) επιτρέποντας έτσι την ωρίμανση του ικρίωματος *in vivo*<sup>64</sup>. Οι προσεγγίσεις αυτές έχουν εκτενώς περιγραφεί σε διάφορα ζωικά πρότυπα, πλην όμως η κλινική τους εφαρμογή στον άνθρωπο είναι περιορισμένη και βρίσκεται ακόμη στο στάδιο των προκλινικών μελετών<sup>16,64</sup>.

Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι MSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα μεσοδερμικής προέλευσης, έχει μελετηθεί η καλλιέργεια τους σε ιστοειδικά ικρίωματα και η μετέπειτα εμφύτευσή τους σε περιοχές του προς αποκατάσταση ιστού<sup>64</sup>. Προκλινικές μελέτες σε τρωκτικά, σκύλο και στον άνθρωπο έχουν δείξει πως η χρήση αυτόλογων BM-MSCs τοποθετημένων σε πορώδες κεραμικό φωσφορικού ασβεστίου οδηγεί στην αποκατάσταση καταγμάτων μακρών οστών<sup>64</sup>. Ομοίως, ικρίωματα υαλουρονικού οξέος και πολυμερών που φέρουν BM-MSCs έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση χόνδρου<sup>65</sup>. Ο De Coppi και συν. έδειξαν πως AF-MSCs εμφυτευμένα σε ικρίωμα μπορούν να διαφοροποιηθούν επιτυχώς *in vivo* σε οστεοκύτταρα και να οδηγήσουν στην αποκατάσταση οστού σε ανοσοκατασταλμένο ζωικό πρότυπο (NOD/SCID)<sup>8</sup>.

### Παρακρινής δράση των MSCs

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλος αριθμός μελετών έχει εστιαστεί στην ανάλυση του ρόλου της παρακρινούς δράσης των MSCs<sup>66</sup>. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων για τη μελέτη του εκκριτώματος και την ανάλυση της ταυτότητας των εκκρινόμενων βιοδραστικών παραγόντων των MSCs συλλέγεται καλλιεργητικό μέσο στις 24 ή 48h και εφαρμόζονται μέθοδοι πρωτεομικής, ELISA ή μικροσυστοιχιών<sup>64</sup>. Η ποσότητα και η ποιότητα των βιοδραστικών παραγόντων ποικίλλει από δότη σε δότη και επίσης διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την πηγή απομόνωσης των MSCs.

Αυτά τα αποτελέσματα, ενδεχομένως να οδηγήσουν σε καινοτόμες θεραπευτικές προσπελάσεις, που θα συμβάλουν ενεργά στην αναγέννηση ή την επιδιόρθωση ιστών. Πιο συγκεκριμένα, σε μοντέλο εμφράγματος του μυοκαρδίου σε αρουραίο, η μεταμόσχευση αλλογενών MSCs είχε ευεργετικά αποτελέσματα μέσω παρακρινούς δράσης και οδήγησε στη βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας τέσσερις εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση<sup>67</sup>. Επίσης, η έκθεση ενδοθηλιακών κυττάρων σε

εκκρίωμα των MSCs έδειξε ότι προωθεί τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση τους *in vitro* με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο μέσω του VEGF και bFGF που αποτελούν βασικούς παράγοντες εμπλεκόμενους στη διαδικασία αυτή<sup>67</sup>. Μια πρόσθετη επιβεβαίωση του θεραπευτικού ρόλου του εκκρίωματος των MSCs έχει επίσης αναφερθεί σε προκλινικό μοντέλο οξείας νεφρικής ανεπάρκειας, όπου η μεταμόσχευση κυττάρων οδήγησε σε βελτίωση του φαινοτύπου, μέσω παρακρινικών επιδράσεων που επηρεάζουν τις φλεγμονώδεις, αγγειακές και αποπτωτικές/νεκρωτικές διαδικασίες που σχετίζονται με την ισχαιμική ανεπάρκεια των νεφρών. Δείχθηκε πως τα μεταμοσχευμένα MSCs δεν διαφοροποιούνται σε ώριμα σωληνοειδή ή ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η έκφραση προ-φλεγμονωδών μορίων, όπως IL-1β, TNF-α, IPN-γ μειώθηκε σημαντικά στα νεφρά, με ταυτόχρονη επαγωγή των αντι-φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως IL-10, bFGF, TOP-α, και Bcl-2<sup>68</sup>.

Στο πλαίσιο αυτό, η ερευνητική μας ομάδα έδειξε ότι τα AF-MSCs μπορούν, με τους παράγοντες που εκκρίνουν, να επιταχύνουν την ιστική επιδιόρθωση σε ανοσοκατασταλμένο ζωικό πρότυπο οξείας ηπατικής ανεπάρκειας (ΟΗΑ). Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η παρακρινική δράση των κυττάρων αυτών στη θεραπεία της ΟΗΑ όπου, αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα αυτά εκκρίνουν αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες, όπως είναι η ιντερλευκίνη-10 (IL-10), καθώς και αυξητικούς παράγοντες, που παίζουν ρόλο στην ιστική επιδιόρθωση, γεγονός που συνέβαλε στη βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας<sup>69</sup>. Σε παράλληλη μελέτη, δείξαμε ότι τα AF-MSCs έχουν τη δυνατότητα μέσω εκκρινόμενων βιοδραστικών ουσιών να προωθήσουν την αγγειογένεση *in vivo*<sup>70</sup>.

Είναι επίσης γνωστό ότι το εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον των MSCs είναι πλούσιο σε διαλύματα πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών, καθώς και κυστίδια που περιέχουν πρωτεΐνες, mRNAs, και miRNAs<sup>67</sup>. Πρόσφατες μελέτες προσδιορίζουν την απελευθέρωση των μικροκυστιδίων (microvesicles-MVs) και εξωσωμάτων (exosomes) ως ένα παρακρινή μηχανισμό των MSCs. *In vivo* πειραματικές προσεγγίσεις έδειξαν ότι τα εκκρινόμενα MVs από τα BM-MSCs επιταχύνουν τη μορφολογική και λειτουργική ανάκτηση της οξείας νεφρικής ανεπάρκειας σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια SCID, με επαγωγή του πολλαπλασιασμού των σωληνοειδών κυττάρων, και βοηθούν με τον τρόπο αυτό την επιβίωση των ζώων<sup>71</sup>.

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι το ευεργετικό αποτέλεσμα που παρατηρείται σε προκλινικά μοντέλα καρδιακής ισχαιμίας μετά από μεταμόσχευση MSCs, θα μπορούσε να οφείλεται κυρίως στα εκκρινόμενα MVs<sup>67</sup>. Τα MVs και τα εξωσώματα που εκκρίνονται από MSCs δοκιμάζονται σήμερα σε αρκετά άλλα προκλινικά μοντέλα με βλάβες, όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο, η ηπατική ίνωση, οι ρευματικές παθήσεις, και η οξεία πνευμονική ανεπάρκεια<sup>67</sup>.

## Αναγέννηση μικροπεριβάλλοντος

Η εγγενής εκκριτική δραστηριότητα των MSCs είναι δυνατό να συντελεί στην αναγέννηση του μικροπεριβάλλοντος του ιστού στις περιοχές βλάβης ή τραυματισμού. Αρχικά, η ιδιότητα αυτή των MSCs δοκιμάστηκε στο πλαίσιο της θεραπείας του καρκίνου συγχορηγώντας ανθρώπινα MSCs κατά τη μεταμόσχευση μυελού των οστών σε ασθενείς, που έχουν υποβληθεί σε χημειοθεραπεία/ακτινοβολία με στόχο τη μετανάστευση και τον εποικισμό των MSCs στο στρώμα του μυελού των οστών και την επακόλουθη αναγέννηση αυτού<sup>64</sup>.

Πληθώρα πειραμάτων βασίζονται στη χρήση αλλογενών ή αυτόλογων MSCs με στόχο την αναγέννηση του μικροπεριβάλλοντος των ιστών, μέσω της ενεργοποίησης των ενδογενών βλαστικών ή των πρόδρομων κυττάρων<sup>64</sup>. Εντούτοις, ο λεπτομερής μηχανισμός δράσης των MSCs δεν είναι σαφής.

Από τις αρχές της δεκαετίας, πειραματικές και προκλινικές μελέτες εστιάζονται στην επίδραση των BM-MSCs στην αναγέννηση του καρδιακού ιστού μετά από καρδιακό έμφραγμα/ισχαιμία<sup>72</sup> ή της ισχαιμίας, η οποία αποτελεί απότοκο εγκεφαλικού επεισοδίου<sup>73</sup>. Παράλληλα, MSCs ενηλίκων και εμβρυϊκών πηγών έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγέννηση μηνίσκων και τενόντων και την επούλωση πληγών<sup>64</sup>. Επιπλέον, από την ομάδα μας μελετήθηκε λεπτομερώς ο ενδεχόμενος ρόλος των AF-MSCs στην επούλωση τραυμάτων<sup>31</sup>.

Ο μηχανισμός δράσης, που διέπει όλες αυτές τις περιπτώσεις φαίνεται να είναι ο ίδιος: τα MSCs εκκρίνουν βιοδραστικούς παράγοντες που αναστέλλουν την απόπτωση, ενισχύουν την κυτταρική μετανάστευση, προωθούν την αγγειογένεση, και αυξάνουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των βλαστικών ή προγονικών κυττάρων που βρίσκονται στον ιστό. Το πολύπλοκο αυτό φαινόμενο που προκαλείται από την εκκριτική δραστηριότητα των MSCs αναφέρεται και ως “τροφική δραστηριότητα”<sup>64</sup>.

## Ανοσορρύθμιση

Καλλιεργητικό μέσο προερχόμενο από BM-MSCs ευρισκόμενα σε φάση ανάπτυξης έχει ισχυρές ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες σε δοκιμασία μεικτής λεμφοκυτταρικής αντίδρασης<sup>64</sup>. Αυτή η ανοσορρυθμιστική επίδραση έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των T λεμφοκυττάρων επιδρώντας ανασταλτικά στην παραγωγή του TNF-α και INF-γ και ως εκ τούτου, οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων της IL-10. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα BM-MSCs, παρουσία του φαρμάκου bortezomib, έχουν θεραπευτική δράση σε *in vivo* προκλινικό μοντέλο ρευματοειδούς αρθρίτιδας<sup>74</sup>.

Αν και οι ανοσορρυθμιστικές επιδράσεις των εκκρινόμενων παραγόντων των MSCs δεν έχουν ακόμη τεκμηριωθεί επαρκώς, τα διαθέσιμα μέχρι τώρα δεδομένα

υποστηρίζουν ότι τα αλλογενή MSCs μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες λόγω της χαμηλής ανοσογονικότητάς τους<sup>64</sup>. Σε αυτό το πλαίσιο, η Osiris Therapeutics, Inc. προχώρησε σε κλινικές δοκιμές χρησιμοποιώντας αλλογενή MSCs για τη θεραπεία της νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD) και της νόσου του Crohn<sup>64</sup>. Ανάλογο πλεονέκτημα λόγω χαμηλής ανοσογονικότητας παρουσιάζουν και τα fMSCs<sup>14</sup>. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι τα AF-MSCs εμποδίζουν την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων και επίσης εκκρίνουν παράγοντες με ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση όπως η GRO, η MCP και η IL-6<sup>14</sup>.

## Προοπτικές

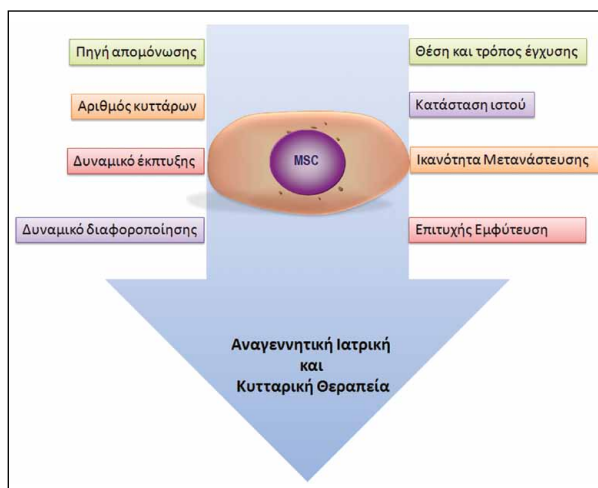
Αν και η λεπτομερής μελέτη των ιδιοτήτων των MSCs συνεχίζεται τα τελευταία 20 χρόνια, μόνον πρόσφατα έχουν τεκμηριωθεί οι δυνατότητες τους για την κλινική χρήση. Οι ιδιότητες των MSCs τα καθιστούν σημαντικά εργαλεία για την αποκατάσταση της βλάβης των ιστών ή για την αναγέννηση και επανόρθωση του μικροπεριβάλλοντος του ιστού. Εντούτοις, παράγοντες όπως η ηλικία του ασθενούς, το μέγεθος της βλάβης, η επάρκεια, η πηγή προέλευσης και ο αριθμός των MSCs παίζουν σημαντικό ρόλο στο θεραπευτικό αποτέλεσμα (Εικόνα 1). Είναι φανερό πως οι μηχανισμοί που διέπουν την ανοσορρύθμιση και την παρακρινή δράση των MSCs είναι διαφορετικοί από εκείνους που συμμετέχουν στη μηχανική των ιστών και την αντικατάσταση οργάνων. Είναι αξιοσημείωτο πως ανάλυση δεδομένων από κλινικές μελέτες σε ασθενείς παγκοσμίως έδειξε πως περισσότερες από 4500 θεραπευτικές προσεγγίσεις βασίζονται στη χρήση θεραπευτικών βλαστικών κυττάρων, εκ των οποίων οι 470 σχετίζονται με MSCs (Clinical Trials.gov, June 2014).

Οι απόψεις στη διεθνή επιστημονική κοινότητα σχετικά με τις θεραπευτικές δυνατότητες των MSCs διίστανται. Πολλοί θεωρούν ότι τα κύτταρα αυτά διαθέτουν ξεχωριστές ιδιότητες που τα καθιστούν χρήσιμα στην κλινική πράξη<sup>22,64,75-77</sup>, ενώ άλλοι προσομοιάζουν τα MSCs απλά με ινοβλάστες<sup>16</sup>. Σε κάθε περίπτωση, το σημερινό επίπε-

δο γνώσεων, τόσο στην Ελλάδα όσο διεθνώς, στο πεδίο των μεσεγχυματικών κυττάρων υστερεί σε ότι αφορά τα παρακάτω σημεία<sup>16</sup>:

- 1) την επαρκή κατανόηση της βασικής βιολογίας των κυττάρων αυτών,
- 2) τον καθορισμό του ακριβούς φαινοτύπου και της μορφολογίας των MSCs,
- 3) τους μηχανισμούς που ελέγχουν την *in vivo* διαφοροποίηση, μετανάστευση και εποικισμό στους διάφορους ιστούς
- 4) την επαρκή έκπτυξη και διαθεσιμότητά τους για τη μελλοντική χρήση στην κλινική πράξη και
- 5) τον μηχανισμό δράσης τους

Πριν είναι εφικτή η κλινική χρήση των MSCs, απαιτείται να απαντηθούν επαρκώς τα ανωτέρω σημεία. Απαραίτητες προϋποθέσεις για το σκοπό αυτό είναι η κατανόηση της βιολογίας των κυττάρων αυτών και η έκπτυξη των κυτταρικών πληθυσμών από γνωστές ή νέες πηγές χρησιμοποιώντας αξιόπιστες και αναπαραγωγίμες *in vitro* και *in vivo* μεθοδολογίες<sup>16</sup>.



**Εικόνα 1.** Παράγοντες που θεωρούνται σημαντικοί για να είναι δυνατή η χρήση των MSCs στην Αναγεννητική Ιατρική και Κυτταρική Θεραπεία.

## Mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine

by Maria G. Roubelakis<sup>1</sup>, Nicholas P. Anagnostou<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece, <sup>2</sup>Cell and Gene Therapy Laboratory, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens, Athens, Greece

**ABSTRACT:** The concept of Regenerative Medicine combined with Cell based Therapy and Tissue Engineering represents the forth pillar of healthcare and provides a promising approach for the treatment of serious diseases. Recently, cell based therapies have been focused on the use of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). Human MSCs represent a mesoderm derived population of progenitors that are

easily expanded in culture. They are capable to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes and exhibit the potential to repair or regenerate damaged tissues. The best characterized source of human MSCs to date is the bone marrow (BM); recently, fetal sources, such as amniotic fluid (AF), umbilical cord (UC), amniotic membranes (AM) or placenta have also attracted increased attention. Thus, MSCs may represent a valuable tool for Tissue Regeneration and Cell Therapy. To this end, the main focus of this review is to summarize and evaluate the key characteristics, the sources and the potential use of MSCs in therapeutic approaches and modalities.

## Βιβλιογραφία

- Mason C, Brindley DA, Culme-Seymour EJ, Davie NL. Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential. *Regen Med.* 2011;6:265-272.
- Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1:179-184.
- Hipp J, Atala A. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev.* 2008;4:3-11.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28:875-884.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17:331-340.
- Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J R Soc Interface.* 2010;7 Suppl 6:S689-706.
- Campagnoli C, Bellantuono I, Kumar S, Fairbairn LJ, Roberts I, Fisk NM. High transduction efficiency of circulating first trimester fetal mesenchymal stem cells: potential targets for in utero ex vivo gene therapy. *BJOG.* 2002;109:952-954.
- De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25:100-106.
- Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, et al. Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells.* 2009;27:1142-1151.
- In ,t Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102:1548-1549.
- Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev.* 2011;19:1449-1470.
- Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* 2009;4:423-433.
- Roubelakis MG, Trohatou O, Anagnou NP. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. *Stem Cells Int.* 2012;2012:107836.
- Trohatou O, Anagnou NP, Roubelakis MG. Human amniotic fluid stem cells as an attractive tool for clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013;8:125-132.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44:215-230.
- Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013;19:35-42.
- Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* 2010;466:829-834.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* 2007;131:324-336.
- Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci STKE.* 2005;2005:pe37.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.
- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105:93-98.
- Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol.* 2013;4:201.
- Roubelakis MG. Therapeutic potential of fetal mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013;8:115-116.
- Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells.* 2014;6:195-202.
- Ferrari M, Corradi A, Lazzaretti M, et al. Adult stem cells: perspectives for therapeutic applications. *Vet Res Commun.* 2007;31 Suppl 1:1-8.
- Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006;5:91-116.
- Buhring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1106:262-271.
- Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol.* 2007;137:491-502.
- Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991;78:55-62.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differ-

- entiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739-2749.
31. in, t Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 2003;88:845-852.
  32. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med*. 2009;4:265-273.
  33. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*. 2007;46:219-228.
  34. Shih DT, Lee DC, Chen SC, et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells*. 2005;23:1012-1020.
  35. Bartsch G, Yoo JJ, De Coppi P, et al. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev*. 2005;14:337-348.
  36. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1998;16:155-162.
  37. Diefenderfer DL, Brighton CT. Microvascular pericytes express aggrecan message which is regulated by BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:172-178.
  38. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44:1928-1942.
  39. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum*. 2001;44:85-95.
  40. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N, et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2004;89:1421-1427.
  41. He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*. 2007;25:69-77.
  42. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol*. 2002;12:502-508.
  43. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3213-3218.
  44. Bitsika V, Vlahou A, Roubelakis MG. Fetal mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013;8:133-143.
  45. Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006;4:8.
  46. Fu YS, Cheng YC, Lin MY, et al. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopaminergic neurons in vitro: potential therapeutic application for Parkinsonism. *Stem Cells*. 2006;24:115-124.
  47. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21:50-60.
  48. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22:1330-1337.
  49. Arnulf B, Lecourt S, Soulier J, et al. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia*. 2007;21:158-163.
  50. Delo DM, De Coppi P, Bartsch G, Jr., Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods Enzymol*. 2006;419:426-438.
  51. Pipino C, Shangaris P, Resca E, et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? *Br Med Bull*. 2013;105:43-68.
  52. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol*. 2007;75:91-96.
  53. Sessarego N, Parodi A, Podesta M, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. *Haematologica*. 2008;93:339-346.
  54. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*. 2004;19:1450-1456.
  55. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod*. 2003;18:1489-1493.
  56. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16:931-952.
  57. Roubelakis MG, Bitsika V, Zagoura D, et al. In vitro and in vivo properties of distinct populations of amniotic fluid mesenchymal progenitor cells. *J Cell Mol Med*. 2010;15:1896-1913.
  58. Zagoura DS, Trohatou O, Bitsika V, et al. AF-MSCs fate can be regulated by culture conditions. *Cell Death Dis*. 2013;4:e571.
  59. Trohatou O, Zagoura D, Bitsika V, et al. Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties. *Stem Cells Transl Med*. 2014;3:54-68.
  60. Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat Rec (Hoboken)*. 2014;297:98-110.
  61. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2003;3:705-713.
  62. Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007;100:1249-1260.
  63. Saffinia L, Datan N, Hohse M, Mantalaris A, Bismarck A. Towards a methodology for the effective surface modification of porous polymer scaffolds. *Biomaterials*. 2005;26:7537-7547.

64. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213:341-347.
65. Solchaga LA, Penick KJ, Welter JF. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. *Methods Mol Biol.* 2011;698:253-278.
66. Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: Insights into the secretome. *Biochim Biophys Acta.* 2013.
67. Bollini S, Gentili C, Tasso R, Cancedda R. The Regenerative Role of the Fetal and Adult Stem Cell Secretome. *J Clin Med.* 2013;2:302-327.
68. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289:F31-42.
69. Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V, et al. Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. *Gut.* 2012;61:894-906.
70. Roubelakis MG, Tsaknakis G, Pappa KI, Anagnou NP, Watt SM. Spindle shaped human mesenchymal stem/stromal cells from amniotic fluid promote neovascularization. *PLoS One.* 2013;8:e54747.
71. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1053-1067.
72. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet.* 2003;362:697-703.
73. Li Y, Chen J, Zhang CL, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia.* 2005;49:407-417.
74. Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, et al. Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in pre-clinical models of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:1733-1740.
75. Fibbe WE, Dazzi F, LeBlanc K. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19:812-813.
76. Phinney DG, Galipeau J, Krampera M, Martin I, Shi Y, Sensebe L. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19:812.
77. Pittenger MF. MSCs: science and trials. *Nat Med.* 2013;19:811.

## Γενετικά τροποποιημένα, με χιμαιρικούς αντιγονικούς υποδοχείς, T-λεμφοκύτταρα στην αντιμετώπιση αιματολογικών κακοηθειών

Παναγιώτης Καλογιαννίδης

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Τα τρέχοντα χημειοθεραπευτικά σχήματα, η μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων αλλά και η υποστηρικτική θεραπευτική αγωγή οδήγησαν σε αξιοσημείωτη βελτίωση στην έκβαση ασθενών με αιματολογικές κακοήθειες. Ωστόσο, θεραπευτικές προσεγγίσεις υψηλής αποτελεσματικότητας και χαμηλής τοξικότητας εξακολουθούν να είναι ένας εξαιρετικά επιθυμητός όσο και προκλητικός στόχος στην αιματολογία και την ογκολογία γενικότερα. Στο πλαίσιο αυτό, οι κυτταρικές θεραπείες έχουν εξαιρετικές δυνατότητες. Η γνώση πως οι εγχύσιες λεμφοκυττάρων του δότη έχουν τη δυνατότητα να εξαλείψουν νόσο που υποτροπίασε μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, αποτέλεσε την απαρχή της ιδέας για παραγωγή κυττάρων με ειδικότητα έναντι κακοήθων κυττάρων. Η γενετική τροποποίηση των T-λεμφοκυττάρων ώστε να εκφράζουν επιπρόσθετα του φυσικού τους υποδοχέα (T cell receptor, TCR) και χιμαιρικό υποδοχέα έναντι αντιγόνων επιφανείας (chimeric antigen receptor, CAR), συνδυάζει την ανεξάρτητη του HLA συστήματος σύνδεση με το αντιγόνο-στόχο και μεταφορά μηνύματος ενεργοποίησης στο τροποποιημένο κύτταρο, αποσκοπώντας σε αποτελεσματική αντινεοπλασματική δράση και σε μακρά διάρκεια παραμονής στον ασθενή. Οι τεχνητά παραγόμενοι CARs ενσωματώνονται στα T-λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος μέσω χρησιμοποίησης συστημάτων μεταφοράς γενετικού υλικού, κυρίως ιικών φορέων. Τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα αντιγόνα επιφανείας είναι κυρίως αυτά που χαρακτηρίζουν κύτταρα B-λεμφοκτικής προέλευσης. Η ανοσοθεραπεία με χορήγηση T-λεμφοκυττάρων εφοδιασμένων με CARs αναπτύσσεται για περίπου δύο δεκαετίες και στο διάστημα αυτό έχει εξελιχθεί από μία καινοτόμο αλλά πολύπλοκη τεχνολογία, σε μία αναδυόμενη εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για αιματολογικές κακοήθειες. Ωστόσο, πολλά θέματα που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια της μεθόδου δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμα πλήρως. Η παρούσα σύντομη ανασκόπηση συνοψίζει την πρόσφατη εξέλιξη σε βιολογικό και κλινικό επίπεδο αλλά και τις μελλοντικές κατευθύνσεις στην πορεία της ευρύτερης κλινικής εφαρμογής των κυτταρικών θεραπειών στην αντιμετώπιση των αιματολογικών κακοηθειών.

Haema 2016; 7(1): 27-36 Copyright EAE

---

### Εισαγωγή

Η ισχυρότερη απόδειξη της σημασίας των ανοσολογικών μηχανισμών στην αντιμετώπιση αιματολογικών κακοηθειών προέρχεται από το πεδίο της μεταμόσχευσης αλλογενών αιμοποιητικών κυττάρων (allogeneic stem cell transplantation, alloHSCT) και την αναγνωρισμέ-

νη δράση των T-λεμφοκυττάρων του μοσχεύματος έναντι κακοήθειας<sup>1</sup>.

Φυσιολογικά, τα T-λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα μέσω του ειδικού αβ-υποδοχέα τους (αβ T-cell receptor, TCR), προκαλούν καταστροφή των κυττάρων-στόχων, ενώ παράλληλα ενισχύουν την κυτταροτοξική δράση ενεργοποιώντας και άλλα στοιχεία του ανοσολογικού συστήματος. Από την άλλη πλευρά, τα κακοήθη κύτταρα εμποδίζουν έως και καταργούν τη δράση των κυτταροτοξικών κυττάρων είτε μέσω μείωσης της έκφρασης των ειδικών καρκινικών αντιγόνων τους είτε μέσω επαγωγής μηχανισμών που καταστέλλουν την κυτ-

---

Αιματολογική Κλινική, Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού Οστών, Μονάδα Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας, Νοσ. «Γ. Παπανικολάου», Θεσσαλονίκη

Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Παναγιώτης Καλογιαννίδης, E-mail: pkaloyannidis@yahoo.gr

ταροτοξική λειτουργία.

Η βασική επιδίωξη για την αντιμετώπιση αιματολογικών κακοηθειών αλλά και του καρκίνου γενικότερα, μέσω ειδικών, ανοσολογικού τύπου θεραπειών (όπως είναι οι κυτταρικές θεραπείες), είναι η δημιουργία εξειδικευμένων προϊόντων που συγκρινόμενα με τη συμβατική χημειοθεραπεία θα έχουν την ελάχιστη τοξικότητα αποδίδοντας παράλληλα τη μέγιστη αποτελεσματικότητα.

## Γενετικά τροποποιημένα κύτταρα

Με στόχο να ενισχυθεί η δράση των T-κυττάρων έναντι των κακοήθων κυττάρων διερευνώνται μέθοδοι γονιδιακής τροποποίησης των φυσικών TCR ή και ενσωμάτωσης ειδικών TCR για αντιγόνα κακοήθων κυττάρων, όμως τα αποτελέσματα δεν είναι προς το παρόν τα αναμενόμενα ώστε να ενταχθούν σε ευρεία κλινική εφαρμογή<sup>2,3</sup>.

Εναλλακτική θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων T-λεμφοκυττάρων που θα εκφράζουν επιπλέον του φυσικού TCR και χιμαιρικό υποδοχέα (chimeric antigen receptor, CAR) που αναγνωρίζει αντιγόνα υδατανθρακικής ή γλυκολιπιδιακής προέλευσης, που εκφράζονται στην επιφάνεια των κακοήθων κυττάρων, διευρύνοντας έτσι τη δεξαμενή των πιθανών αντιγόνων-στόχων<sup>4</sup>.

Θεραπείες που βασίζονται στη χορήγηση γενετικά τροποποιημένων ειδικών CAR/T-λεμφοκυττάρων (CAR/T-cells) αποτελούν ένα ταχέως εξελισσόμενο τομέα των εξειδικευμένων θεραπειών αλλά και της ανοσοθεραπείας γενικότερα, επιδεικνύοντας σε πολλές μελέτες φάσης I-II αξιολογούμενη αποτελεσματικότητα χωρίς σημαντική τοξικότητα.

## Σχεδιασμός του χιμαιρικού υποδοχέα

Τα γενετικά τροποποιημένα T-λεμφοκύτταρα ώστε να εκφράζουν CARs συνδυάζουν την ιδιότητα των μονοκλωνικών αντισωμάτων να αναγνωρίζουν και να συνδέονται με το αντιγόνο-στόχο, με την κυτταροτοξική ικανότητα καθώς και την ικανότητα αυτοανανέωσης των T-λεμφοκυττάρων παρέχοντας έτσι πρόσθετα πλεονεκτήματα έναντι των φυσικών T-λεμφοκυττάρων<sup>5</sup>.

Ο σχεδιασμός των σύγχρονων CARs ξεκίνησε, από τους Eshag και συν. προ 20-ετίας<sup>4</sup>. Στο βασικό σχεδιασμό αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα που προσφέρει τη θέση αναγνώρισης και σύνδεσης με το επιθυμητό αντιγόνο επιφάνειας το οποίο προέρχεται από τις μεταβλητές περιοχές της βαρείας και ελαφράς αλυσίδας ενός μονοκλωνικού αντισώματος (monoclonal antibody, Mab) που συνδέονται μεταξύ τους με ένα μικρό συνθετικό πεπτιδίο (single chain variable fragment, scFv), ένα διαμεμβρανικό και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που θα σηματοδοτήσει την ενεργοποίηση και την κυτταροτοξική λειτουργία του

γενετικά τροποποιημένου T-λεμφοκυττάρου. Επιπλέον, το εξωκυττάριο και διαμεμβρανικό τμήμα συνδέονται με εύκαμπτη συνδεσμική περιοχή (Εικόνα 1Α).

## Το εξωκυττάριο τμήμα

Το scFv τμήμα είναι αυτό που καθορίζει την ειδικότητα του CAR<sup>6,7</sup>. Ιδανικά μόρια-στόχοι είναι εκείνα που εκφράζονται μόνο σε κακοήθη κύτταρα ή σε κύτταρα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη των κακοήθων κυττάρων. Στην περίπτωση αιματολογικών κακοηθειών, αντιγόνα επιφάνειας ειδικά κυτταρικής σειράς, είναι αυτά που κατά κύριο λόγο αποτελούν μόρια-στόχους των CARs. Τα ειδικά της λεμφικής σειράς αντιγόνα επιφάνειας, CD19 και CD20, αν και εκφράζονται τόσο σε κακοήθη όσο και σε υγιή κύτταρα, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε κλινικές εφαρμογές κυτταρικής θεραπείας με CAR/T-cells.

## Το τμήμα σύνδεσης εξωκυττάρου και διαμεμβρανικού τμήματος

Στον αρχικό σχεδιασμό το τμήμα αυτό εξυπηρετούσε μόνο τη σύνδεση του εξωκυττάρου με το διαμεμβρανικό τμήμα. Ωστόσο, αν και τα αποτελέσματα μελετών είναι αντικρουόμενα, φάνηκε ότι το μήκος του τμήματος σύνδεσης του εξωκυττάρου και διαμεμβρανικού τμήματος συμβάλλει στη λειτουργικότητα και αποτελεσματικότητα του CAR/T-cell<sup>7,8</sup>.

## Το διαμεμβρανικό τμήμα

Το διαμεμβρανικό τμήμα συνήθως προέρχεται από μέρη των CD3-ζ, CD4, CD8 ή CD28 μορίων. Όπως και το προηγούμενο τμήμα, αρχικά σχεδιάστηκε ως συνδετικό μέσο, όμως υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως και το διαμεμβρανικό τμήμα επηρεάζει τη δραστηριότητα του CAR/T-cell. Οι αρχικοί CAR που είχαν ως διαμεμβρανικό τμήμα προερχόμενο από το CD3-ζ μόριο αποδείχθηκαν λιγότερο σταθεροί από αυτούς που είχαν διαμεμβρανικό τμήμα προερχόμενο από το CD28 μόριο<sup>9</sup>.

## Το ενδοκυττάριο τμήμα

Το ενδοκυττάριο τμήμα είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του T-κυττάρου μετά την αναγνώριση και σύνδεση του αντιγόνου στόχου με το scFv. Αρχικά, η ενεργοποίηση του CAR/T-cell βασίζονταν στη σηματοδότηση ενός μόνο μονοπατιού είτε του εξαρτώμενου από το CD3-ζ μόριο του συμπλέγματος του φυσικού TCR υποδοχέα είτε του Fc υποδοχέα της IgE-γ αλυσίδας (CAR 1<sup>nc</sup> γενιάς)<sup>10</sup>. Σε φυσιολογικές συνθήκες, η ολοκληρωμένη και αποτελεσματική λειτουργία των T-cells απαιτεί, μετά την σύνδεση



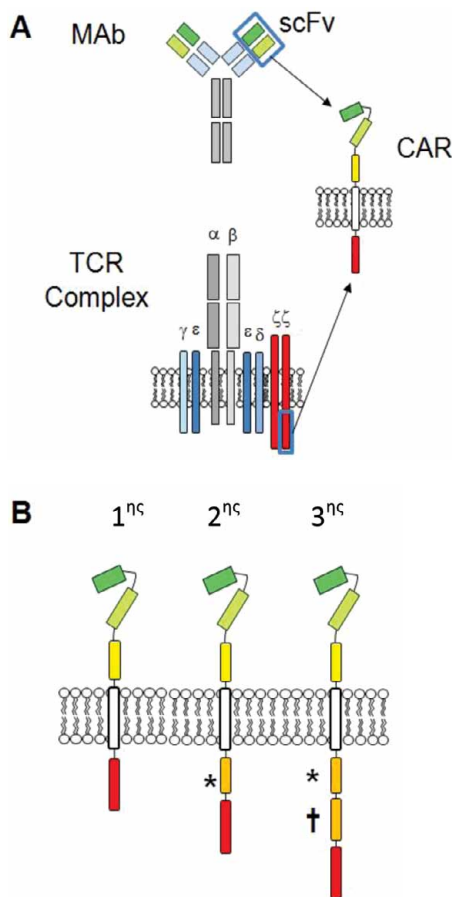
με τον αντιγονικό στόχο, την ενεργοποίηση των συνδεδεμένων μονοπατιών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σύνδεσης των μορίων (π.χ. CD80, CD86) που εδράζονται στη μεμβράνη επιφάνειας του κακοήθους κυττάρου και των υποδοχέων τους (π.χ. CD28) που εδράζονται στην μεμβράνη των T-cells<sup>11</sup>. Σε απουσία ενεργοποίησης αυτού του μονοπατιού, επέρχεται “αν-ενέργεια” των T-cells με τελικό αποτέλεσμα την επαγωγή συνθηκών ανοσολογικής ανοχής. Τα κακοήθη κύτταρα με στόχο να αποφύγουν την κυτταροτοξική δράση των T-cells και να επάγουν την “ανοσολογική αν-ενέργεια” μειώνουν ή και καταργούν την έκφραση των συνδεδεμένων μορίων<sup>12</sup>. Στην πορεία της κλινικής εφαρμογής θεραπειών με CAR/T-cells αποδείχθηκε πως η ενσωμάτωση ενός ή ακόμα και δύο συνδεδεμένων μορίων όπως των CD28, CD134, CD137, CD27 που θα ενεργοποιούνται άμεσα μετά τη σύνδεση με το αντιγόνο στόχο, αυξάνει την αποτελεσματικότητα και επιβίωση των συγκεκριμένων CAR/T-cells (CARs 2<sup>ης</sup> ή

3<sup>ης</sup> γενεάς), με αποτέλεσμα η συγκεκριμένη μέθοδος δημιουργίας CAR να θεωρείται επί του παρόντος η πλέον αποδεκτή<sup>9,13-17</sup> (Εικόνα 1B).

### Μέθοδοι γενετικής τροποποίησης των λεμφοκυττάρων

Τα DNA πλασμίδια που μεταφέρουν την πληροφορία έκφρασης CAR μπορεί να ενσωματωθούν στο γενετικό υλικό του κυττάρου στόχου μετά από εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου (electroporation ή nucleoporation). Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ο χαμηλός βαθμός διαμόλυνσης που απαιτεί μεγάλο χρόνο *ex-vivo* καλλιέργειας των κυττάρων για να παραχθεί ικανοποιητικός αριθμός για κλινική χρήση, με αποτέλεσμα την “κυτταρική εξουθένωση” και άρα την πλημμελή λειτουργικότητα των T-λεμφοκυττάρων<sup>18</sup>.

Η γονιδιακή μεταφορά μπορεί επίσης να γίνει μέσω ιικών φορέων όπως οι γ-ρετροϊοί (gamma retroviral vectors). Αν και είναι περισσότερο αποδοτική μέθοδος αναφορικά με την ικανότητα διαμόλυνσης, υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης μεταλλαξιογένεσης λόγω ενσωμάτωσης του φορέα στη γειτονία ογκογονιδίων (insertional mutagenesis). Οι λεντιϊοί αποτελούν την άλλη μεγάλη οικογένεια ιών που δοκιμάστηκαν ως “οχήματα μεταφοράς” γονιδίων στο γενετικό υλικό των T-λεμφοκυττάρων και διαθέτουν το πλεονέκτημα της γενετικής τροποποίησης και κυττάρων εν ηρεμία, ιδιότητα που ελλείπει από τους γ-ρετροϊούς, καθώς και ασφαλέστερο προφίλ θέσεων ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα<sup>19-21</sup>.



**Εικόνα 1. Α:** Σχεδιασμός και βασικά μέρη του CAR. **Β:** CAR 1<sup>ης</sup> γενεάς (χωρίς ενσωματωμένο συνδεδεμένο μορίο), CAR 2<sup>ης</sup> γενεάς (με ενσωμάτωση ενός συνδεδεμένου μορίου), CAR 3<sup>ης</sup> γενεάς (με ενσωμάτωση δύο συνδεδεμένων μορίων). \*, †: συνδεδεμένα μόρια (π.χ., CD28/CD86 & CD80, CD134/OX40, CD137/4-1BB).

### Ο ρόλος της χορήγησης χημειοθεραπείας πριν την χορήγηση λεμφοκυττάρων

Η χορήγηση χημειοθεραπευτικών-λεμφολυτικών παραγόντων πριν την έγχυση των CAR/T-cells βελτιώνει την έκπτυξη, παραμονή και την δραστηριότητά τους. Αυτά τα οφέλη είναι αποτέλεσμα της ελάττωσης των Tregs, της ελάττωσης της μάζας των κακοήθων κυττάρων και της αυξημένης παραγωγής κυτταροκινών (π.χ. IL-7 και IL-15) που ευνοούν την *in vivo* έκπτυξη των λεμφοκυττάρων<sup>22,23</sup>.

### Τρέχουσα κλινική εμπειρία

Όπως προαναφέρθηκε, στην πλειοψηφία των μελετών τα αντιγόνα-στόχοι ήταν το CD19 και CD20 και συνεπώς η μεγαλύτερη εμπειρία προέρχεται από την αντιμετώπιση λεμφικών κακοηθειών, B-κυτταρικής αρχής. Πρέπει όμως να σημειωθεί πως οι μελέτες είναι φάσης I-II, με μικρό αριθμό ασθενών και με ετερογενή χαρακτηριστικά όσον αφορά τα νοσήματα, τον αριθμό των εγχυθέντων κυττάρων, το είδος της προηγηθείσας θεραπείας, τα χηρ-

σιμοποιηθέντα συνδιεγερτικά μόρια και τον τρόπο διαμόλυνσης των κυττάρων.

### 1<sup>η</sup> γενεάς CARs

Οι πρώτες κλινικές μελέτες διενεργήθηκαν με 1<sup>η</sup> γενεάς CARs και αν και στις περισσότερες από αυτές η έγχυση συνδυάστηκε και με προηγηθείσα χημειοθεραπεία, με στόχο τη μείωση του φορτίου της κακοήθειας αλλά και τη μείωση των T-ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων (Tregs), τα αποτελέσματα ήταν γενικά μη ικανοποιητικά, καθώς επιτεύχθηκε μειωμένη έκπτωση και παροδική μόνο παραμονή των CAR/T-cells. Σε δύο μελέτες σε ασθενείς με λεμφικές κακοήθειες που χορηγήθηκε επαρκής αριθμός CAR/T-cells 1<sup>η</sup> γενεάς, η επιβίωση των τροποποιημένων κυττάρων δεν διήρκεσε πάνω από 3 εβδομάδες<sup>24,25</sup>.

### 2<sup>η</sup> γενεάς CARs

Τα περισσότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί με CARs 2<sup>η</sup> γενεάς, καθώς εκτός της άμεσης κυτταροτοξικότητας βελτιώθηκε τόσο η έκπτωση όσο και η διάρκεια ζωής των CAR/T-cells.

Ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τη χρήση των 2<sup>η</sup> γενεάς CAR/T-cells δημοσιεύτηκαν από την ομάδα του πανεπιστήμιου της Pennsylvania. Σε 3 ασθενείς με πολυ-χημειοανθεκτική CLL χορηγήθηκαν 2<sup>η</sup> γενεάς CAR/T-cells μετά από χορήγηση Endoxan και Pentostatin ή Bendamustin. Όλοι παρουσίασαν ύφεση της νόσου (2 πλήρη, 1 μερική), ο ένας δε, εμφάνισε και σύνδρομο λύσης. Τα γονιδιακά τροποποιημένα κύτταρα εκπύχθηκαν >1000 φορές και συνέχισαν να ανιχνεύονται σε υψηλό αριθμό για διάστημα άνω των 6 μηνών και μάλιστα σε ιστούς εκτός του περιφερικού αίματος, όπως ο μυελός των οστών. Οι συγγραφείς υπολόγισαν πως κάθε γονιδιακά τροποποιημένο κύτταρο κατέστρεψε άνω των 1000 κακοήθων κυττάρων<sup>26</sup>.

Πιο πρόσφατα, σε μελέτη των Kochenderfer και συν. 8 ασθενείς με χημειοανθεκτική νόσο (B-NHL ή CLL) αντιμετωπίστηκαν με συγχορήγηση 2<sup>η</sup> γενεάς CAR/T-cells και χημειοθεραπείας. Οι 7/8 πέτυχαν ύφεση της νόσου (1 πλήρη, 6 μερική) και διαπιστώθηκε παραμονή των εγχυθέντων κυττάρων για 6-18 μήνες<sup>22</sup>.

Με στόχο την αντιμετώπιση περισσότερο επιθετικών αιματολογικών κακοηθειών όπως είναι η οξεία λευχαιμία, διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα αλλά και η τοξικότητα της χορήγησης CAR/T-cells ειδικών έναντι του CD19 μορίου, σε 2 παιδιατρικούς ασθενείς που έπασχαν από ανθεκτική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία. Ο ένας είχε προηγουμένως υποβληθεί και σε alloHSCT. Η χορήγηση των CAR/T-cells είχε σαν αποτέλεσμα την επίτευξη πλήρους ύφεσης και στους δύο ασθενείς. Στον ένα διατηρείται για διάστημα πέραν των 12 μηνών, ενώ στον

δεύτερο η νόσος υποτροπίασε 2 μήνες αργότερα, όμως ο κακοήθης κλώνος δεν εξέφραζε το αντιγόνο CD19 και συνεπώς τα κακοήθη κύτταρα δεν ήταν πλέον “αναγνωρίσιμα” από τα CAR/T-cells. Η τοξικότητα ήταν αποδεκτή, με σημαντικότερη ανεπιθύμητη ενέργεια την εμφάνιση του συνδρόμου της συστηματικής φλεγμονώδους απάντησης (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) ή “καταιγίδας κυτταροκινών”, που αντιμετωπίστηκε επιτυχώς με τη χορήγηση κατάλληλης αγωγής<sup>27</sup>. Πρόσφατα, ερευνητές από το Memorial Sloan-Kettering Cancer Center δημοσίευσαν αποτελέσματα της μεγαλύτερης μέχρι σήμερα αξιολογηθείσας σειράς ασθενών (16 ασθενείς, σε 4 είχε προηγηθεί allo HSCT) που έπασχαν από ανθεκτική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία και έλαβαν αυτόλογα CAR/T-cells ειδικά έναντι του CD19 μορίου. Το ποσοστό συνολικής ανταπόκρισης ήταν 88%, ενώ ιδιαίτερα υψηλό ήταν και το ποσοστό μοριακής ύφεσης (75%). Είναι αξιοσημείωτο πως η χορήγηση των CAR/T-cells λειτούργησε σαν “γέφυρα” ώστε 12 ασθενείς που δεν ήταν υποψήφιοι για alloHSCT λόγω ιδιαίτερα ανθεκτικής νόσου, τελικά να αποκτήσουν τη δυνατότητα να υποβληθούν σε alloHSCT. Και σ’ αυτή τη μελέτη η σημαντικότερη επιπλοκή ήταν η εμφάνιση SIRS ενώ στους 4 ασθενείς που είχε προηγηθεί alloHSCT, η χορήγηση των CAR/T-cells δεν συνοδεύτηκε από εμφάνιση νόσου του μοσχεύματος κατά του ξενιστή<sup>28</sup>.

Συγκριτική μελέτη μεταξύ 1<sup>η</sup> vs. 2<sup>η</sup> γενεάς CAR/T-cells από την ομάδα του Baylor College of Medicine (BCM) με 6 ασθενείς, κατέδειξε πως τα 2<sup>η</sup> γενεάς CAR/T-cells εμφάνισαν καλύτερη έκπτωση, μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και ήταν δυνατή η επανέκπτυσή τους μετά από διέγερση του φυσικού τους TCR<sup>9</sup>.

### 3<sup>η</sup> γενεάς CARs

Από την ομάδα του Seattle δημοσιεύθηκαν αποτελέσματα πιλοτικής μελέτης φάσης I με 3<sup>η</sup> γενεάς CAR/T-cells. Τέσσερις ασθενείς με B-λεμφικές κακοήθειες έλαβαν τα ειδικά τροποποιημένα κύτταρα, οι 3 μετά από χορήγηση Endoxan. Δύο ασθενείς χωρίς μετρήσιμη νόσο προ της έγχυσης λεμφοκυττάρων, παραμένουν χωρίς νόσο για 12 και 24 μήνες. Ένας ασθενής πέτυχε ύφεση που διήρκεσε 12 μήνες και ένας δεν απάντησε στη χορήγηση. Για τους 3 ασθενείς που είχαν κλινικό όφελος τα γενετικά τροποποιημένα λεμφοκύτταρα ανιχνεύονταν για 9-12 μήνες μετά την έγχυση<sup>29</sup>.

### Εναλλακτικά μόρια-στόχοι και προέλευση των κυττάρων

Το αντιγόνο επιφανείας CD30 αποτέλεσε επίσης μόριο-στόχο για CAR/T-cells. Το μόριο CD30 εκφράζεται κυρίως σε λεμφώματα Hodgkin αλλά και σε κάποιους

υποτύπους Non Hodgkin λεμφωμάτων. Δεδομένων των κλινικών ανταποκρίσεων που διαπιστώθηκαν μετά από τη χορήγηση του μονοκλωνικού αντισώματος anti CD30 αλλά και των ενθαρρυντικών προκλινικών αποτελεσμάτων, κλινικές μελέτες είναι σε εξέλιξη<sup>5,30</sup>.

Στις προαναφερθείσες μελέτες, τα T-λεμφοκύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για κλινική χρήση προέρχονταν από τους ίδιους τους ασθενείς (αυτόλογα T-Cells). Μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι αυτή των Kochenderfer και συν. που χορήγησαν κύτταρα του δότη γενετικά τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν CAR 2<sup>nc</sup> γενεάς για το CD19, σε 10 ασθενείς με B-κυτταρικής αρχής αιματολογικές κακοήθειες που παρουσίασαν ανθεκτική νόσο μετά από προηγηθείσα alloHSCT αλλά και εγχύσεις λεμφοκυττάρων του δότη (Donor lymphocyte infusions, DLIs). Στους ασθενείς δεν χορηγήθηκε καμμία θεραπεία πριν την έγχυση των CAR/T-cells. Έπειτα από διάμεση περίοδο 30 ημερών διαπιστώθηκε σημαντική κλινική απάντηση της νόσου σε 3/10 ασθενείς (1 σταθερή πλήρη ύφεση και 1 σταθερή μερική ύφεση) ενώ η νόσος παρέμεινε σταθερή σε πέντε. Στους ασθενείς που παρουσίασαν απάντηση ή νόσος παρέμεινε σταθερή, τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ανιχνεύονταν για διάστημα άνω 4 εβδομάδων. Οι ανεπιθύμητες αντιδράσεις ήταν καλά ελεγχόμενες και αφορούσαν αύξηση θερμοκρασίας, ήπια πτώση της πίεσης και κόπωση<sup>31</sup>.

Αντίθετα με τις λεμφικές κακοήθειες, λιγότερη εμπειρία υπάρχει για τις μυελοειδείς αιματολογικές κακοήθειες αν και σε προκλινικές μελέτες φάνηκε πως ειδικά CAR/T-cells είναι δυνατόν να επιδείξουν ισχυρή κυτταροτοξική δράση έναντι μυελικής προέλευσης κακοήθων κυττάρων. Δημοσιευμένα αποτελέσματα υπάρχουν από μία μελέτη με CAR/T-cells έναντι του Lewis-Y αντιγόνου. Σε τέσσερις ασθενείς χορηγήθηκαν τροποποιημένα T-cells μετά από προηγηθείσα χημειοθεραπεία που συνοδεύτηκαν από παροδικές απαντήσεις σε 3 ασθενείς χωρίς άμεση τοξικότητα. Τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα παρέμειναν ανιχνεύσιμα για τουλάχιστον 4 μήνες<sup>32</sup>. Ειδικά CAR/T-cells για το CD123 και CD33 αντιγόνο έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικά μοντέλα<sup>33</sup>. Ειδικά για το CD33 υπάρχουν ενστάσεις για το κατά πόσον είναι το ιδανικό αντιγόνο-στόχος καθώς είναι πανμυελικός δείκτης, και η χορήγηση των ειδικών T-λεμφοκυττάρων θα μπορούσε να οδηγήσει σε παρατεταμένη μυελική απλασία.

## Ο δρόμος προς την ευρεία κλινική εφαρμογή

Αν και ειδικά CAR/T-cells είναι διαθέσιμα προς κλινική εφαρμογή από εικοσαετίας και πλέον, εν τούτοις, αποδείχθηκε πως ήταν δύσκολο να αναπτυχθούν σε τέτοιο βαθμό ώστε να αποτελέσουν θεραπευτική επιλογή, εκτός θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Εκτός του προφανούς περιορισμού που πηγάζει από την ύπαρξη υψηλά

εξειδικευμένου κέντρου καθώς και επιστημονικού προσωπικού ικανού να παράγει CAR/T-cells, προκύπτουν και άλλα θέματα που πρέπει να απαντηθούν στο επόμενο διάστημα, ώστε οι κυτταρικές θεραπείες να αποτελέσουν εναλλακτική ή ακόμη και την πρώτη θεραπευτική επιλογή στην καθ'ημέρα κλινική πράξη.

## Θέματα προς επίλυση

### Ποιος ο βέλτιστος υποπληθυσμός T-λεμφοκυττάρων για γονιδιακή τροποποίηση;

Ο ιδεώδης υποπληθυσμός T-λεμφοκυττάρων, υποψήφιος προς διαμόλυνση, θα πρέπει να πληροί κάποια ελάχιστα χαρακτηριστικά: ικανότητα μετανάστευσης σε περιοχές που εδράζονται τα κακοήθη κύτταρα-στόχοι, απάντηση στα συνδιεγερτικά μηνύματα ώστε να ασκούν την μέγιστη κυτταροτοξική δράση και να εκπύσσονται, και μακρά διάρκεια ζωής<sup>5</sup>.

Τα τελικής διαφοροποίησης κυτταροτοξικά T-cells (effector T-cells, Teff) είναι αυτά που κατά κύριο λόγο ασκούν τη δράση έναντι των κακοήθων κυττάρων αλλά η μικρή πολλαπλασιαστική τους ικανότητα και συνεπώς η μικρή διάρκεια παραμονής τους in vivo, τα καθιστά λιγότερο ικανά στο να αποτελέσουν την καλύτερη ομάδα T-κυττάρων για γενετική τροποποίηση. Οι έρευνες εστιάζονται κυρίως στη χρήση περισσότερο αδιαφοροποιητών κυττάρων, όπως τα κύτταρα μνήμης (memory cells, Tm), δηλαδή κύτταρα που έχουν έρθει σε επαφή με κοινά αντιγόνα (πχ συνήθων ιών) και συνεπώς μπορούν μελλοντικά να εκπτυχθούν γρήγορα σε εκ νέου επαφή του φυσικού TCR με το αντιγόνο και έχουν μακρά διάρκεια ζωής. Η ομάδα του Seattle διενεργεί κλινική μελέτη με θετικά επιλεγμένα Tm που τροποποιήθηκαν γονιδιακά ώστε να εκφράζουν CAR<sup>34,5</sup>. Πρόσφατα έχει ταυτοποιηθεί υποπληθυσμός λεμφοκυττάρων που έχουν τα χαρακτηριστικά τόσο του αρχέγονου όσο και του “έμπειρου” T-cell (CD435RA+, CD62L+, CCR7+). Εφόσον επιβεβαιωθούν οι μεγάλες δυνατότητες πολλαπλασιασμού αλλά και διαφοροποίησης σε Tm και Teff κύτταρα, θα μπορούσε ο συγκεκριμένος υποπληθυσμός να αποτελέσει την ομάδα στόχο των T-cells για γονιδιακή τροποποίηση<sup>35</sup>.

### Βελτίωση της συνδιέγερσης αξιοποιώντας τον φυσικό TCR

Η ενεργοποίηση των βιολογικών μονοπατιών συνδιέγερσης, όπως ήδη αναφέρθηκε, αποτελεί βασική προϋπόθεση για την έκπτυξη, τη μακρά παραμονή και τελικά την αποτελεσματικότητα των T-cells.

Η ενσωμάτωση των συνδιεγερτικών μορίων (CD28, CD134, CD137 ή CD27) στον CAR δεν αποτελεί φυσιολογική παραλλαγή της λειτουργίας των T-cells και συνεπώς

μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την λειτουργία των γονιδιακά τροποποιημένων CAR/T-cell (πχ πρώιμος κυτταρικός θάνατος λόγω έντονης ενεργοποίησης ή αυξημένη τοξικότητα λόγω υπερβολικής παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών)<sup>5</sup>.

Μια ιδιαίτερα ελκυστική εναλλακτική προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η χρησιμοποίηση για γονιδιακή τροποποίηση ειδικών έναντι ιών, T-λεμφοκυττάρων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση η σηματοδότηση της συνδιέγερσης του CAR/T-cell θα γίνεται μέσω του φυσικού TCR υποδοχέα που έχει ήδη εκπαιδευτεί μέσω φυσικής οδού, να αναγνωρίζει ιικά αντιγόνα. Κατ' ακολουθία, ειδικά T-cells έναντι των συνήθων ιών (π.χ. ειδικά για Epstein Bar, cytomegalovirus) που είναι γενετικά τροποποιημένα να εκφράζουν CARs, μπορούν να εκτύσσονται όταν έρχονται σε επαφή με αντιγόνα ιών που είναι σε λανθάνουσα κατάσταση, εξασφαλίζοντας έτσι την απαιτούμενη συνδιέγερση και τη μακρά διάρκεια παραμονής των Tm και Teff στον ασθενή.

Η ομάδα από το BCM διερεύνησε την τακτική γονιδιακής τροποποίησης ειδικών για τον EBV T-λεμφοκυττάρων, ώστε να εκφράζουν και CARs 1<sup>ns</sup> ή 2<sup>ns</sup> γενεάς έναντι του CD20, σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε alloHST για χημειοανθεκτικές B-λεμφικές κακοήθειες. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε πολλούς είχε χορηγηθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-CD20. Καθώς τα γονιδιακά τροποποιηθέντα κύτταρα προέρχονταν από τους ασθενείς, το μείζον πρόβλημα που αντιμετώπισαν οι ερευνητές ήταν η μικρή διάρκεια παραμονή των CAR/T-cells, προφανώς διότι οι προηγηθείσες θεραπείες και ιδιαίτερα η χορήγηση του anti-CD20 επηρέασε τη λειτουργία τους<sup>36</sup>. Με στόχο να ξεπεραστεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν για γονιδιακή τροποποίηση λεμφοκύτταρα των υγιών δοτών εφόσον ήταν οροθετικοί στον EBV. Σε μελέτη φάσης -1 χορηγήθηκαν αλλογενή EBV-ειδικά CAR/T-cells σε οκτώ ασθενείς, δεν διαπιστώθηκε σοβαρού βαθμού τοξικότητα (συμπεριλαμβανομένης και της GvHD) ωστόσο, εμφανής κλινική απάντηση διαπιστώθηκε μόνο σε 2/6 ασθενείς με μετρήσιμη νόσο<sup>37</sup>. Η ίδια ομάδα χρησιμοποίησε για γενετική τροποποίηση ειδικά T-cells έναντι του CMV, που επίσης συχνά προσβάλλει ασθενείς και διατηρείται σε λανθάνουσα κατάσταση επί μακρόν<sup>38</sup>.

### **Άλλες προσεγγίσεις που βελτιώνουν την έκπτυξη, παραμονή και δράση των CAR/T-cells**

Το συνδιεγερτικό σήμα είναι μεν απαραίτητο αλλά όχι ικανό ώστε από μόνο του να αναστείλει τους κατασταλτικούς μηχανισμούς που προέρχονται από τα κακοήθη κύτταρα και οι οποίοι μειώνουν ή και αναστέλλουν πλήρως την άνοση αντίδραση του οργανισμού.

Η IL-2 έχει ιδιότητες αυξητικού παράγοντα για τα T-cells, απελευθερώνεται από τα CAR/T-cells μετά την σύνδεση με το αντιγόνο-στόχο, αλλά δεν είναι επαρκής ώστε από μόνη της να ανατρέψει την “αν-ενέργεια” που μπορεί να προκαλέσουν τα κακοήθη κύτταρα στα κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος. Επιπλέον η IL-2 μπορεί να αυξήσει την προσέλκυση των Tregs στα σημεία δράσης των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων<sup>39,40</sup>. Περισσότερο αποτελεσματικές κυτταροκίνες στο να αποτραπεί η προερχόμενη από τα κακοήθη κύτταρα αναστολή της κυτταροτοξικής δράσης είναι οι IL-15, IL-7, IL-12.

Η IL-15 προάγει τον πολλαπλασιασμό, αναστέλλει την απόπτωση και την κυτταρική εξουθένωση των Teff-cells, βελτιώνει τη διάρκεια ζωής των Tm-cells και μειώνει την ανασταλτική δράση των Tregs επί των κυτταροτοξικών T-cells. Έχει χορηγηθεί ως ανασυνδυασμένος παράγοντας για την in vivo βελτίωση της δράσης υιοθετούμενης ανοσοθεραπείας. CAR/T-cells προγραμματισμένα να παράγουν IL-15 μετά τη σύνδεση με το αντιγόνο στόχο, έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικά μοντέλα και αναμένονται με ενδιαφέρον τα αποτελέσματα κλινικών μελετών<sup>41,42</sup>.

Η εξωγενής χορήγηση IL-7 αποδείχθηκε εξαιρετικά ανεκτή. Οι Vera και συν. τροποποίησαν γενετικά το σηματοδοτικό μονοπάτι της IL-7/IL-7Ra, ώστε τα CAR/T-cells επιλεκτικά να επιδεικνύουν σημαντική έκπτυξη μετά από εξωγενή χορήγηση IL-7<sup>43</sup>.

Η ίδια ομάδα πρότεινε μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα προσέγγιση σχεδιάζοντας CAR/T-cells που θα έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν μηνύματα που φυσιολογικά προκαλούν αναστολή της κυτταροτοξικής δράσης σε μηνύματα που θα επάγουν τη δραστηριότητα των CAR/T-cells. Σε ζωικό μοντέλο χορήγησαν CAR/T-cells με ειδικότητα του εξωκυττάρου τμήματος του CAR για τον υποδοχέα της IL-4, η οποία εκκρίνεται από το περιβάλλον των κακοήθων κυττάρων και προάγει Th2 δράση και άρα συνθήκες ανοχής για τα T-cells. Το ενδοκυττάριο τμήμα είναι αυτό του υποδοχέα της IL-7 που επάγει την κυτταροτοξική δράση των T-cells. Στο συγκεκριμένο ερευνητικό μοντέλο, οι ερευνητές διαπίστωσαν πως η δέσμευση του υποδοχέα της IL-4 στα τροποποιημένα CAR/T-cells τελικά οδήγησε στη διατήρηση του Th1 φαινοτύπου και σε ενδυνάμωση του πολλαπλασιασμού και της κυτταροτοξικής τους δράσης<sup>44</sup>.

Η IL-12 προάγει τις Th1 δράσεις, τη δραστηριότητα των T-cells ενώ οδηγεί σε απόπτωση τα Tregs καθώς και κύτταρα που επάγουν την αναστολή της αντι-κακοήθους δράσης των T-cells. Γονιδιακά τροποποιημένα CAR/T-cells που εκκρίνουν IL-12 ήδη δοκιμάζονται σε κλινική μελέτη του National Cancer Institute<sup>5</sup>.

Για την καλύτερη δράση των CAR/T-cells έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης, μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του CTL4 και του υποδοχέα ή του συνδέτη του programmed death 1 (PD-1) μορίου, που ενεργοποιούν μονοπάτια

που ασκούν ανασταλτική δράση στα ενεργοποιημένα T-cells<sup>46,47</sup>.

## Βελτίωση της ασφάλειας των CAR/T-cells

### Μέθοδοι γονιδιακής μεταφοράς

Οι ρετροϊκοί και λεντι-ϊκοί φορείς αποτελούν τα πλέον αποδεκτά μέσα για μεταφορά και ενσωμάτωση των επιθυμητών πληροφοριών στο γενωμικό υλικό των T-cells. Οι ανησυχίες για τις βλαπτικές επιδράσεις που μπορεί να προκαλέσουν στον ασθενή οι συγκεκριμένοι φορείς, υπό τη μορφή της εισχωρητικής μεταλλαξιογένεσης, προέρχονται από την κλινική εμπειρία διαμόλυνσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (hematopoietic stem cells, HSCs). Μέχρι σήμερα παρόμοια τοξικότητα δεν έχει αναφερθεί σε διαμόλυνση T-λεμφοκυττάρων. Πιθανή εξήγηση είναι πως τα T-cells είναι περισσότερο διαφοροποιημένα κύτταρα από τα HSCs και συνεπώς λιγότερο “επιρρεπή” στις βλαπτικές επιδράσεις της «ημιτυχαίας» ενσωμάτωσης των ιικών φορέων στο γονιδίωμα, η οποία μπορεί να προκαλέσει εισχωρητική μεταλλαξιογένεση<sup>48</sup>.

Οι ομάδες του MD Anderson Cancer Center (MDACC) και BCM πρότειναν μία περισσότερο ασφαλή μέθοδο μεταφοράς που βασίζεται σε σύστημα transposon / transposase (Sleeping Beauty και PiggyBac) που συγκριτικά με τα ιικά συστήματα μεταφοράς έχει καλύτερη ικανότητα έγκλεισης, ακόμη και μεγάλων τμημάτων DNA. Πρόσφατα η συγκεκριμένη μέθοδος πήρε την έγκριση για κλινική εφαρμογή από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών<sup>49,50</sup>.

### Βελτίωση της τοξικής επίδρασης στα μη κακοήθη κύτταρα

Στην περίπτωση των αιματολογικών κακοηθειών, τα μόρια-στόχοι των CAR/T-cells (CD19, CD20, CD33), απέχουν πολύ από το να αποτελούν ιδεώδεις αντιγονικούς στόχους, καθώς εκφράζονται επίσης στην πλειοψηφία των φυσιολογικών κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού. Αν και η τοξικότητα που προκαλούν (πχ μακροχρόνια μείωση των φυσιολογικών B-λεμφοκυττάρων και υπογαμμασφαιριναιμία μετά από χορήγηση CAR/T-cells ειδικών για CD20/19) είναι κλινικά διαχειρίσιμη, δεν παύει να αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για ευρεία κλινική εφαρμογή.

Με στόχο να μειωθεί η τοξικότητα στα φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα η ομάδα του BCM σχεδίασε κλινική μελέτη που είναι σε εξέλιξη, με CAR/T-cells ειδικά έναντι κ-ελαφρών αλυσών. Με αυτό τον τρόπο θα καταστρέφονται τα κ-κλωνικά κακοήθη κύτταρα, όπως επίσης και τα φυσιολογικά που εκφράζουν κ-ελαφρές αλυσούς, όμως θα διασώζονται τα φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα που εκφράζουν λ-ελαφρές αλυσίδες, περιορίζοντας συνε-

πώς την τοξικότητα στα φυσιολογικά B-λεμφοκύτταρα<sup>51</sup>.

Άλλα μόρια που εκφράζονται σε μεγαλύτερη συχνότητα σε κακοήθη από ότι σε φυσιολογικά κύτταρα του αιμοποιητικού ιστού και που σε προκλινικά μοντέλα φαίνεται πως μπορεί να αποτελέσουν επιλεκτικούς στόχους των CAR/T-cells είναι τα CD23, CD70, ROR1 και CD44v6. Η ασφάλεια και αποτελεσματικότητα τους αναμένεται να αξιολογηθούν σε προσεχείς κλινικές μελέτες<sup>52-55</sup>.

### Το σύνδρομο της φλεγμονώδους απάντησης ή “καταιγίδας των κυτταροκινών”

Η ενεργοποίηση του CAR/T-cell μετά τη δέσμευση του εξωκυττάρου τμήματος με τον αντιγονικό στόχο είναι δυνατόν να οδηγήσει σε σοβαρού βαθμού τοξικότητα λόγω αθρόας έκκρισης προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως TNF-α και IL-6. Ο βαθμός τοξικότητας μπορεί να μετριάσει με τη χορήγηση προοδευτικά αυξανόμενου αριθμού κυττάρων και με την έγκαιρη χορήγηση αντισωμάτων έναντι των συγκεκριμένων κυτταροκινών<sup>5</sup>.

### Μη ειδικά μέτρα για μείωση της τοξικότητας

Δεδομένης της εγγενούς ιδιότητας των CAR/T-cells να επιβιώνουν μακροχρόνια και να πολλαπλασιάζονται και εκπτώσσονται, είναι φανερό πως η τοξικότητα μπορεί να παραμένει επί μακρόν ή και να επιδεινώνεται με την πάροδο του χρόνου. Η αδυναμία ελέγχου της σοβαρού βαθμού ή προοδευτικά επιδεινούμενης τοξικότητας θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί με την εισαγωγή “γονιδίων αυτοκτονίας” στα CAR/T-cells. Προκλινική μελέτη με CAR/T-cells εφοδιασμένα με “γονίδιο αυτοκτονίας” επαγόμενο από την caspase-9, έδειξε πως η ενσωμάτωση του “γονιδίου αυτοκτονίας” δεν επηρέασε την έκπτυξη, βιωσιμότητα και κυτταροτοξική δράση των γονιδιακά τροποποιημένων κυττάρων ενώ η ενεργοποίησή του συνοδεύτηκε από σημαντική μείωση του αριθμού τους<sup>41</sup>.

Η επιλογή πολλαπλών αντιγονικών στόχων από ένα μόνο γενετικά τροποποιημένο T-λεμφοκύτταρο μπορεί επίσης να βοηθήσει στην ελάττωση της τοξικότητας. Η ενσωμάτωση δύο CARs στα T-λεμφοκύτταρα προσφέρει το πλεονέκτημα ενεργοποίησης από κακοήθη κύτταρα που θα εκφράζουν ταυτόχρονα και τα 2 αντιγόνα στόχους προστατεύοντας τα φυσιολογικά κύτταρα εφόσον δεν εκφράζουν τα συγκεκριμένα αντιγόνα επιφανείας. Τέτοια μοντέλα CAR/T-cells έχουν δοκιμαστεί σε προκλινικές μελέτες με αντιγόνα που εκφράζονται σε συμπαγείς όγκους και τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά. Χρειάζεται ωστόσο να επιβεβαιωθούν και στην κλινική πράξη, καθώς η έκφραση των αντιγόνων επιφανείας στα κακοήθη κύτταρα διαφέρει ποιοτικά αλλά και ποσοτικά μεταξύ των ασθενών<sup>56</sup>.

## Συμπεράσματα

Σήμερα περίπου 30 κλινικές μελέτες που διερευνούν την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα ειδικών CAR/T-cells έναντι κακοήθων κυττάρων του αιμοποιητικού ιστού, είναι σε εξέλιξη<sup>57</sup>. Τα αποτελέσματα των δημοσιευμένων κλινικών μελετών, καταδεικνύουν πως οι κυτταρικές θεραπείες περνούν από τη φάση των “πολλά υποσχόμενων” στη φάση των “κλινικά εφαρμόσιμων” θεραπειών στο

πεδίο των αιματολογικών κακοηθειών. Η συνεχής πρόοδος στην έρευνα των CAR/T-cells, η καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του ανοσολογικού συστήματος αλλά και των ανασταλτικών μηχανισμών από την πλευρά των κακοήθων κυττάρων και του μικροπεριβάλλοντός τους θα βοηθήσουν ώστε, στο άμεσο μέλλον, να αναπτυχθούν απλούστερες, φθηνότερες και ταχύτερες μέθοδοι παραγωγής περισσότερο αποτελεσματικών αλλά και ασφαλέστερων, γονιδιακά τροποποιημένων T-λεμφοκυττάρων.

---

## Genetic modified, with chimeric antigen receptor, T lymphocytes therapies in hematological malignancies

by Panagiotis Kaloyannidis

*Haematology Clinic - Bone Marrow Transplantation Unit, Gene and Cell Therapy Center  
"G. Papanikolaou" General Hospital, Thessaloniki, Greece*

**ABSTRACT:** Current chemotherapy protocols, hematopoietic stem cell transplantation and supportive care have led to remarkable improvements in the outcome of patients with hematologic malignancies. However, therapeutic approaches of high efficacy and low toxicity remain a highly desirable, albeit challenging goal in hematology and oncology in general. In this context, cellular-based therapies have enormous capabilities. The knowledge that donor lymphocyte infusions have the potential to eradicate relapsed disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, provided the conceptual basis of the effort to generate T lymphocytes with specific activity against tumor cells. The genetic modification of T-cells to express an additional to their native TCR, chimeric antigen receptor- (CAR-), combines the HLA-independent binding of cell surface target molecules with the delivery of a tailored activating signal to the engineered immune cells, with the goal to deliver effective anti-tumor activity and long term persistence. Engineered CARs are incorporated into peripheral blood T cells by using various vector transfer systems, most commonly integrating viral vectors. The B-cell origin antigens are the most widely used surface antigen targets. CAR/T-cell-based immunotherapy has been under development for almost 20 years, over which period it has progressed from a novel and complex technology to an emerging alternative therapeutic modality for hematological malignant diseases. However, several issues in terms of safety and efficacy still remain to be addressed. This brief review summarizes the most recent biological and clinical developments and highlights the future directions towards the wide application of cellular therapies in hematological malignancies.

---

## Βιβλιογραφία

1. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 1990;75:555-562.
2. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006;314:126-129.
3. van Loenen MM, de Boer R, Hagedoorn RS, van Egmond EH, Falkenburg JH, Heemskerk MH. Optimization of the HA-1-specific T-cell receptor for gene therapy of hematologic malignancies. *Hematologica*. 2011;96:477-481.
4. Eshhar Z, Waks T, Gross G, Schindler DG. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:720-724.
5. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev*. 2014;257:107-126.
6. Chmielewski M, Hombach A, Heuser C, Adams GP, Abken H. T cell activation by antibody-like immunoreceptors: increase in affinity of the single-chain fragment domain above threshold does not increase T cell activation against antigen-positive target cells but decreases selectivity. *J Immunol*. 2004;173:7647-7653.
7. Hudecek M, Lupo-Stanghellini MT, Kosasih PL, et al. Receptor affinity and extracellular domain modifications affect tumor recognition by ROR1-specific chimeric antigen

- receptor T cells. *Clin Cancer Res.* 2013;19:3153-164.
8. Hombach A, Heuser C, Gerken M, et al. T cell activation by recombinant FcεpsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Ther.* 2000;7:1067-1075.
  9. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor-modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest.* 2011;121:1822-1826.
  10. Haynes NM, Snook MB, Trapani JA, et al. Redirecting mouse CTL against colon carcinoma: superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs Fc epsilon RI-gamma. *J Immunol.* 2001;166:182-187.
  11. Brownlie RJ, Zamoyska R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:257-269.
  12. Gajewski TF, Meng Y, Blank C, et al. Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev.* 2006;213:131-145.
  13. Maher J, Brentjens RJ, Gunset G, Rivière I, Sadelain M. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol.* 2002;20:70-75.
  14. Song DG, Ye Q, Poussin M, Harms GM, Figini M, Powell DJ Jr. CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood.* 2012;119:696-706.
  15. Campana D, Schwarz H, Imai C. 4-1BB chimeric antigen receptors. *Cancer J.* 2014;20:134-140.
  16. Pulè MA, Straathof KC, Dotti G, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol Ther.* 2005;12:933-941.
  17. Carpenito C, Milone MC, Hassan R, et al. Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:3360-3365.
  18. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood.* 2008;112:2261-2271.
  19. Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther.* 2005;16:1241-6.
  20. Bonini C, Grez M, Traversari C, et al. Safety of retroviral gene marking with a truncated NGF receptor. *Nat Med.* 2003;9:367-369.
  21. Cavalieri S, Cazzaniga S, Geuna M, et al. Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence. *Blood.* 2003;102:497-505.
  22. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood.* 2012;119:2709-2720.
  23. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4550-4557.
  24. Jensen MC, Popplewell L, Cooper LJ, et al. Antitransgene rejection responses contribute to attenuated persistence of adoptively transferred CD20/CD19-specific chimeric antigen receptor redirected T cells in humans. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16:1245-1256.
  25. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood.* 2008;112:2261-2271.
  26. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med.* 2011;3:95ra73.
  27. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368:1509-1518.
  28. Davila ML, Riviere I, Wang X, et al. Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Transl Med.* 2014;6:224ra25.
  29. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood.* 2012;119:3940-3950.
  30. Hoyos V, Savoldo B, Dotti G. Genetic modification of human T lymphocytes for the treatment of hematologic malignancies. *Haematologica.* 2012;97:1622-1631.
  31. Kochenderfer JN, Dudley ME, Carpenter RO, et al. Donor-derived CD19-targeted T cells cause regression of malignancy persisting after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2013;122:4129-4139.
  32. Ritchie DS, Neeson PJ, Khot A, et al. Persistence and efficacy of second generation CAR T cell against the LeY antigen in acute myeloid leukemia. *Mol Ther.* 2013;21:2122-2129.
  33. Tettamanti S, Marin V, Pizzitola I, et al. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor. *Br J Haematol.* 2013;16:389-401.
  34. Terakura S, Yamamoto TN, Gardner RA, Turtle CJ, Jensen MC, Riddell SR. Generation of CD19-chimeric antigen receptor modified CD8+ T cells derived from virus-specific central memory T cells. *Blood.* 2012;119:72-82.
  35. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Paths to stemness: building the ultimate antitumor T cell. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:671-684.
  36. Cruz CR, Micklethwaite KP, Savoldo B, et al. f CD19-directed/multivirus-specific CTLs post HSCT for B cell malignancies. *Mol Ther* 2012;20:S207.
  37. Cruz CR, Micklethwaite KP, Savoldo B, et al. Infusion of donor-derived CD19-redirection virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study. *Blood.* 2013;122:2965-2973.
  38. Myers D, Sun J, Rooney CM, et al. Administration of GD2 chimeric antigen receptor modified, tri-virus specific cytotoxic T lymphocytes after HLA mismatched allogeneic stem cell

- transplantation for relapsed, refractory neuroblastoma. *Mol Ther* 2013;22:S5-S6.
39. Li XC, Demirci G, Ferrari-Lacraz S, Groves C, Coyle A, Malek TR. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med*. 2001;7:114-118.
  40. Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol*. 2004;172:3983-3988.
  41. Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, et al. Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia*. 2010;24:1160-1170.
  42. Perna SK, De Angelis B, Pagliara D, et al. Interleukin 15 provides relief to CTLs from regulatory T cell-mediated inhibition: implications for adoptive T cell-based therapies for lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19:106-117.
  43. Vera JF, Hoyos V, Savoldo B, et al. Gene transfer of IL-7R alpha (IL-7R) on antigen-specific cytotoxic T cells (CTLs) restores their ability to respond to IL-7 cytokine. *Blood* 2007;110:2756 (Abstract).
  44. Leen AM, Sukumaran S, Watanabe N, et al. Reversal of tumor immune inhibition using a chimeric cytokine receptor. *Mol Ther*. 2014;22:1211-1220.
  45. Zhang L, Kerkar SP, Yu Z, et al. Improving adoptive T cell therapy by targeting and controlling IL-12 expression to the tumor environment. *Mol Ther*. 2011;19:751-759.
  46. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363:711-723.
  47. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012;366:2455-2465.
  48. Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Aiuti A. Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 1. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:580-584.
  49. Singh H, Manuri PR, Olivares S, et al. Redirecting specificity of T-cell populations for CD19 using the Sleeping Beauty system. *Cancer Res*. 2008;68:2961-2971.
  50. Nakazawa Y, Huye LE, Dotti G, et al. Optimization of the PiggyBac transposon system for the sustained genetic modification of human T lymphocytes. *J Immunother*. 2009;32:826-836.
  51. Ramos CA, Savoldo B, Liu E, et al. Clinical responses in patients infused with T lymphocytes redirected to target  $\kappa$ -Light immunoglobulin chain. *Mol Ther* 2013;22:S114.
  52. Giordano Attianese GM, Marin V, Hoyos V, et al. In vitro and in vivo model of a novel immunotherapy approach for chronic lymphocytic leukemia by anti-CD23 chimeric antigen receptor. *Blood*. 2011;117:4736-4745.
  53. Shaffer DR, Savoldo B, Yi Z, et al. T cells redirected against CD70 for the immunotherapy of CD70-positive malignancies. *Blood*. 2011;117:4304-4314.
  54. Hudecek M, Schmitt TM, Baskar S, et al. The B-cell tumor-associated antigen ROR1 can be targeted with T cells modified to express a ROR1-specific chimeric antigen receptor. *Blood*. 2010;116:4532-4541.
  55. Casucci M, Falcone L, Nicolis di Robilant B, et al. Dual Transgenesis of T cells with a novel CD44v6-specific chimeric antigen receptor and a suicide gene for the safe and effective targeting of chemoresistance in hematopoietic tumors. *Blood* 118[21]. Abstract.
  56. Wilkie S, van Schalkwyk MC, Hobbs S, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*. 2012;32:1059-1070.
  57. Davila ML, Bouhassira DC, Park JH, et al. Chimeric antigen receptors for the adoptive T cell therapy of hematologic malignancies. *Int J Hematol*. 2014;99:361-371.



## T - λεμφοκύτταρα με ειδικότητα έναντι πολλών ιών

Αναστασία Καρέλα, Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ Η απαρχή της κυτταρικής ανοσοθεραπείας προσδιορίζεται στα τέλη της δεκαετίας του 1950 όταν αποδείχθηκε πειραματικά η αντικαρκινική δράση των T-λεμφοκυττάρων και οδήγησε αργότερα στη χορήγηση T-λεμφοκυττάρων για τη θεραπεία αιματολογικών κακοηθειών, μία εφαρμοσμένη πλέον πρακτική για πρόληψη και θεραπεία υποτροπών μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων. Οι ιογενείς λοιμώξεις είναι ένα από τα κύρια αίτια θνητότητας σε μεταμοσχευμένους ασθενείς και, τα τελευταία χρόνια, αποτελούν πεδίο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος για την εφαρμογή κυτταρικής ανοσοθεραπείας. Η διαθέσιμη αντι-ική χημειοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική για τους περισσότερους ιούς, δεν προσφέρει μόνιμη προστασία, είναι δαπανηρή και έχει επιπλοκές, όπως τοξικότητα και παραγωγή ανθεκτικών στελεχών του ιού. Η επιλεκτική αποκατάσταση της ανοσίας με μεταφορά ex-vivo παραγόμενων T-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι πολλών ιών έχει διερευνηθεί ως μέθοδος για την αποτελεσματική αντιμετώπιση ιογενών επιπλοκών μετά τη μεταμόσχευση. Αρκετές αρχικές μελέτες συνέβαλλαν στην κατανόηση της αποτελεσματικότητας της T-κυτταρικής θεραπείας και στην σταδιακή ανάπτυξη απλουστευμένων πρωτοκόλλων για την κατασκευή ενός αποδοτικού θεραπευτικού προϊόντος. Πρόσφατα έγινε κλινική εφαρμογή χορήγησης ειδικών έναντι τριών ιών T-λεμφοκυττάρων από τρίτερες κυτταρικών σειρών (third-party) και ειδικών έναντι πέντε ιών T-λεμφοκυττάρων του δότη, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Παρ' όλο που πολλά εμπόδια πρέπει ακόμα να υπερνηκηθούν, έχουν γίνει σημαντικότερες πρόοδοι τα τελευταία χρόνια για την ανάπτυξη αποτελεσματικών ανοσοθεραπειών των ιογενών επιπλοκών με τη χρήση ειδικών αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων.

Haema 2016; 7(1): 37-44 Copyright EAE

---

### Εισαγωγή

Η κυτταρική ανοσοθεραπεία αποτελεί ένα πεδίο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος και δυναμικής έρευνας στην ογκολογία και αιματολογία, επιδιώκοντας την εφαρμογή των πειραματικών ευρημάτων στην καθημερινή θεραπευτική πρακτική.

### Η θεραπευτική δράση των T-λεμφοκυττάρων

Η αντικαρκινική δράση των ανοσοποιητικών κυττάρων ήταν η πρώτη ιδιότητά τους που μελετήθηκε στα πλαίσια της θεραπευτικής τους εφαρμογής. Το 1957, ο

Barnes ανέδειξε πειραματικά ότι τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος δρουν εναντίον των καρκινικών κυττάρων<sup>1</sup>. Οι παρατηρήσεις αυτές σε ζωικά μοντέλα, οδήγησαν στην πειραματική χορήγηση λεμφοκυττάρων σε ασθενείς με λευχαιμία περί τα τέλη της δεκαετίας του 1960<sup>2-4</sup>. Η ανοσοθεραπεία με T-λεμφοκύτταρα έναντι κακοηθειών συνδέεται άμεσα με την αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών (αλλο-MMO) και με το φαινόμενο μοσχεύματος εναντίον λευχαιμίας όπου T-λεμφοκύτταρα ενέχουν προστατευτικό ρόλο στην υποτροπή της νόσου<sup>5</sup>. Μετά τον πρώτο ασθενή που έλαβε ανοσοθεραπεία με T-λεμφοκύτταρα λόγω υποτροπής της νόσου μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων, στις αρχές του 1990<sup>6</sup> διαπιστώθηκε η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης μεθόδου και σε ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία<sup>7,8</sup>. Η έγχυση T-λεμφοκυττάρων (τροποποιημένων ή μη) αποτελεί πλέον μια εφαρμοσμένη αντικαρκινική ανοσολογική θεραπευτική προσέγγιση<sup>9</sup>.

---

Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, Τ.Κ. 265 04 Ρίο  
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης,  
e-mail: spyridonidis@upatras.gr

## Η ανάγκη ανάπτυξης T-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι ιών για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων σε μεταμοσχευμένους ασθενείς

Η υποτροπή της αρχικής νόσου αποτελεί ένα μόνο από τα προβλήματα της άλλο-ΜΜΟ. Οι ιογενείς λοιμώξεις αποτελούν σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας σε μεταμοσχευμένους και βαριά ανοσοκατασταμένους ασθενείς<sup>10,11</sup>. Το ένα τρίτο των θανάτων μετά από άλλο-ΜΜΟ έχει σχετιστεί με ιογενείς λοιμώξεις<sup>12</sup>. Ειδικά, μετά από απλοταυτόσημη μεταμόσχευση όπου χρησιμοποιείται ισχυρή ανοσοκαταστολή ή αφαίρεση των T-κυττάρων από το μόσχευμα, οι ιογενείς λοιμώξεις αποτελούν ένα από τα κύρια αίτια θνητότητας. Συγκεκριμένα, αναζωπύρωση ή λοίμωξη με ερπητοϊούς, όπως ο κυτταρομεγαλοϊός (CMV), ο ιός Epstein-Barr (EBV), ο αδενοϊός (Adv), και ο ιός BK (BKV), μεταξύ άλλων ιών, αποτελούν συχνές, δυνητικά θανατηφόρες επιπλοκές μετά την άλλο-ΜΜΟ<sup>13</sup>. Η αντι-ικική φαρμακοθεραπεία δεν είναι αποτελεσματική για τους περισσότερους ιούς, δεν προσφέρει μόνιμη προστασία, είναι δαπανηρή και μπορεί να έχει επιπλοκές, όπως τοξικότητα και παραγωγή ανθεκτικών στελεχών του ιού<sup>14</sup>. Ένα σημαντικό ποσοστό CMV αναζωπυρώσεων είναι ανθεκτικό στην αντι-ικική θεραπεία, η οποία με τη σειρά της συνεπάγεται αρκετές ανεπιθύμητες ενέργειες όπως ουδετεροπενία και νεφρική ανεπάρκεια. Ο κίνδυνος CMV αναζωπύρωσης είναι μεγαλύτερος σε CMV θετικούς ξενιστές με CMV αρνητικούς δότες καθώς δεν υπάρχουν κύτταρα με ειδική για τον ιό ανοσία στο χορηγούμενο μόσχευμα<sup>15,16</sup>. Η EBV επανενεργοποίηση μετά από άλλο-ΜΜΟ μπορεί να οδηγήσει σε λεμφοϋπερπλαστική νόσο. Στην περίπτωση αυτή τα κακοήγη κύτταρα είναι έντονα ανοσογενετικά, εκφράζοντας σε μεγάλο βαθμό EBV-ειδικά αντιγόνα και κατ'επέκταση, αποτελούν δυνητικά εύκολους στόχους για τα T-λεμφοκύτταρα<sup>17</sup>. Όσον αφορά τον ιό BK, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν ικανοποιητικές θεραπείες για τη σοβαρή BK-αιμορραγική κυστίτιδα και τη BK-νεφροπάθεια<sup>10</sup>.

## Οι πρώτες πειραματικές προσεγγίσεις στη δημιουργία ειδικών αντί-ικών T-λεμφοκυττάρων

Η επιλεκτική αποκατάσταση της ανοσίας με μεταφορά ex-vivo παραγόμενων αντικών T-κυττάρων έχει διερευνηθεί ως μια αποτελεσματική μέθοδος για την πρόληψη ή τη θεραπεία ιογενών λοιμώξεων μετά τη μεταμόσχευση. Ο Riddell et al ήταν οι πρώτοι οι οποίοι προέβησαν στην κλινική χορήγηση ex vivo παραγόμενων CMV-ειδικών T-λεμφοκυττάρων, η οποία είχε ως αποτέλεσμα τον έλεγχο CMV λοίμωξης<sup>18</sup>. Μετέπειτα, οι Rooney και Heslop et al παρήγαγαν EBV-ειδικά T-λεμφοκύτταρα που αποδεί-

χθηκαν αποτελεσματικά για τον έλεγχο της EBV μετα-μεταμοσχευτικής λεμφοϋπερπλαστικής νόσου<sup>19</sup>.

## Παράγοντες δημιουργίας αποτελεσματικών ειδικών αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων

Αυτές οι πρώιμες κλινικές μελέτες, συνέβαλαν στην κατανόηση των βασικών παραμέτρων που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη δημιουργία αποτελεσματικών T-κυτταρικών θεραπειών<sup>20</sup>, όπως:

1. Επιλογή συγκεκριμένων αντιγόνων. Τα αντιγόνα-στόχοι που πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κυτταρικές θεραπείες πρέπει να έχουν ισχυρή αντιγονικότητα, ειδικότητα και έκφραση.

2. Παραγωγή T-κυττάρων με συγκεκριμένο φαινότυπο και με υψηλή ειδικότητα έναντι συγκεκριμένων αντιγόνων. Σημαντική εξέλιξη σε αυτό τον τομέα αποτελεί η ανάπτυξη πρωτοκόλλων παραγωγής δενδριτικών κυττάρων σε κλινική κλίμακα τα οποία είναι ικανά για την επιλογή και την έκπτυξη T-κυττάρων υψηλής ειδικότητας<sup>21</sup>. Είναι πλέον σαφές ότι το τελικό T-κυτταρικό προϊόν θα πρέπει να περιέχει όχι μόνο CD8+ αλλά και CD4+ T-λεμφοκύτταρα καθώς και κεντρικά κύτταρα μνήμης (central memory subsets, Tcm) για την επίτευξη και τη διατήρηση του in vivo θεραπευτικού αποτελέσματος<sup>22,23</sup>. Η ανακάλυψη νέων κυτταροκινών, όπως της IL-15, έχει διευκολύνει τη διαφοροποίηση των T-λεμφοκυττάρων προς αυτούς τους φαινοτύπους.

3. Η προετοιμασία του ασθενούς. Αρκετές κλινικές μελέτες κατέδειξαν ότι η in vivo έκπτυξη των χορηγούμενων T-λεμφοκυττάρων εξαρτάται από το ανοσολογικό προφίλ του ασθενούς. Για παράδειγμα, τα TIL (tumor infiltrating lymphocytes) είναι πιο αποδοτικά όταν εγχέονται σε λεμφοπενικό περιβάλλον που επιτυγχάνεται μετά από λεμφοαφανιστικό σχήμα χημειοθεραπείας<sup>24</sup>.

4. Η γενετική τροποποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Τα επιτεύγματα στη μεταφορά γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης αποτελεσματικών ιικών φορέων για το μετασχηματισμό των T-λεμφοκυττάρων, οδήγησε στη δυνατότητα δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων T-λεμφοκυττάρων ικανών να ανταπεξέρχονται αποτελεσματικά σε μηχανισμούς διαφυγής, όπως της παραγωγής ανοσοκατασταλτικών κυτταροκινών (π.χ. TGF-β)<sup>25</sup>.

5. Η απλουστευμένη παρασκευή των κυττάρων. Οι GMP εγκαταστάσεις που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη προηγμένων κυτταρικών θεραπειών (advanced cellular therapies) έχουν υψηλό κόστος δημιουργίας και συντήρησης. Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται διαδικασίες παρασκευής T-λεμφοκυττάρων ολοένα και περισσότερο αυτοματοποιημένες, αποδοτικές και κλειστού τύπου, κάτι που στο μέλλον θα οδηγήσει και στη δυνατότητα παραγωγής κυτταρικών θεραπειών σε μεσαίας κλί-

μακας νοσοκομεία. Οι κλειστοί θάλαμοι εργασιών ειδικών συνθηκών (Glove Box με ISO-14644-1:5) ή οι κλειστοί επωαστές GREX αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα προόδου προς αυτή την κατεύθυνση<sup>27</sup>.

## Μεθοδολογίες παραγωγής αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων

Επί του παρόντος, τρεις τεχνολογίες είναι διαθέσιμες για την παραγωγή αντι-ικών κυτταροτοξικών T-κυττάρων (CTLs) για κλινική χρήση, αλλά όλες έχουν σημαντικούς περιορισμούς. Πρώτον, η μαγνητική απομόνωση με χρήση πολυμερών HLA-πεπτιδίου είναι ταχεία, αλλά περιορίζεται σε ορισμένους HLA απλότυπους, σε συγκεκριμένα εμπορικά διαθέσιμα HLA πεπτίδια και δεν μπορεί να επιλέξει CD4+ κύτταρα<sup>28</sup>. Δεύτερον, η τεχνολογία δέσμευσης IFN- $\gamma$  εκκρινόντων κυττάρων μπορεί να απομονώσει T-κύτταρα με μία μόνο αντιγονική ειδικότητα και, όπως και στην πρώτη περίπτωση, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή T-κυττάρων από δότες που δεν έχουν εκτεθεί προηγουμένως στον ιό<sup>29</sup>. Παρότι αυτές οι τεχνικές άμεσης απομόνωσης ειδικών T κυττάρων είναι GMP-συμβατές μεθοδολογίες, η ευρύτερη χρήση τους περιορίζεται επίσης, τόσο από το γεγονός ότι απαιτούνται μεγάλες ποσότητες αίματος, όσο και από τον ελάχιστο αριθμό κυκλοφορούντων ειδικών T-κυττάρων για τους περισσότερους ιούς στους δότες<sup>28,29</sup>.

Τρίτον, αντι-ικά κυτταροτοξικά T κύτταρα (CTLs) μπορούν να παραχθούν ex-vivo με επαναλαμβανόμενη αντιγονική διέγερση T-κυττάρων του δότη με αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα<sup>30-32</sup>. Η συγκεκριμένη τεχνολογία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας στην καλλιέργεια των ειδικών έναντι αντιγόνων T-κυττάρων με αντίστοιχη μείωση στη συχνότητα εμφάνισης των μη ειδικών T-κυττάρων (Εικόνα 1). Αυτή η τελευταία τεχνολογία έχει το πλεονέκτημα ότι επιτρέπει την παραγωγή αντι-ικών CTLs με ειδικότητα έναντι πολλών ιών (mutlivirus)<sup>33-36</sup>. Αν και η ανοσοθεραπεία με μεταφορά ex-vivo παραγόμενων αντι-ικών CTLs έχει αποδειχθεί ασφαλής και αποτελεσματική, είμαστε ακόμη πολύ

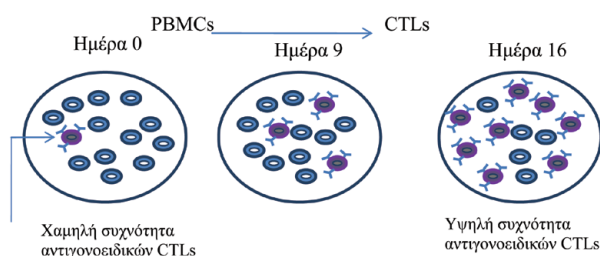
μακριά από την τακτική παραγωγή αυτών των κυττάρων για κλινική χρήση. Οι τρέχουσες διαδικασίες παραγωγής είναι πολύπλοκες, απαιτούν μολυσματικό υλικό του ιού ή ικούς φορείς κλινικής ποιότητας και παρατεταμένη in vitro καλλιέργεια<sup>30-36</sup>. Ειδικά, η παρατεταμένη (10-12 εβδομάδες) ex vivo παρασκευή καθιστά τα CTLs πρακτικά «μη διαθέσιμα» για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων που βρίσκονται σε έξαρση και η θεραπεία επείγει. Επίσης, η επαναληψιμότητα παραμένει ένα πρόβλημα. Αρκετοί παράγοντες θα μπορούσαν να επηρεάσουν την επιτυχή ενεργοποίηση λειτουργικών CTLs, όπως α) η μη αποτελεσματική παρουσίαση του αντιγόνου από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, β) η χαμηλή συχνότητα των πρόδρομων αντιγόνο-ειδικών T κυττάρων από δότες που δεν έχουν προσβληθεί ποτέ από τον ιό, γ) το μη κατάλληλο περιβάλλον κυττοκινών στην καλλιέργεια και δ) η αναστολή έκπτυξης των CTLs από άλλα κύτταρα στην καλλιέργεια, όπως ρυθμιστικά T-κύτταρα. Η ευρύτερη εφαρμογή χορήγησης αντι-ικών CTLs απαιτεί την ανάπτυξη απλούστερων πρωτοκόλλων<sup>37</sup>.

Πράγματι, αρχικά για τη δημιουργία αντιγονικά διεγερμένων T-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν μετασχηματισμένα B-λεμφοκύτταρα με διαγονιδιακούς EBV-φορείς<sup>38</sup>. Κατόπιν για την ανοσοδιέγερση των T-λεμφοκυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ιικοί φορείς, ικές πρωτεΐνες και πεπτίδια. Κάθε μία από τις προαναφερθείσες μεθόδους έχει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς της.

Οι ιοί και οι ιικοί φορείς, επιτρέπουν την ταυτόχρονη παρουσίαση πολλών αντιγόνων από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα με διάφορους μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της παρουσίασης δομικών πρωτεϊνών για αναγνώριση από τα CD4+ και ενδοκυττάρων πρωτεϊνών για αναγνώριση από τα CD8+ κύτταρα. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος απαιτεί επαρκή τροπισμό από τον ιό, η επιλογή μπορεί να επηρεάσει την αντιγονοπαρουσιαστική λειτουργία και ταυτόχρονα γείρονται θέματα ασφάλειας με τη χρησιμοποίηση ιών με διατηρημένη την ικανότητα πολλαπλασιασμού.

Όσον αφορά τις ικές πρωτεΐνες είναι ασφαλέστερες και παράγονται εύκολα, αλλά είναι λιγότερο αποδοτικές στην αντιγονοπαρουσίαση τύπου I. Προκειμένου να αποφευχθεί η χρήση μολυσματικού υλικού ή ικών φορέων για την ενεργοποίηση των T κυττάρων, εμπορικά διαθέσιμα, επικαλυπτόμενα 15μερή πεπτιδίων (permixes) που επικαλύπτουν πιθανούς CD8+ και CD4+ επίτοπους ικών αντιγόνων μπορούν να είναι μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική τεχνική για αντιγονική διέγερση και δημιουργία T-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι πολλαπλών ιών<sup>39</sup>.

Το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στη ανάπτυξη απλούστερων πρωτοκόλλων για τη δημιουργία αντι-ικών CTLs. Το 2011 δημοσιεύτηκε από τον Gerdemann et al, ένα πρωτόκολλο συμβατό με μεθοδολογία σωστής παρασκευαστικής πρακτικής (GMP) για τη δημιουργία



**Εικόνα 1.** Ex-vivo παραγωγή αντι-ικών CTLs με επαναλαμβανόμενη αντιγονική διέγερση T-κυττάρων.

CTLs με ειδικότητα έναντι τριών ιών: EBV, CMV και Adv. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δενδριτικά κύτταρα μετασχηματισμένα με πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί LMP2, EBNA1 και BZLF1 (EBV), Hexon and Penton (Adv) και pp65 και IE1 (CMV) ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs). Η παραγωγή των ειδικών CTLs έναντι τριών ιών (EBV, CMV και Adv) έγινε παρουσία IL-4 και IL-7 σε ειδικούς επωαστές GREX με μειωμένο κόστος και σε σύντομο διάστημα 10 ημερών<sup>40</sup>. Το 2012 ανακοινώθηκε από τους Σπυριδωνίδη και συν. μια απλή, ταχεία (9 ημέρες) GMP-συμβατή μεθοδολογία χωρίς τη χρήση μολυσματικού υλικού για την ανάπτυξη σε μία ενιαία καλλιέργεια ενός πολλαπλά-αντιικού (multivirus) CTL πληθυσμού με ειδικότητα εναντίων τεσσάρων ιών EBV, CMV, Adv και BK<sup>41</sup>. Στη μελέτη αυτή, ώριμα δενδριτικά κύτταρα (DC) επωάστηκαν με 15μερή πεπτιδίων (permixes) που καλύπτουν αμινικές αλληλουχίες αντιγονικών περιοχών του CMV, EBV, Adenovirus και BK, είτε μεμονωμένα ή σε συνδυασμό (Mix). Ο συνδυασμός IL-7, IL-15, και χαμηλής δόσης IL-2 επιλέχθηκε ως ο βέλτιστος συνδυασμός κυττοκινών για τη δημιουργία των αντιγονο-ειδικών CTL. Τα αντι-ικά CTLs αναγνωρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής βάσει της ικανότητάς τους να παράγουν IFN-γ, TNF-α, ή/και IL-2, μετά από ειδική αντιγονοδιέγερση. Ειδικά εναντίον των τεσσάρων ιών CD4+ και CD8+ CTLs επάχθηκαν επιτυχώς στο σύνολο των δοτών που ελέγχθηκαν (Εικόνα 2Α). Τα αντι-ικά CTLs διατήρησαν φαινότυπο κυττάρων κεντρικής μνήμης ενώ μόνο ένα μικρό υποσύνολο έδειξε δείκτες τερματικής διαφοροποίησης ή γήρανσης (Εικόνα 2Β). Το παραπάνω πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία και για την παραγωγή αντι-CMV CTLs σε κλινική κλίμακα σε επωαστή GREX (Εικόνα 2Γ).

### Κλινική εφαρμογή T-λεμφοκυττάρων με ειδικότητα έναντι πολλαπλών ιών για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων

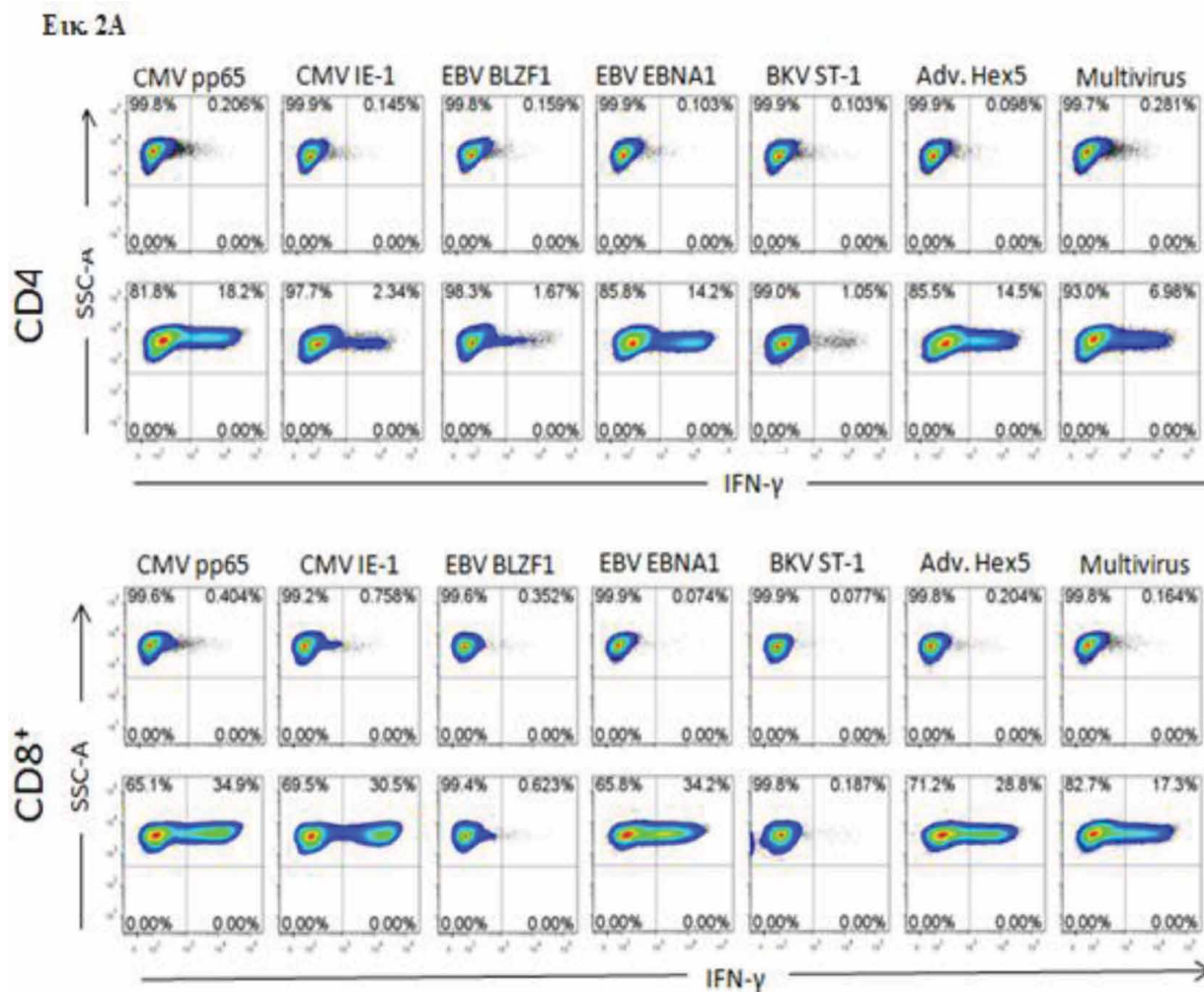
Πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο ασχολούνται με την παραγωγή ειδικών T-λεμφοκυττάρων είτε για την πρόληψη, είτε για τη θεραπεία ιογενών λοιμώξεων μετά από μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων ή συμπαγών οργάνων<sup>42-45</sup>. Είναι σημαντικό να τονιστεί, ότι ακόμη και πολύ μικρός αριθμός ειδικών T-λεμφοκυττάρων της τάξης του  $10^3/\text{kg}$  είναι ικανός να ελέγξει μια ιογενή λοίμωξη όταν εγχυθεί *in vivo*<sup>29</sup>. Το 2013 δημοσιεύτηκε μια πολύ ενδιαφέρουσα πολυκεντρική μελέτη που παρουσίασε τη χρησιμοποίηση “third-party” πολύ-αντιικών (multivirus) CTL πληθυσμών για την αντιμετώπιση σοβαρών ιογενών λοιμώξεων μετά από άλλο-MMO. Η χρησιμοποίηση “third-party” αποθηκευμένων T-λεμφοκυττάρων παρέχει εξαιρετικές δυνατότητες για την ευρύτερη χρήση ειδικών αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων καθώς ανταπεξέρ-

χεται διαφόρων περιορισμών της δημιουργίας εξατομικευμένων κυτταρικών σειρών από ξεχωριστά ζευγάρια δοτών-ασθενών, όπως η χρονοβόρα διαδικασία, το κόστος και η δυσκολία της δημιουργίας τέτοιων κυττάρων από μη ανοσοποιημένους δότες. Στην προαναφερθείσα μελέτη, κατασκευάστηκε μία τράπεζα από 32 κυτταρικές σειρές από άτομα με κοινούς HLA πολυμορφισμούς και ανοσία στους EBV, CMV και Adv. Συνολικά 18 σειρές χορηγήθηκαν σε ασθενείς με σοβαρές, ανθεκτικές ιογενείς λοιμώξεις από τους προαναφερθέντες ιούς μετά από άλλο-MMO. Η πλήρης ή μερική ανταπόκριση μετά από 6 εβδομάδες από τη χορήγηση των κυττάρων ήταν 74% στο σύνολο των ασθενών και των ιών-στόχων. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν 73,9% για CMV λοίμωξη, 77,8% για λοίμωξη με Adv και 66,7% για EBV λοίμωξη. Δεν παρατηρήθηκαν άμεσα με την έγχυση των κυττάρων σχετιζόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες και το φαινόμενο μοσχεύματος κατά ξενιστή παρουσιάστηκε μόνο σε 2 από τους 50 συμμετέχοντες. Οι μικρές αυτές κυτταρικές τράπεζες που χρησιμοποιήθηκαν αποδείχθηκαν αποτελεσματικές ακόμα και όταν υπήρχε μια μοναδική σχετική HLA αντιστοιχία με τον ασθενή, με την προϋπόθεση ότι το συγκεκριμένο HLA αλληλόμορφο αντιπροσώπευε σχετιζόμενο με τον ιό αντιγόνο<sup>46</sup>.

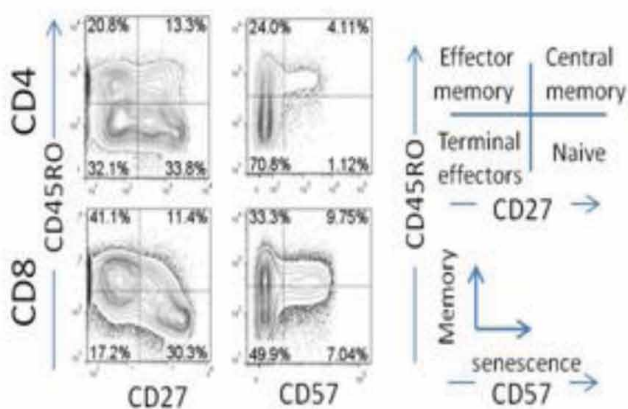
Ένα νέο πρωτόκολλο παραγωγής CTLs πολλαπλής ειδικότητας ελέγχθηκε πρόσφατα σε κλινική μελέτη φάσης I. Το καινοτόμο αυτό πρωτόκολλο επιτρέπει την ταχεία έκπτυξη μίας κυτταρικής σειράς T-κυττάρων που δύναται να στοχεύει ταυτόχρονα 5 ιούς (Adv, CMV, EBV, BKV και HHV6). Η νέα στρατηγική περιλαμβάνει την απ' ευθείας διέγερση των PBMCs με μείγμα 15μερών πεπτιδίων και την καλλιέργειά τους σε GREX βιοαντιδραστήρες για 9-11 ημέρες, σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με IL-4 και IL-7. Το καινούριο πρωτόκολλο είναι οικονομικότερο, καθώς αποφεύγει τη χρήση ιών και ικών φορέων, απλούστερο, εφόσον αποδίδει CTLs πενταπλής ειδικότητας με μία μόνο διέγερση, σε μία μόνο καλλιέργεια και τέλος ταχύτερο, καθώς μειώνει τον χρόνο παραγωγής των CTLs σε μόλις 10 ημέρες. Τα CTLs χορηγήθηκαν σε 11 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε αλλογενή μεταμόσχευση προφυλακτικά αλλά και ως θεραπεία για μία ή περισσότερες ενεργείς λοιμώξεις και φάνηκαν ασφαλή αλλά και αποτελεσματικά επάγοντας ανοσολογική απόκριση στο 94% των περιπτώσεων<sup>47</sup>.

### Θεραπευτικό και οικονομικό όφελος από τη χρήση αντι-ικών T-λεμφοκυττάρων

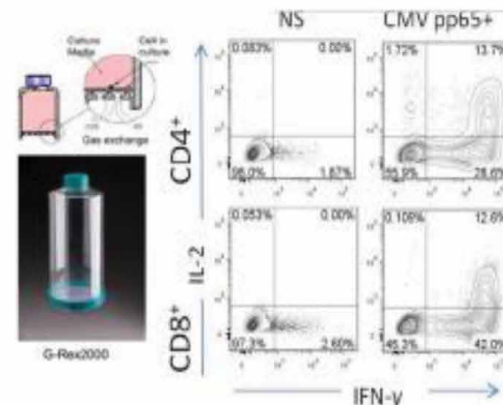
Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η δυνατότητα χορήγησης ειδικών έναντι πολλαπλών ιών CTLs και ως προφυλακτική θεραπεία σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε άλλο-MMO για την έγκαιρη πρόληψη ιογενών λοιμώξεων. Και ενώ ίσως το κόστος φαντάζει απαγορευτικό για τη



**Εικ 2Β**



**Εικ 2Γ**



**Εικόνα 2.** (Α) Τα αντι-ικά CTLs (CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup>) αναγνωρίστηκαν με κυτταρομετρία ροής με την ικανότητά τους να παράγουν IFNγ μετά από ειδική αντιγονοδιέγερση (κάτω σειρές). Οι πάνω σειρές δείχνουν την μη ειδική ενεργότητα που παρουσιάζεται στην καλλιέργεια. Η ειδικότητα των CTLs έναντι κάθε ιού αναγράφεται στην εικόνα. Τα multivirus καταδεικνύουν CTLs που δείχνουν ειδικότητα έναντι των τεσσάρων ιών (CMV, EBV, Adv, BK). (Β) Φαινοτυπική ανάλυση των αντιικών (multivirus) CTLs. (Γ) Ανάπτυξη ειδικών αντι-CMV CTLs σε μεγάλη κλίμακα σε επωαστή GREX.

χρήση μιας τόσο ακριβά παρασκευαζόμενης κυτταρικής θεραπείας ως προληπτικό μέσο, η πρόσφατη ανάλυση της Jain et al, 2014, καταδεικνύει αντίθετα αποτελέσματα. Η παρούσα μελέτη αφορούσε στη χορήγηση ειδικών αντι-CMV CTLs ως πρόληψη για την CMV ενεργοποίηση σε μεταμοσχευμένους ασθενείς. Η τρέχουσα δαπάνη για την παρασκευή ειδικών αντι-CMV CTLs σύμφωνα με τους κανόνες GMP ανέρχεται σε 10.000\$. Ωστόσο αν λάβει κανείς υπόψη του το κόστος της αντι-ιικής αγωγής και της ενδονοσοκομειακής νοσηλείας, το οποίο υπολογίζεται σε πάνω από 50.000\$, ακόμα και αν η αποτελεσματικότητα της προφυλακτικής χορήγησης ειδικών CTLs περιοριστεί στο 50% αυτή θα εξακολουθούσε να αποτελεί την πιο οικονομική επιλογή<sup>48</sup>. Ανεξαρτήτως οικονομικών δεδομένων και περιορισμών, η δυνατότητα να προληφθούν οι ιογενείς λοιμώξεις μέσω ειδικών CTLs παρέχει νέα προοπτική για αλλογενείς μεταμοσχεύσεις

αιμοποιητικών κυττάρων με λιγότερες επιπλοκές.

## Επίλογος

Συνοψίζοντας η κυτταρική ανοσοθεραπεία αποτελεί ένα δυναμικό πεδίο εντατικής έρευνας στην αιματολογία. Παρόλο που πολλά εμπόδια ακόμα πρέπει να υπερνικηθούν για να φτάσουμε στην ευρεία εφαρμογή της, η κυτταρική ανοσοθεραπεία των ιογενών επιπλοκών έχει φτάσει σε ένα επεκτεινόμενο επίπεδο εφαρμογής και αποδοτικότητας. Προς το παρόν, λίγοι μόνο ασθενείς έχουν πρόσβαση σε αυτές τις πολλά υποσχόμενες θεραπείες. Η χορηγούμενη T-κυτταρική θεραπεία θα πρέπει να γίνει ακόμα πιο προσιτή, απλή και αποδοτική. Η προοπτική για την εφαρμογή ασφαλούς και αποδοτικής κυτταρικής θεραπείας απαιτεί στενή συνεργασία μεταξύ βασικών ερευνητών και κλινικών ιατρών.

---

## Multi-virus specific T-cells

by Anastasia Karela, Alexandros Spyridonidis

*Bone Marrow Transplantation Unit, University General Hospital of Patras, Rio, Greece*

**ABSTRACT:** The notion that immunocompetent cells are capable of mediating an antitumor effect was first validated experimentally in late 1950s. These findings led to the therapeutic infusion of antitumor specific T-lymphocytes to treat hematologic malignancies, for example donor lymphocyte infusions for relapse after allogeneic stem cells transplant (HSCT). Besides relapse, viral infections consist a major and potential fatal complication after HSCT. Antiviral chemotherapy is not universally effective, is expensive and carries its own complications, like organ toxicity and generation of resistant virus strains. The use of multi-virus specific T-cells for the treatment of viral infections is an emerging field of research. Early clinical trials have helped to understand the hallmarks of T-cell therapies and provided critical insights to the manufacturing of a therapeutically robust product. Recently, very encouraging results in treating severe post-transplantation viral infections have been reported with virus-specific T cells, from third-party or the stem cell donors, targeting 3 to 5 viruses. Although many hurdles remain unresolved, the use of multi-virus specific T-cells has now reached a stage of increasing feasibility and efficacy.

---

## Βιβλιογραφία

1. Barnes DW, Loutit JF. Treatment of murine leukaemia with x-rays and homologous bone marrow. II. Br J Haematol. 1957;3:241–252.
2. Mathe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. Cancer Res. 1965;25:1525–1531.
3. Schwarzenberg L, Mathe G, Schneider M, et al. Attempted adoptive immunotherapy of acute leukaemia by leucocyte transfusions. Lancet. 1966;2:365–368.
4. Nadler SH, Moore GE. Immunotherapy of malignant disease. Arch Surg. 1969;99:376–381.
5. Barrett J, Bollard CM. T-cell therapy for cancer. Immunotherapy. 2012; 4:347–350.
6. Slavin S, Naparstek E, Nagler A, et al. Allogeneic cell therapy for relapsed leukemia after bone marrow transplantation with donor peripheral blood lymphocytes. Exp Hematol. 1995;23:1553–1562.
7. Kolb HJ, Mittermuller J, Clemm C, et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. Blood. 1990;76:2462.
8. Faber LM, Van Der Hoeven J, Goulmy E, et al. Recognition of clonogenic leukemic cells, remission bone marrow and HLA-identical donor bone marrow by CD8+ or CD4+ minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. J Clin Invest. 1995;96:877–883.
9. Alexandros Spyridonidis, Maria Liga, A long road of T-cells to cure cancer: from adoptive immunotherapy with unspecific cellular products to donor lymphocyte infusions and

- transfer of engineered tumor-specific T-cells, *Am J Blood Res* 2012;2:98-110.
10. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:9-20.
  11. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic stem cell transplantation: an overview of infection risks and epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25:101-116.
  12. Kennedy-Nasser AA, Bollard CM, Myers GD, et al. Comparable outcome of alternative donor and matched sibling donor hematopoietic stem cell transplant for children with acute lymphoblastic leukemia in first or second remission using alemtuzumab in a myeloablative conditioning regimen. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14:1245-1252.
  13. Verdeguer A, de Heredia CD, Gonzalez M, et al. Observational prospective study of viral infections in children undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a 3- year GETMON experience. *Bone Marrow Transplant*. 2011;46:119-124.
  14. Hantz S, Garnier-Geoffroy F, Mazon MC, et al. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2628-2640.
  15. Ljungman P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007; 20:209-217.
  16. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, Cordonnier C. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMTmegafile analysis. *Blood*. 2003;102:4255-4260.
  17. Moss P, Rickinson A. Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:9-20.
  18. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, et al. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 1992;257:238-241.
  19. Heslop HE, Slobod KS, Pule MA, et al. Long-term outcome of EBV-specific T cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood*. 2010; 115:925-935.
  20. Spyridonidis A. Cellular immunotherapy for cancer. Past, present, future, memo 2012; 5:81-84.
  21. Gerdemann U, Katari U, Christin AS, et al. Cytotoxic T lymphocytes simultaneously targeting multiple tumor-associated antigens to treat EBV negative lymphoma. *Mol Ther*. 2011;19:2258-2268.
  22. Riddell SR, Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol*. 1995;13:545-586.
  23. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, et al. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*. 2008;118:294-305.
  24. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;17:1290-1297.
  25. Bollard CM, Rossig C, Calonge MJ, et al. Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood*. 2002; 99:3179-3187.
  26. Σπυριδωνίδης Α. Οι αρχές των GCP (Good Clinical Practice) και GMP (Good Manufacturing Practice) στην Αιματολογία: Νέες διατάξεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης Haema, 2009; 12(Suppl 2):274-282.
  27. Lapteva N, Vera FJ. Optimization Manufacture of Virus- and Tumor-Specific T Cells, *Stem Cells International Volume* 2011, Article ID 434392, 8 pages doi:10.4061/2011/434392.
  28. Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*. 2005;202:379-386.
  29. Feuchtinger T, Lang P, Hamprecht K, Schumm M, Greil J, Jahn G, Niethammer D, Einsele H. Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy. *Exp Hematol*. 2004;32:282-289.
  30. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 1992;257:238-241.
  31. Peggs KS, Verfuether S, Pizzey A, Chow SL, Thomson K, Mackinnon S. Cytomegalovirus-specific T cell immunotherapy promotes restoration of durable functional antiviral immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1851-1860.
  32. Jedema I, van de Meent M, Pots J, Kester MG, van der Beek MT, Falkenburg JH. Successful generation of primary virus-specific and anti-tumor T-cell responses from the naive donor T-cell repertoire is determined by the balance between antigen-specific precursor T cells and regulatory T cells. *Haematologica*. 2011;96:1204-1212.
  33. Hanley PJ, Shaffer DR, Cruz CR, et al. Expansion of T cells targeting multiple antigens of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and adenovirus to provide broad antiviral specificity after stem cell transplantation. *Cytotherapy*. 2011;13:976-986.
  34. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*. 2006;12:1160-1166.
  35. Leen AM, Christin A, Myers GD, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy with donor T cells prevents and treats adenovirus and Epstein-Barr virus infections after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*. 2009;114:4283-4292.
  36. Gerdemann U, Christin AS, Vera JF, et al. Nucleofection of DCs to generate Multivirus-specific T cells for prevention or treatment of viral infections in the immunocompromised host. *Mol Ther*. 2009;17:1616-1625.
  37. Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, et al. Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther*. 2012;20:1622-1632.
  38. Wiesner M, Zentz C, Hammer MH, et al. Selection of CMV-specific CD8+ and CD4+ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines. *Eur J Immunol*. 2005; 35:2110-2121.

39. Moosmann A, Hammerschmidt W, Kolb H-J. Virus-specific T cells for therapy – Approaches, problems, solutions, *EJCB*-50582; 2011.
40. Gerdemann U, Vera JF, Rooney CM, Leen AM. Generation of Multivirus-specific T Cells to Prevent/treat Viral Infections after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant. *J Vis Exp*. 2011; e2736, doi:10.3791/2736.
41. Spyridonidis A, Muranski P, Kerkar Kazushi Tanimoto S, Hensel FN, Melenhorst JJ, Barrett AJ. Improved Strategy for Rapid Generation of Quadrivirus-Specific CD8+ and CD4+ Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) for Adoptive Transfer After Stem Cell Transplantation (SCT), 54<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition.
42. Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*. 2006; 12:1160–1166.
43. Peggs KS, Verfuërth S, Chow C et al. Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus following allogeneic stem cell transplantation: toxicity and efficacy. *Blood*. 2005; 104, Abstract 191.
44. Hanley PJ, Cruz CR, Savoldo B, et al. Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood* 2009; 114:1958–1967.
45. Bao L, Cowan M, Dunham K, et al. Adoptive immunotherapy with CMV specific cytotoxic T lymphocytes for stem cell transplant patients with refractory CMV Infections, *J Immunother*. 2012; 35:293–298. doi: 10.1097/CJI.0b013e31824300a2.
46. MA Leen, Bollard MC, Mendizabal MA, et al. Multicenter study of banked third-party virus-specific T cells to treat severe viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013; 121.
47. Papadopoulou A, Gerdemann U, Katari UL, et al. Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med*. 2014;6:242ra83.
48. Jain AN, Lu K, Ito S, et al. The clinical and financial burden of pre-emptive management of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation—implications for preventative treatment approaches. *Cytherapy*. 2014; 16: 927e933.



## Η εξέλιξη της γονιδιακής θεραπείας

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

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

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

### Μια σύντομη αναδρομή στο παρελθόν

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

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

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

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

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

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

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

## Τα πρώτα βήματα της γονιδιακής θεραπείας

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Λεντιικοί φορείς νεότερης γενιάς

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

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

### Η παρούσα κατάσταση

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

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

### Γονιδιακή θεραπεία Αιμοφιλίας

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

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

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

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

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

### Γονιδιακή θεραπεία ανοσοανεπάρκειών

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

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

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

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

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

### Γονιδιακή θεραπεία λυσοσωμικών νόσων

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

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

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

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

## Θαλασσαιμία

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

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

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

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

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

## Λευχαιμίες/Καρκίνος

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

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

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

## Ιογενείς λοιμώξεις - AIDS

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

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

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

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

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

### Γονιδιακή θεραπεία αυτοκτονίας στην απλοταυτόσημη μεταμόσχευση HSCs

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

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

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

### Μη-αιματολογικές νόσοι

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

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

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

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

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

## Γονιδιακή διόρθωση:

### Το μέλλον της γονιδιακής θεραπείας:

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

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

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

## Συμπεράσματα

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

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



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

## The development of gene therapy

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

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

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

## Βιβλιογραφία

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

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

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

## Βασικές αρχές των ιικών φορέων της γονιδιακής θεραπείας

Γιώργος Βασιλόπουλος<sup>1,2</sup>, Εμμανουήλ Σημαντηράκης<sup>1</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ** Η τεχνολογία της γονιδιακής μεταφοράς στηρίχτηκε κυρίως στους ρετροϊούς, στους αδενο-εξαρτώμενους ιούς (AAV) και στους αδενοϊούς. Οι βασικές αρχές της ανάπτυξης ενός φορέα είναι η αναγνώριση των λειτουργιών που μπορούν να υποκατασταθούν *in trans* και των αλληλουχιών που χρειάζονται *in cis* για την παραγωγή των ιικών σωματιδίων (φορέων). Στα επόμενα τεχνολογικά βήματα δόθηκε βάρος στην επιλογή των υποκινητών για βέλτιστη έκφραση του διαγονιδίου και στην εφαρμογή μονωτών χρωματίνης για απομόνωση του φορέα από την περιρρέουσα χρωματίνη στη θέση ενσωμάτωσης. Αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στα 30 χρόνια της ανάπτυξης του πεδίου εν τούτοις, η κλινική εφαρμογή παραμένει προβληματική λόγω κόστους και παρενεργειών από την ένθεση στο γονιδίωμα, γεγονός που έχει στρέψει την τεχνολογική δραστηριότητα στην ανάπτυξη φορέων με ικανότητα γενετικής επιδιόρθωσης (όπως οι AAV).

Haema 2016; 7(1): 57-71 Copyright EAE

---

### Εισαγωγή

Η ιδέα της επιδιόρθωσης μιας γενετικής διαταραχής με την εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου στο γονιδίωμα του ασθενούς συνελήφθη, όταν κατέστη αντιληπτό ότι πολλές γενετικές νόσοι προκαλούνται από μεταλλάξεις στη δομή των γονιδίων. Αρχικά, οι μονογονιδιακές διαταραχές ήταν οι πρώτοι στόχοι για εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας, αλλά πλέον το φάσμα των διαταραχών που αποτελούν τους στόχους της γενετικής παρέμβασης έχει διευρυνθεί σημαντικά, διότι ένας μεγάλος αριθμός ασθενειών έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν γενετικό υπόβαθρο. Μία σημαντική πρόσφατη πρόοδος στο πεδίο είναι η ταυτοποίηση πολλών κληρονομικών ή σωματικών μεταλλαγών που προδιαθέτουν ή προκαλούν καρκίνο. Για το λόγο αυτό, ο καρκίνος έγινε ένας προφανής στόχος στο ερευνητικό πεδίο της γονιδιακής θεραπείας. Τέλος, λοιμώδεις νόσοι, όπως το AIDS και η ηπατίτιδα C που έχουν προσβάλλει εκατομμύρια ανθρώπους, έχουν γίνει στόχοι εντατικής έρευνας της γονιδιακής θεραπείας.

Υπάρχουν δύο κύριες προσεγγίσεις για τη μεταφορά θεραπευτικών γονιδίων στα κύτταρα στόχους και η επιλογή της εκάστοτε μεθόδου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προσβασιμότητα του ιστού και τη φύση του ορ-

γάνου στόχου<sup>1</sup>. Στην *ex vivo* προσέγγιση, κύτταρα από ένα συγκεκριμένο ιστό συλλέγονται, επιμολύνονται με τον ικό φορέα και στη συνέχεια επιστρέφονται στον οργανισμό. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για τη γενετική τροποποίηση αιμοποιητικών κυττάρων. Οι δυσκολίες και οι κίνδυνοι που σχετίζονται με τον *ex vivo* χειρισμό και τη μεταμόσχευση αυτόλογων κυττάρων οδήγησε πολλούς ερευνητές στη διερεύνηση της *in vivo* προσέγγισης για τη μεταφορά ιικών φορέων. Σε αυτήν την προσέγγιση, ο θεραπευτικός φορέας μπορεί να μεταφερθεί είτε τοπικά σε ένα συγκεκριμένο ιστό είτε μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Κλασικά παραδείγματα συμπεριλαμβάνουν την *in situ* χορήγηση του θεραπευτικού φορέα εντός της μάζας του όγκου και τη χορήγηση μέσω της πυλαίας φλέβας, όταν το ήπαρ αποτελεί το όργανο στόχο. Παρόλο που οι *in vivo* οδοί χορήγησης είναι σε μεγάλο βαθμό επιθυμητές, αφού ελαχιστοποιούν τον *ex vivo* χειρισμό των κυττάρων και τους κινδύνους που σχετίζονται με αυτόν, υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στη σύγχρονη τεχνολογία των ιικών φορέων, οι οποίοι παρεμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή της *in vivo* μεταφοράς. Παραδείγματος χάριν, ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους φορείς, ο ρετροϊός MLV, υδρολύεται από τον ανθρώπινο ορό· ενώ οι ίδιοι φορείς μπορούν να επιβιώσουν παρουσία εγκεφαλονωτιαίου υγρού (το οποίο περιέχει ένα κλάσμα του συμπληρώματος του ανθρώπινου ορού) καθιστώντας τους κατάλληλους για γονιδιακή μεταφορά στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Σκοπός

<sup>1</sup>Εργαστήριο Γενετικής και Γονιδιακής Θεραπείας, ΠΒΕΑΑ, Αθήνα

<sup>2</sup>Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Ιατρική Σχολή

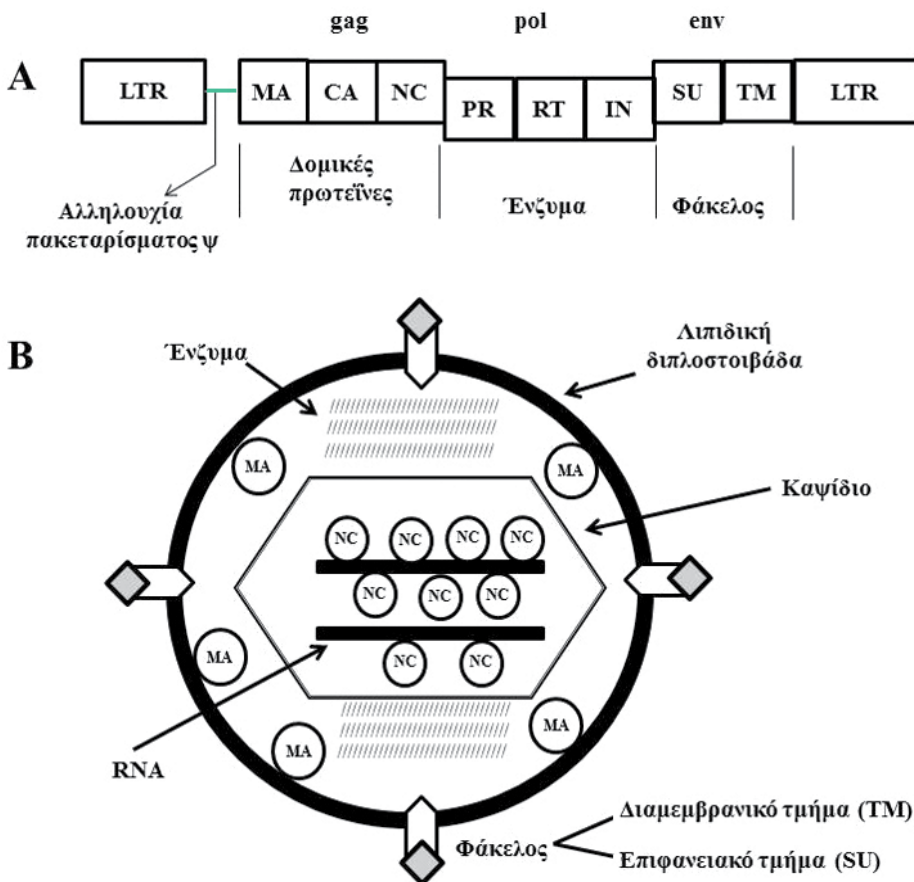
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Γιώργος Βασιλόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής, Εργαστήριο Γενετικής και Γονιδιακής Θεραπείας, ΠΒΕΑΑ, 11527 Αθήνα, e-mail: gvasilop@bioacademy.gr

της παρούσας ανασκόπησης είναι να παρέχει μια επισκόπηση των βασικών αρχών που διέπουν τη γονιδιακή θεραπεία μέσω ικών φορέων: την τύχη των φορέων αυτών στα κύτταρα στόχους και τις αρχές που διέπουν την έκφραση των ικών και των θεραπευτικών γονιδίων.

## Ρετροϊκοί φορείς

Οι πρώτοι ιικοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στη γονιδιακή θεραπεία ήταν ογκο-ρετροϊκοί φορείς και συγκεκριμένα φορείς που προήλθαν από τον ιό της λευχαιμίας επίμυος (MLV)<sup>2,3</sup>. Ο λόγος της άμεσης χρήσης, ήταν ότι υπήρχε διαθέσιμος ένας μεγάλος όγκος πληροφοριών για το κύκλο ζωής των ρετροϊών και ότι οι γενετικές διατα-

ραχές αποτελούσαν τους πρώτους στόχους της γονιδιακής θεραπείας. Εφόσον η διόρθωση της γενετικής βλάβης απαιτεί τη μόνιμη εισαγωγή του θεραπευτικού μορίου DNA, οι ρετροϊοί χρησιμοποιήθηκαν σαν φορείς, εφόσον διαθέτουν την ιδιότητα μόνιμης ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα του ξενιστή. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες ρετροϊών: οι ογκοϊοί όπως ο ιός της λευχαιμίας του επίμυος (MLV), οι λεντιοί όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και οι αφροϊοί (HFV)<sup>4</sup>. Η οργάνωση του γονιδιώματος και η δομή ενός απλού ρετροϊού απεικονίζονται στην Εικόνα 1. Δύο αλυσίδες RNA πακετάρονται μαζί με: 1) το ικρίωμα δομικών πρωτεϊνών (MA, CA, NC), προϊόντα του *gag*, 2) τα ένζυμα ιντεγκράση (IN) και αντίστροφη μεταγραφάση (RT), προϊόντα του



**Εικόνα 1. Α)** Η οργάνωση του γονιδιώματος ενός απλού ρετροϊού. Το ικό γονιδίωμα αποτελείται ένα μονόκλωνο μόριο RNA που εκατέρωθεν φέρει δύο επιμήκεις ακραίες επαναλήψεις (LTR) και οργανώνεται σε τρεις γονιδιακούς τύπους. Ο τύπος *gag* κωδικοποιεί τις κύριες δομικές πρωτεΐνες του ικρίωματος (MA), του καψιδίου (CA), του νουκλεοκαψιδίου (NC) και της ικής πρωτεάσης (PR). Ο τύπος *pol* κωδικοποιεί τα ένζυμα αντίστροφη μεταγραφάση (RT) και ιντεγκράση (IN). Τέλος, ο τύπος *env* κωδικοποιεί τις επιφανειακές (SU) και διαμεμβρανικές (TM) πρωτεΐνες συστατικά του ικού φακέλου. Το μη μεταφραζόμενο σήμα πακεταρίσματος ψ απαιτείται για την οργάνωση/συναρμολόγηση του ικού RNA στο ιοσωμάτιο. **Β)** Σχηματική επιμήκης τομή ενός ρετροϊού. Η εξωτερική επιφάνεια φέρει μία λιπιδική διπλοστοιβάδα που αποκτάται κατά την εκβλάση του ιού από το κύτταρο ξενιστή. Τα συστατικά SU και TM του φακέλου εντίθενται μεταξύ της διπλοστοιβάδας. Στο πυρήνα του ιοσωματίου βρίσκονται οι δύο αλυσίδες RNA που καλύπτονται από τις πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου. Οι δομικές πρωτεΐνες του ικρίωματος και του καψιδίου σταθεροποιούν περαιτέρω το ικό σωματίο.

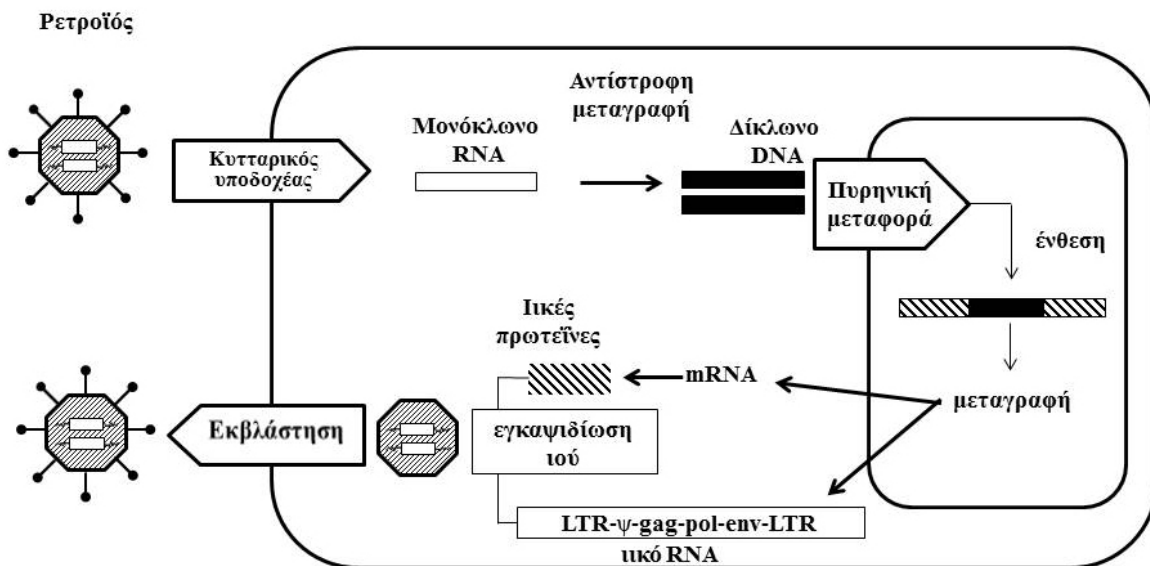
ροί και 3) μιας εξωτερικής επιφάνειας που αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα (προερχόμενη από τη μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή) με εντοιχισμένη την πρωτεΐνη του φακέλου, παράγωγο του *env*. Ο φάκελος διαθέτει ένα διαμεμβρανικό και ένα επιφανειακό κομμάτι που λειτουργεί για την πρόσδεση του ιοσωματίου σε συγκεκριμένους υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή, καθιστώντας το υπεύθυνο για τον τροπισμό του ιού. Τα ιικά γονίδια περιβάλλονται από 2 ακραίες επιμήκεις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (LTR) που εξυπηρετούν την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή ενώ λειτουργούν και σαν υποκινητές. Η 5' LTR ακολουθείται από ένα μη μεταφραζόμενο σήμα πακεταρίσματος το  $\psi$ , που είναι απαραίτητο για τη συναρμολόγηση του ιοσωματίου.

Όλοι οι ρετροϊοί ακολουθούν μια κοινή στρατηγική πολλαπλασιασμού όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Πρόκειται για RNA ιούς, που διαθέτουν μια DNA πολυμεράση, την αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία χρησιμοποιεί το ιικό RNA ως εκμαγείο για να παράγει ένα αντίγραφο DNA που θα ενθεθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή<sup>5</sup>. Η ένθεση αποτελεί εκ των ων ουκ άνευ του κύκλου της ζωής του ρετροϊού και αδυναμία πραγματοποίησής της εντός λίγων ωρών μετά τη μόλυνση, έχει σαν αποτέλεσμα την αποδόμηση του ιικού DNA και έναν άκαρπο

κύκλο μόλυνσης. Μόλις ενθεθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, ο ιός χρησιμοποιεί τον υποκινητή του, το στοιχείο LTR, για να παράγει ένα μόριο RNA που εξυπηρετεί δύο λειτουργίες α) στη ματισμένη του μορφή κατευθύνει την παραγωγή των ιικών πρωτεϊνών (ή πρωτεϊνών βοηθών) και β) στη μη ματισμένη μορφή του λειτουργεί ως το γενωμικό RNA του ιού με την αλληλουχία πακεταρίσματος  $\psi$ . Η σημασία αυτού του σήματος πακεταρίσματος έγκειται στην ικανότητά του να προσελκύει τις ικές πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή να πακεταριστούν μόνο με το ιικό  $\psi$  μόριο RNA υπό τη μορφή ιικού σωματίου, το οποίο στη συνέχεια θα εκβλαστήσει από την κυτταρική μεμβράνη. Το « $\psi$ », αναφέρεται σε παραφθορά των αρχικών γραμμάτων του packaging signal (ps,  $\psi$ ).

### Εισαγωγή του ιού στα κύτταρα

Η διαθεσιμότητα των ρετροϊικών υποδοχέων στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους προσδιορίζει το εύρος των κυττάρων ξενιστών του κάθε ρετροϊού (τροπισμός του ιού). Πολλές πρωτεΐνες του φακέλου που προκύπτουν φυσικά χρησιμοποιούνται από τους ρετροϊούς (Πίνακας 1) και οι ρετροϊικοί φορείς μπορούν να πακεταριστούν με



**Εικόνα 2.** Ο κύκλος της ζωής του ρετροϊού. Όλοι οι ρετροϊοί εισέρχονται στα κύτταρα ξενιστές μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης του φακέλου με έναν συγκεκριμένο κυτταρικό υποδοχέα. Το μονόκλωνο μόριο RNA (ssRNA) μετατρέπεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) μέσω της δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης (προϊόν του γονιδίου *pol*). Το DNA συμπλεγμένο με τις ιικές πρωτεΐνες υπό τη μορφή ενός συμπλόκου προ-ένθεσης μεταφέρεται στον πυρήνα και εντίθεται στο DNA του κυττάρου. Η πρωτεΐνη ιντεγκράση (επίσης προϊόν του γονιδίου *pol*) καταλύει την αντίδραση αυτή. Μετά την ένθεση το 5' LTR εκκινεί την μεταγραφή ενός μορίου RNA πλήρους μήκους που εξυπηρετεί δύο λειτουργίες: στη ματισμένη του μορφή αποτελεί εκμαγείο για την παραγωγή των ιικών πρωτεϊνών, ενώ στη ματισμένη μορφή αποτελεί το μόριο RNA που προορίζεται για εγκαψιδίωση εντός ενός νέου ιικού σωματίου εφόσον φέρει την αλληλουχία  $\psi$ . Μετά την αυτό-οργάνωση του ρετροϊικού σωματίου στο κυτταρόπλασμα, ο ιός εκβλαστώνει μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και περιβάλλεται μια λιπιδική διπλοστοιβάδα προερχόμενη από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή.

**Πινάκας 1. Οι κυτταρικοί υποδοχείς που χρησιμοποιούνται από τους ρετροϊούς για να προσδεθούν στα κύτταρα ξενιστές**

Ρετροϊός	Υποδοχέας	Λειτουργία
Ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV)	CD 4	Αναγνώριση του ανοσοποιητικού συστήματος
Ανοσοανεπάρκειας των πιθήκων (SIV)	CD 4	Αναγνώριση του ανοσοποιητικού συστήματος
Οικοτροφικός επίμυων	Rec 1	Μεταφορέας βασικών αμινοξέων
Αμφοτροπικός επίμυων	Ram 1	Μεταφορέας φωσφορικών
Λευχαιμίας του Γίββωνα	Glvr 1	Μεταφορέας φωσφορικών
RD114/ τύπος D	RDR	Μεταφορέας ουδέτερων αμινοξέων

διαφορετικά είδη πρωτεϊνών του φακέλου. Η διαδικασία είναι γνωστή με τον όρο ψευδοτύπωση (pseudotyping) και χρησιμεύει για να κατευθύνει κάθε φορέα σε διαφορετικά είδη κυττάρων στόχων. Οι συνήθεις φάκελοι που χρησιμοποιούνται είναι: 1) οι οικοτροφικοί που προσδένονται μόνο σε κύτταρα επίμυων και που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε μελέτες γονιδιακής μεταφοράς σε αιμοποιητικά κύτταρα επίμυων, 2) οι αμφοτροπικοί που προσδένονται σε κύτταρα επίμυων καθώς και άλλων θηλαστικών και που έχουν χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες μελέτες με ανθρώπινα κύτταρα και κύτταρα πρωτεύοντων, 3) ο φάκελος του ιού της λευχαιμίας του gibbon GALV που προσδένεται σε ανθρώπινα κύτταρα καθώς και σε κύτταρα άλλων πρωτεύοντων και 4) ο VSV-G για την τυποποίηση των Lenti. Οι αμφοτροπικοί και οι GALV φάκελοι χρησιμοποιούν ομόλογους αλλά διακριτούς φωσφορικούς μεταφορείς σαν κυτταρικούς υποδοχείς τους<sup>6</sup>. Αυτοί οι δύο υποδοχείς είναι συντηρημένοι στα θηλαστικά, και αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη ρετροϊικών φορέων με τους φακέλους αυτούς ως μέσον για γονιδιακή μεταφορά σε κύτταρα στόχους από άνθρωπο ή άλλα πρωτεύοντα<sup>7,8</sup>. Η VSV-G προσδένεται σε ένα καθολικά εκφραζόμενο μεμβρανικό φωσφολιπίδιο και έχει επιτυχώς χρησιμοποιηθεί για να μεταβάλλει τον ιστικό τροπισμό φορέων που βασίζονται στον ιό HIV<sup>9</sup>. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της χρήσης του φακέλου VSV-G, είναι ότι προσδίδει σημαντική δομική σταθερότητα στο ρετροϊικό σωματίο που επιτρέπει τη συγκέντρωση του ικού υπερκειμένου με υπερφυγοκέντρωση.

### Η ιική ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή

Μετά την εισαγωγή στο κύτταρο ξενιστή, οι ρετροϊοί χρησιμοποιούν το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (RT) για να δημιουργήσουν ένα δίκλωνο μόριο DNA από το ιικό RNA. Το ιικό RNA είναι προσδεμένο με πρωτεΐνες του ιού και του κυτταροπλάσματος, υπό τη μορφή ενός συμπλόκου προ-ένθεσης, το οποίο πρέπει να διέλθει από

τον πυρηνικό φάκελο προτού να μπορέσει να εντεθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου. Η πυρηνική μεταφορά απαιτεί είτε την αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου, ένα γεγονός που συμβαίνει κατά τη μίτωση, είτε ενεργητική μεταφορά μέσω των πυρηνικών πόρων σε ένα κύτταρο σε κατάσταση ηρεμίας (G0). Οι τρεις οικογένειες ρετροϊών δείχνουν διαφορετικό βαθμό εξάρτησης από τη φάση του κυτταρικού κύκλου για την ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Οι φορείς που βασίζονται στον ιό MLV είναι απολύτως εξαρτώμενοι από την αντιγραφή του κυττάρου ξενιστή, ενώ οι λεντικοί και οι FV φορείς είναι κατά 10 έως και 100 φορές πιο αποδοτικοί στην ένθεση του γονιδιώματος τους σε αδρανή κύτταρα σε σχέση με τους MLV φορείς<sup>10-12</sup>. Ο λόγος αυτής της διαφοράς είναι η παρουσία σημάτων πυρηνικού εντοπισμού στις ικές πρωτεΐνες που διευκολύνουν τη μεταφορά του συμπλόκου προ-ενσωμάτωσης στον πυρήνα χωρίς την ανάγκη το κύτταρο να βρίσκεται στη μίτωση. Τέτοια σήματα ταυτοποιήθηκαν στις FV και στις λεντικές δομικές πρωτεΐνες και εμπλέκονται στην αύξηση του ποσοστού μεταγωγής που παρουσιάζουν οι φορείς αυτοί σε κύτταρα που βρίσκονται στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου<sup>13,14</sup>.

### Έκφραση των εισηγμένων γονιδίων

Μετά την ενσωμάτωση ενός ρετροϊού στο γονιδίωμα του κυττάρου, ο ιός χρησιμοποιεί τον LTR υποκινητή του για να κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων του. Παρόλα αυτά, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει προστατευτικούς μηχανισμούς ενάντια στην ανεξέλεγκτη έκφραση «ξένων» γονιδίων, οι οποίοι δρουν ώστε να αποσιωπήσουν την έκφραση του εξωγενούς DNA. Οι ακριβείς μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι αλλά κυρίως εμπλέκονται η μεθυλίωση του DNA και η αποακετυλίωση των ιστονών<sup>15,16</sup>. Το φαινόμενο αποσιώπησης αποτελεί ένα μείζον εμπόδιο στην επίτευξη μακροχρόνιας έκφρασης των γονιδίων που μεταφέρονται με τους ρετροϊικούς φορείς. Αλληλουχίες που βρίσκονται στα στοιχεία LTR εμπλέκονται στην αποσιώπηση με την πρόσδεση παραγόντων που πα-



ρεμποδίζουν την εκκίνηση της μεταγραφής. Αναπτύχθηκαν δύο προσεγγίσεις για την επίλυση του προβλήματος αυτού. Η χρήση εναλλακτικών LTR<sup>17</sup> και η ενσωμάτωση στοιχείων μονωτών στη ρετροϊκή γονιδιακή κατασκευή.

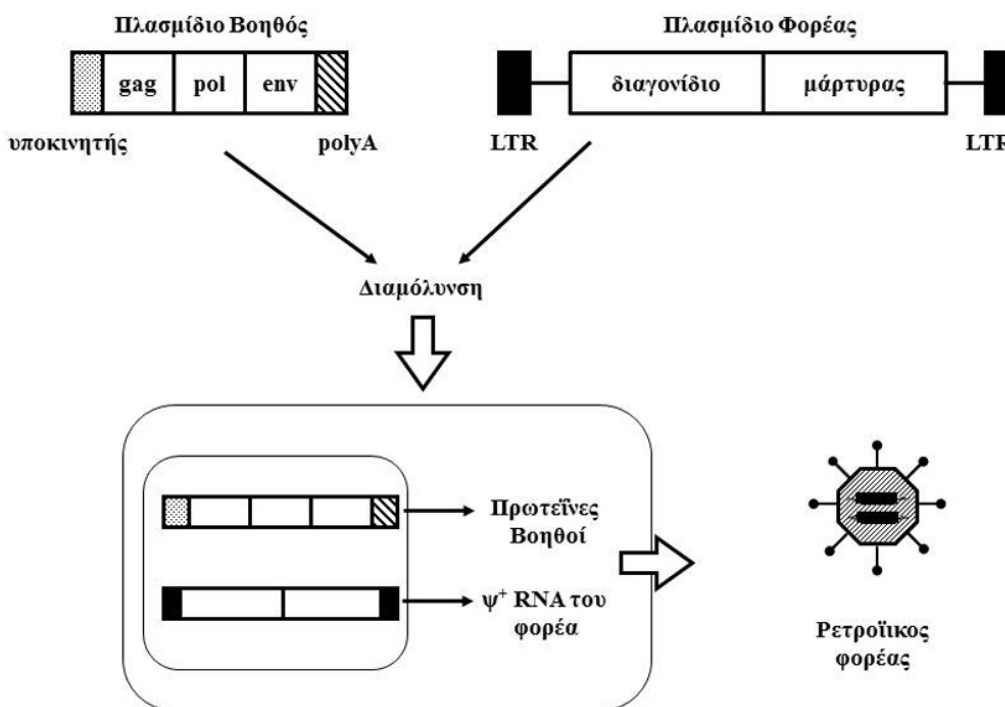
### Παραγωγή θεραπευτικών ρετροϊκών φορέων

Οι φορείς που βασίζονταν στον ιό MLV ήταν οι πρώτοι που αναπτύχθηκαν ως μέσα για γονιδιακή μεταφορά. Το γεγονός που συνέβαλε στην ευρεία εξάπλωση των MLV φορέων ήταν η εις βάθος γνώση της στρατηγικής αντιγραφής του ιού. Το ικό γονιδίωμα μπορεί να διακριθεί σε δύο λειτουργικές οντότητες: αυτές που απαιτούνται *in cis* και αυτές που παρέχονται *in trans*. Οι *in cis* αλληλουχίες απαιτούνται για την εγκαθίδρυση, την αντιγραφή και την ένθεση του ρετροϊού, αλλά δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Στις *in cis* συμπεριλαμβάνονται α) τα ιικά LTR, β) οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής, γ) το σήμα πακεταρίσματος ψ και δ) και το τρινοκλεοτίδιο att που είναι παρόν στο άκρο των LTR τα οποία απαιτούνται για την ένθεση του ικού γονιδιώματος. Οι λειτουργίες που μπορούν να παρασχεθούν *in trans* περιλαμβάνουν τις ικές

πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τους γενετικούς τόπους *gag*, *pol* και *env*<sup>18</sup>.

Η παραγωγή του φορέα προκύπτει με τον διαχωρισμό του ρετροϊκού γονιδιώματος σε δύο διακριτά πλασμίδια έκφρασης που αντιστοιχούν στις δύο λειτουργικές οντότητες που προαναφέρθηκαν (Εικόνα 3). Το πλασμίδιο φορέας (ή πλασμίδιο μεταφοράς) διαθέτει όλες τις *in cis* δρώσες αλληλουχίες και το προς έκφραση γονίδιο κλωνοποιημένο μεταξύ των LTR. Τα βοηθητικά πλασμίδια (ή πλασμίδια πακεταρίσματος) παράγουν όλες τις ικές πρωτεΐνες. Όταν τα δύο πλασμίδια συν-διαμολύνουν ένα κύτταρο, ο πλασμιδιακός φορέας παράγει ένα μόριο RNA που φέρει την αλληλουχία εγκαθίδρυσης ψ. Αυτό το ψ+RNA μπορεί να επικαλυφθεί από τις ρετροϊκές πρωτεΐνες και να απελευθερωθεί από το κύτταρο ως ένα ρετροϊκό ιοσωμάτιο. Το ιοσωμάτιο είναι ικανό να μεταγεί ένα άλλο κύτταρο, αλλά εφόσον δεν κωδικοποιεί στο γενετικό του υλικό κανένα άλλο δομικό ή λειτουργικό ικό γονίδιο, περιορίζεται σε ένα μόνο κύκλο μεταγωγής. Τα βοηθητικά πλασμίδια, όταν εντεθούν μόνιμα σε μία κυτταρική σειρά, αυτή πλέον ονομάζεται κυτταρική σειρά πακεταρίσματος.

Αφού η διαμόλυνση (μεταφορά πλασμιδίου) είναι μια



**Εικόνα 3.** Παραγωγή ενός ρετροϊκού φορέα. Το ικό γονιδίωμα χωρίζεται σε δύο πλασμίδια. Το πλασμίδιο φορέας περιέχει όλες τις ικές αλληλουχίες που δρουν *in cis*, το διαγονίδιο και ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό· το πλασμίδιο βοηθός φέρει τα γονίδια που παράγουν τις ικές πρωτεΐνες. Μια κυτταρική σειρά διαμολύνεται και με τα δύο πλασμίδια και το μόριο RNA του φορέα που φέρει την αλληλουχία ψ που λειτουργεί ως σήμα πακεταρίσματος, καλύπτεται από τις ικές πρωτεΐνες για να σχηματίσει το ρετροϊκό σωματίο. Οι κυτταρικές σειρές που εκφράζουν συστατικά τα γονίδια *gag*, *pol* και *env* ονομάζονται κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος.

σχετικώς μη αποδοτική οδός γονιδιακής μεταφοράς που συχνά οδηγεί σε ανασυνδυασμό του DNA, οι τίτλοι του ιού που προκύπτουν είναι χαμηλοί και χρειάζονται βελτιστοποίηση. Αυτό επιτυγχάνεται με ένα δεύτερο βήμα επιμόλυνσης (μεταφορά φορέα) που στοχεύει στην απομόνωση κλώνων που παράγουν υψηλό τίτλο ισοωματίων<sup>19,20</sup>. Στο βήμα αυτό, οι φορείς που παράχθηκαν από το πρώτο κύκλο της διαμόλυνσης, χρησιμοποιούνται για να επιμολύνουν ξανά μία κυτταρική σειρά πακεταρίσματος. Τα επιμολυσμένα κύτταρα επιλέγονται με θετική επιλογή για την ανθεκτικότητα σε κάποιο αντιβιοτικό (το γονίδιο ανθεκτικότητας κωδικοποιείται από τον ικό φορέα) και οι ανθεκτικοί κλώνοι στη συνέχεια ελέγχονται για την ακεραιότητα της αλληλουχίας του φορέα και για τον αριθμό των παραγόμενων ισοωματίων. Οι κλώνοι με υψηλή έκφραση και ακέραιους προίους επιλέγονται και καταψύχονται. Αυτοί οι κλώνοι παραγωγοί παρέχουν μια αστείρευτη πηγή κυττάρων παραγωγής ισοωματίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επαναλαμβανόμενα πειράματα.

### Χρησιμότητα και κίνδυνοι των ρετροϊκών φορέων

Η κύρια ιδιότητα των ρετροϊκών φορέων που τους καθιστά ένα ελκυστικό μέσον για πειράματα γονιδιακής μεταφοράς είναι η ικανότητά τους να ενσωματώνονται μόνιμα στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Η ιδιότητα αυτή οδήγησε στην ευρεία χρήση των φορέων αυτών για τη γονιδιακή μεταφορά σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπου η σταθερή επιμόλυνση προκαλεί τη συνεχή έκφραση του γονιδίου στα διαφοροποιημένα κύτταρα. Επιπλέον, οι φορείς αυτοί δεν είναι παθογόνοι στον άνθρωπο και δεν προκαλούν ανοσολογική απόκριση. Ένας μεζών περιορισμός της χρήσης των ογκορετροϊών στη γονιδιακή θεραπεία είναι ότι μπορούν να μετάγουν μόνο κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κύκλο<sup>10</sup>. Για να ξεπεραστεί το εμπόδιο αυτό, αναπτύχθηκαν φορείς από τους FV και τους Lentί που έχουν την ικανότητα να μετάγουν μη διαιρούμενα κύτταρα (φάση G0).

Οι πιθανοί κίνδυνοι από τη χρήση αυτού του συστήματος φορέων σχετίζονται με το δυναμικό της ένθεσης τους. Παρόλο που η ικανότητα ένθεσης είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό των φορέων, μπορεί εν τούτοις να προκαλέσει προβλήματα α) όταν ο φορέας εντεθεί εντός ενός γονιδίου προκαλώντας σωματική μετάλλαξη (μεταλλαξιγένεση λόγω ένθεσης) και β) όταν τα γονίδια που εδράζονται κοντά στη θέση ένθεσης του ικού φορέα αρχίσουν να εκφράζονται ανεξέλεγκτα λόγω των υποκινητών LTR του ιού. Αυτά τα γεγονότα έχουν καταγραφεί σε κλινικές μελέτες και έχουν αποτελέσει την αιτία επανασχεδιασμού των διαδικασιών<sup>21</sup>. Ο κίνδυνος παραγωγής ενός ιού ικανού για πολλαπλασιασμό που μπορεί να μεταδοθεί (replication competent), είναι ανύπαρκτος με τα

διαθέσιμα συστήματα πακεταρίσματος που έχουν διανείμει τα βοηθητικά πλασμίδια σε 4 διαφορετικούς φορείς.

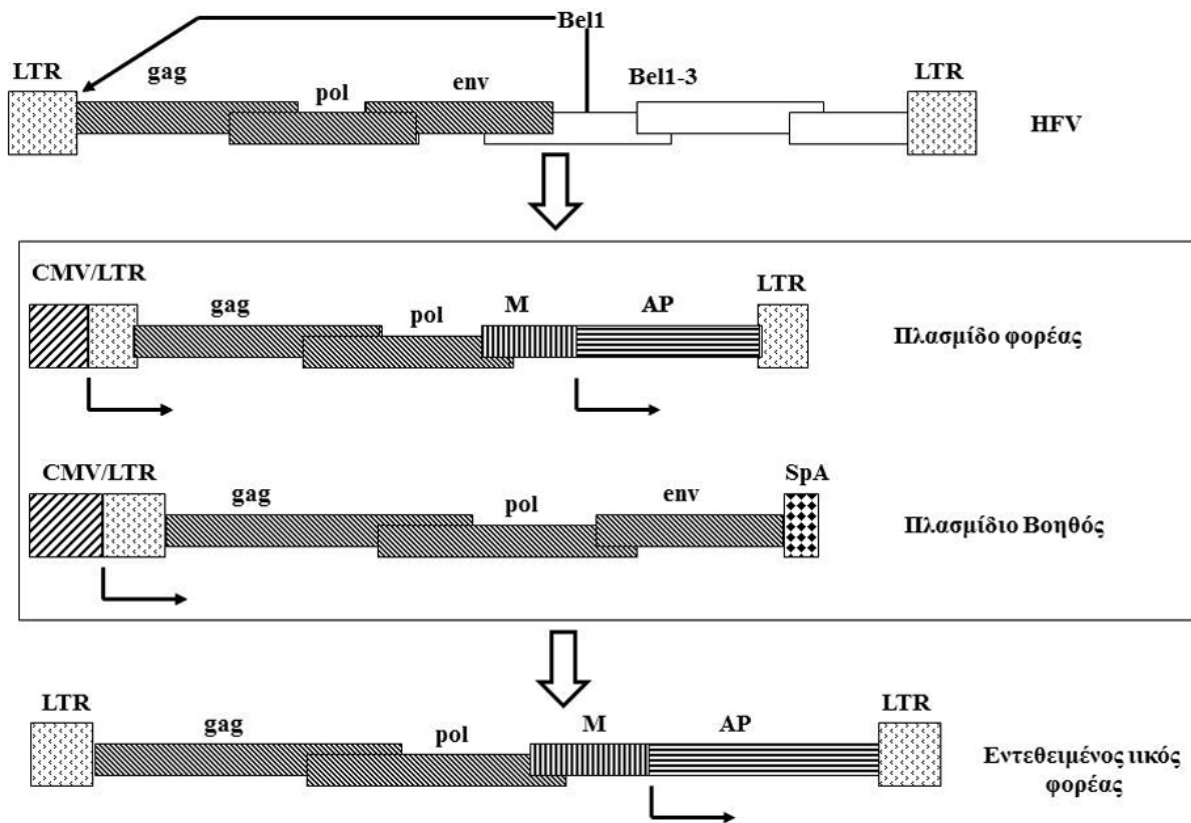
### Οι FV ικοί φορείς

Οι FV ιοί είναι μη παθογόνοι για τον άνθρωπο και είναι ικανοί να μολύνουν ένα ευρύ φάσμα κυττάρων διαφορετικών ειδών θηλαστικών, πιθανά λόγω της καθολικής έκφρασης του κυτταρικού υποδοχέα του ιού. Ο ανθρώπινος FV (HFV) απομονώθηκε από καρκίνωμα του ρινοφάρυγγα, αλλά πιο πρόσφατα στοιχεία έδειξαν ότι πρόκειται για μία παραλλαγή του FV του χιμπατζή. Το γονιδίωμα του FV περιέχει τους κλασσικούς γονιδιακούς τόπους gag, pol και env που είναι κοινοί όλων των ρετροϊών καθώς και τρία επιπλέον γονίδια που εντοπίζονται μεταξύ του γενετικού τύπου env και του 3'LTR (Εικόνα 4). Το προϊόν ενός εξ αυτών (Bel-1) είναι trans-ενεργοποιητής του 5'LTR και είναι απολύτως απαραίτητο για την παραγωγή του ιού<sup>22</sup>. Για χρήση σε γονιδιακή μεταφορά, έχουν αναπτυχθεί φορείς ανεξάρτητοι από τον trans-ενεργοποιητή με αντικατάσταση του 5'LTR από τον υποκινητή του CMV<sup>23</sup> (Εικόνα 4). Εφόσον κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος δεν είναι προς το παρόν διαθέσιμες, η παραγωγή του φορέα επιτυγχάνεται με διαμόλυνση με 4 πλασμίδια (πλασμίδιο φορέα και 3 πλασμίδια πακεταρίσματος). Ένα ελκυστικό χαρακτηριστικό του FV συστήματος αυτού είναι ότι στον εντεθειμένο φορέα, τα LTR είναι αποσιωπημένα λόγω της έλλειψης της πρωτεΐνης Bel-1 και της απάλειψης του υποκινητή U3 (ΔFV) από τον 3'LTR<sup>24</sup>, γεγονός που ελαχιστοποιεί την πιθανότητα ακούσιας ενεργοποίησης οποιουδήποτε γονιδίου εντοπίζεται καθοδικά από το σημείο ένθεσης του ιού.

Οι ΔFV φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιμόλυνση αιμοποιητικών κυττάρων επίμους με μακροπρόθεσμη ικανότητα εποίκισμού σε πείραμα μεταμόσχευσης. Η έκφραση του διαγονιδίου διατηρήθηκε για πάνω από 6 μήνες και σε όλα τα είδη των αιμοποιητικών κυττάρων, γεγονός που δηλώνει διαμόλυνση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων<sup>25</sup>. Αυτά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν με ανθρώπινα CD34<sup>+</sup> που μεταμοσχεύθηκαν σε NOD-SCID επίμους καθιστώντας τον φορέα αυτό μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική αντί των MLV φορέων<sup>26</sup>.

### Λεντιϊκοί φορείς

Η ικανότητα του ιού της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) να επιμολύνει κύτταρα στη φάση G0 του κυτταρικού κύκλου τροφοδότησε το ενδιαφέρον για να γίνει ο HIV ένα μέσο γονιδιακής μεταφοράς για κύτταρα που βρίσκονται εκτός κυτταρικού κύκλου. Η δομή του HIV-1, του λεντιού που χρησιμοποιείται συχνότερα για την ανάπτυξη λεντιϊκών φορέων φαίνεται στην Εικόνα 5. Εκτός

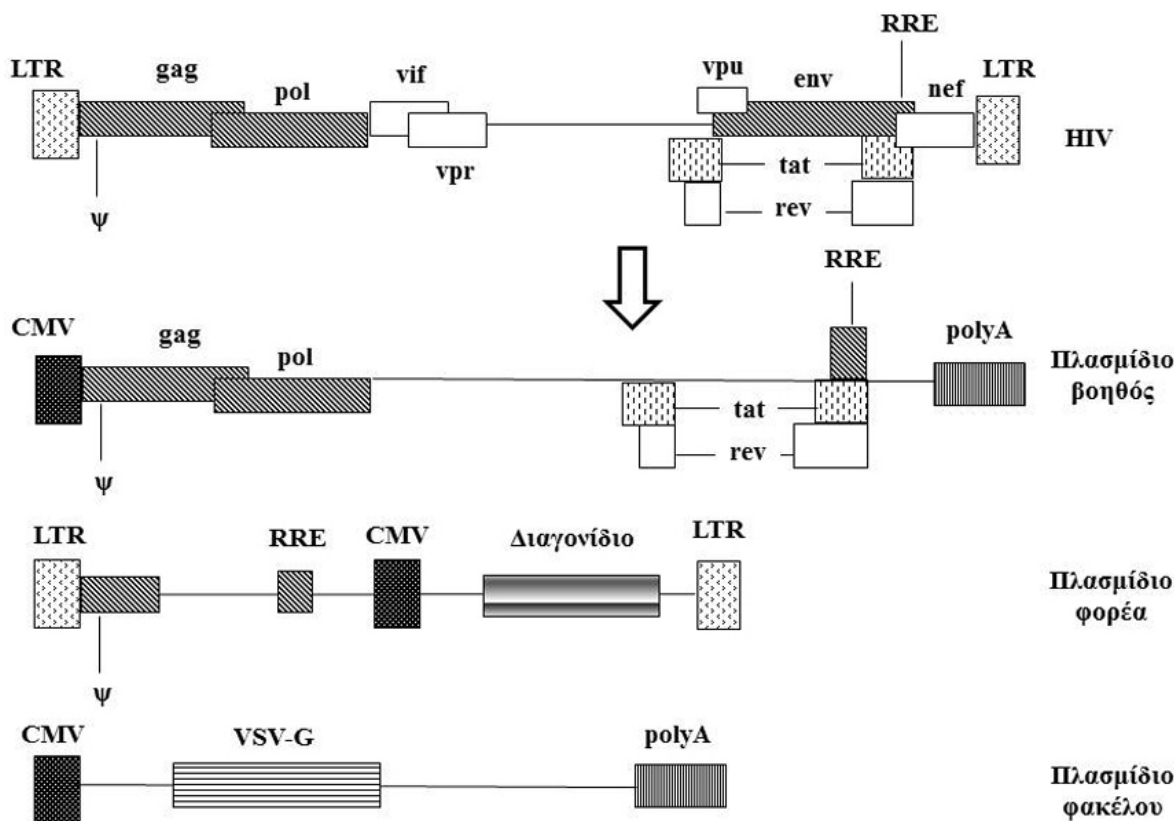


**Εικόνα 4.** Το σύστημα του φορέα του ανθρώπινου FV. Ο αγρίου τύπου ανθρώπινος FV φαίνεται στην κορυφή της εικόνας. Ο ιός διαθέτει τα τυπικά γονίδια gag, pol και env των ρετροϊών και τρία επιπλέον γονίδια που εδράζονται μεταξύ του γονιδίου env και του LTR (Bel1-3). Το προϊόν του γονιδίου Bel-1 αποτελεί τρανς-ενεργοποιητή του 5' LTR· ένας ασθενής υποκινητής, οποίος είναι παρόν στο άκρο του γονιδιακού τόπου env ελέγχει την παραγωγή της πρωτεΐνης Bel-1 που απαιτείται για την έναρξη της μεταγραφής από τον ισχυρό υποκινητή του LTR. Για να παραχθεί ένα σύστημα φορέα ανεξάρτητο από την Bel-1, το 5' LTR απαλείφεται μερικώς και συντήκεται με τον υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) σχηματίζοντας ένα συντηγμένο υποκινητή CMV/LTR. Στο πλασμίδιο φορέα ο υποκινητής αυτός ελέγχει τη μεταγραφή των γονιδίων gag και pol, ενώ ένας εσωτερικά τοποθετημένος υποκινητής (M) ελέγχει την έκφραση ενός γονιδίου μάρτυρα (εν προκειμένω του γονιδίου της αλκαλικής φωσφατάσης (AP)). Στο πλασμίδιο βοηθό, ο συντηγμένος υποκινητής ελέγχει την έκφραση των γονιδίων gag, pol και env, ενώ ένα σήμα 3' πολυαδενυλίωσης εξασφαλίζει την μετάφραση του ιικού RNA και την παραγωγή των πρωτεϊνών βοηθών. Μετά τη διαμόλυνση μιας κυτταρικής σειράς και την αντίστροφη μεταγραφή, το 5' LTR του πλασμιδίου φορέα «αναγεννιέται» από το άθικτο 3' LTR καταλήγοντας σε μια εντεθιμένη δομή όπως φαίνεται στο κάτω μέρος της εικόνας· εφόσον το Bel-1 είναι απόν, το LTR του FV είναι αποσιωπημένο και ο μόνος ενεργός υποκινητής είναι ο εσωτερικός (M) που ελέγχει την έκφραση του γονιδίου AP.

από τα τυπικά στοιχεία των ρετροϊών LTR, gag, pol και env, ο ιός κωδικοποιεί στο γονιδιώμα του δύο επιπλέον ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Tat και Rev) και τέσσερις βοηθητικές πρωτεΐνες (Vpr, Vif, Vpru και Nef). Η ικανότητα επιμόλυνσης μη διαιρούμενων κυττάρων αποδίδεται στα σήματα πυρηνικού εντοπισμού των πρωτεϊνών της μήτρας, της ιντεγκράσης, καθώς και της βοηθητικής πρωτεΐνης Vpr<sup>27,28</sup>. Τα σήματα είναι υπεύθυνα για τη «διακίνηση» του συμπλόκου προ-ένθεσης στο πυρήνα, χωρίς να είναι απαραίτητη η αποδόμηση του πυρηνικού φακέλου.

Η ανάπτυξη των λεντικών φορέων (Εικόνα 5) απαιτούσε αρχικά αλλαγή στον τροπισμό του ιού από τον φυσικό του υποδοχέα (CD4 μόριο) και επετεύχθη με την

ψευδοτύπωση του φορέα με τον φάκελο του ιού της φλυκταινώδους στοματίτιδας (VSV-G). Στη συνέχεια, απαλείφθηκαν οι ιικές πρωτεΐνες - βοηθοί αφού είχε αποδειχθεί ότι δεν ήταν απαραίτητες για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του ιού. Οι γονιδιακοί τόποι tat και rev διατηρήθηκαν αφού αποδείχτηκε ότι διευκόλυναν την αποδοτική κυτταροπλασματική εξαγωγή και μετάφραση του RNA του φορέα. Ο 5' LTR υποκινητής υποκαταστάθηκε από έναν ισχυρό υποκινητή (CMV), ο οποίος είναι ιδιαίτερος ενεργός στην κυτταρική σειρά που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του φορέα. Η παραγωγή του λεντικού φορέα προϋποθέτει τη συν-διαμόλυνση με πλασμίδιο πακεταρίσματος και με το πλασμίδιο του φορέα ενώ



**Εικόνα 5.** Διάγραμμα του ιού HIV και του συστήματος φορέα τριών πλασμιδίων. Η πολύπλοκη γονιδιακή οργάνωση του αγρίου τύπου του ιού HIV απεικονίζεται στην κορυφή της εικόνας: ένα σύνολο 15 πρωτεϊνών εκφράζονται από αλληλεπικαλυπτόμενα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (απεικονίζονται από αλληλεπικαλυπτόμενα ορθογώνια παραλληλόγραμμα). Στο πλασμίδιο βοηθό, η έκφραση των γονιδιακών τόπων που κωδικοποιούν τα gag, pol, rev και tat ελέγχεται από τον υποκινητή CMV. Το σήμα πακεταρίσματος ψ και ο γονιδιακός τόπος env έχουν απαλειφθεί: το στοιχείο που αποκρίνεται στο rev (RRE) στο άκρο του γονιδιακού τόπου env έχει διατηρηθεί. Στο πλασμίδιο φορέα, όλες οι *in cis* δρώσες αλληλουχίες (LTR, RRE και ψ) έχουν διατηρηθεί: Η έκφραση του διαγονιδίου ελέγχεται από έναν ισχυρό υποκινητή (όπως ο υποκινητής CMV). Το πλασμίδιο του φακέλου παρέχει τον ιικό φάκελο του ιού της φλυκταινώδους στοματίτιδας (VSV-G). Οι ιικοί φορείς παράγονται μέσω παροδικής διαμόλυνσης και με τα τρία πλασμίδια στην κυτταρική σειρά 293T, μια κυτταρική σειρά από ανθρώπινο εμβρυϊκό νεφρό.

η συλλογή των ισοσωμάτων πραγματοποιείται 48 έως 72 ώρες αργότερα<sup>11</sup>. Οι λεντικοί φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί για να επιμολύνουν έναν αριθμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων συμπεριλαμβανομένων κυττάρων του επιθηλίου των αεραγωγών, των φωτοϋποδοχέων του αμφιβληστροειδούς, νευρώνων, της γλοίας, του ήπατος, του ενδοθηλίου, καρδιακών μυοκυττάρων και αιμοποιητικών κυττάρων. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι λεντικοί φορείς που έχουν υποστεί ψευδοτύπωση με τον φάκελο VSV-G είναι ικανοί να επιμολύνουν ανθρώπινα CD34+ κύτταρα απουσία κυτταροκινών<sup>29</sup>. Παρόλα αυτά το θέμα της εξάρτησης από το στάδιο του κυτταρικού κύκλου για την επιτυχή λεντική επιμόλυνση δεν έχει ακόμα επιλυθεί και είναι πιθανόν να είναι ιστο-ειδική. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν επιμόλυνση ηπατικών κυττάρων συμβαίνει μόνο μετά από διέγερση του κυτταρικού κύκλου<sup>30</sup>. Η σύγχρονη άποψη είναι ότι οι λεντικοί φορείς

μπορούν να εισέλθουν στον πυρήνα όπου είναι πολύ σταθεροί υπό μια επισωματική μορφή αλλά η αντίστροφη μεταγραφή και η ένθεση δεν συμβαίνουν μέχρις ότου το κύτταρο να μπει τουλάχιστον στη φάση G1b του κυτταρικού κύκλου<sup>31</sup>.

### ΑδENO-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς (AAV)

Ο AAV είναι ένας μη παθογόνος παρβοϊός με ένα γονιδίωμα DNA μήκους 4.7kb, το οποίο περιέχει 2 πλαίσια ανάγνωσης, το *cap* και το *rep*, που κωδικοποιούν τις δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού αντίστοιχα<sup>32</sup>. Υπάρχουν 8 ορότυποι AAV με διαφορετική ιστο-τροπισμό. Η κωδικοποιούσα αλληλουχία βρίσκεται εκατέρωθεν δύο αναστραμμένων ακραίων αλληλουχιών (ITR) σε κάθε πλευρά, οι οποίες είναι οι μόνες αλληλουχίες *in cis* που απαιτούνται για τη συναρμολόγηση του ισοσωμα-

τίου και την αντιγραφή (Εικόνα 6). Ο ιός προσδένεται στα κύτταρα μέσω της πρωτεογλυκάνης θειική επαράνη, του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF-R) και της ιντεγκρίνης  $\alpha\beta 5^{33,34}$ . Μετά την εισαγωγή του ισοωματίου στο κύτταρο, ο ιός μεταφέρεται στον πυρήνα, το ικό γονιδίωμα απελευθερώνεται και συντίθεται η συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Προς το παρόν είναι ασαφείς οι παράγοντες που καθορίζουν την τύχη του γονιδιώματος του AAV. Τόσο η επισωματική όσο και η εντεθειμένη μορφή έχουν καταγραφεί και έχει αποδειχτεί ότι η  $\alpha$  ένθεση ενισχύεται κατά την επιδιόρθωση του DNA στη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου<sup>35</sup>. Μία ενδιαφέρουσα ιδιότητα του ιού, είναι ότι εντίθεται κατά προτίμηση σε μία θέση του χρωμοσώματος 19, ένα χαρακτηριστικό που αποδίδεται στην παρουσία μιας θέσης δέσμησης της πρωτεΐνης Rep στο χρωμόσωμα αυτό<sup>36</sup>. Η ένθεση των AAV που δεν διαθέτουν το γονίδιο της Rep, γίνεται τυχαία στο γονιδίωμα<sup>37</sup>.

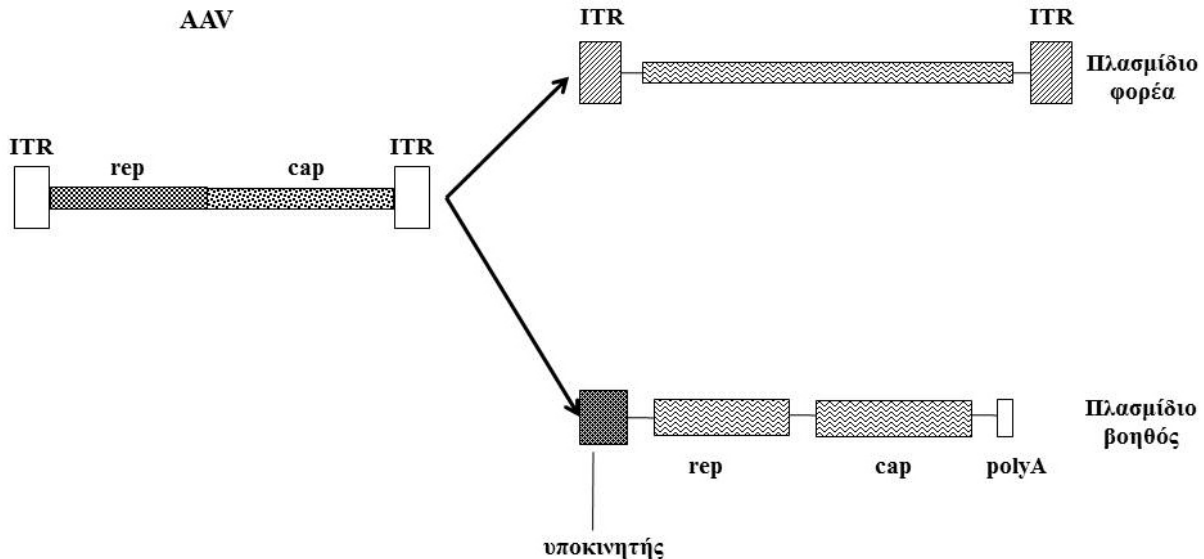
**Παραγωγή των AAV φορέων**

Η βασική αρχή που διέπει την παραγωγή των ρετροϊικών φορέων με τις *cis* και *trans* λειτουργίες υφίσταται επίσης και στην ανάπτυξη των φορέων AAV. Η παραγωγή

του φορέα προϋποθέτει τη συνδιαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα και με ένα βοηθητικό πλασμίδιο, που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες Rep και Cap, παρουσία αδενοϊού. Σε ένα τυπικό πλασμιδιακό AAV φορέα έχουν διατηρηθεί μόνο οι αλληλουχίες ITR, ενώ όλο το γονιδίωμα του AAV έχει υποκατασταθεί από το διαγονίδιο και τον υποκινητή του (Εικόνα 6). Τα κύτταρα λύνονται 2 με 3 μέρες αργότερα και ο ικός φορέας συγκεντρώνεται μετά από φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας χλωριούχου καισίου (CsCl). Ο υπολειμματικός αδενοϊός που μπορεί να παραμένει στο συγκεντρωμένο φορέα αδρανοποιείται μετά από θερμική επεξεργασία.

**Επιμόλυνση από AAV φορείς**

Ανάλυση της δομής των AAV φορέων που είχαν επιμολύνει κυτταρικές σειρές σε πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι ο φορέας AAV εντίθεται ως ένα μόνο αντίγραφο ανά γονιδίωμα<sup>38</sup>. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν διαφορετικό σε σχέση με τα *in vivo* πειράματα όπου τα μικρά γονιδιώματα του AAV βρέθηκαν να σχηματίζουν μακρομοριακές δομές με μεγάλο μοριακό βάρος (γνωστές ως concatamers)<sup>39</sup>. Η διαδικασία της μετατροπής αυτής μελετήθηκε στο ήπαρ και αποδείχθηκε ότι χρειάζονται τουλάχιστον 5 εβδομά-



**Εικόνα 6.** Η γονιδιακή οργάνωση των AAV και των φορέων που προέρχονται από τους AAV. Ο αγρίου τύπου AAV διαθέτει ένα μονόκλωνο μόριο DNA ως γονιδίωμα με μήκος περίπου 4,7 kb το οποίο φέρει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τα *rep* και *cap*, που κωδικοποιούν 4 πρωτεΐνες πολλαπλασιασμού και 3 καψιδιακές πρωτεΐνες. Το γονιδίωμα παισιώνεται από δύο αναστραμμένες ακραίες επαναλήψεις (ITR), οι οποίες αποτελούν τις μόνες απαραίτητες δομές *in cis* για την ιική αντιγραφή και συναρμολόγηση του ισοωματίου. Αυτές οι αλληλουχίες διατηρούνται στο πλασμίδιο φορέα, ενώ το υπόλοιπο ικό γονιδίωμα υποκαθίσταται από τις αλληλουχίες του διαγονιδίου. Το πλασμίδιο βοηθός εκφράζει τις βοηθητικές πρωτεΐνες από τα γονίδια *rep* και *cap* και η έκφραση βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή. Για την παραγωγή του AAV φορέα, τα πλασμίδια φορέα και βοηθός συν-διαμολύνουν μια κυτταρική σειρά παρουσία αδενοϊού, ο οποίος παρέχει άλλες απαραίτητες πρωτεΐνες για την παραγωγή του AAV ιικού φορέα. Μετά από 2-3 ημέρες τα κύτταρα λύνονται και ο AAV ικός φορέας απομονώνεται με φυγοκέντρηση διαβάθμισης πυκνότητας επί στρώματος CsCl, ενώ ο υπολειμματικός αδενοϊός απομακρύνεται μέσω αδρανοποίησης με θερμότητα.

δες για να πάψουν να υφίστανται οι μορφές με το χαμηλό μοριακό βάρος και να εμφανιστούν τα concatamers<sup>40</sup>. Η έκφραση από τα concatamers μπορεί να προκύψει είτε από την επισωματική είτε την εντεθειμένη μορφή, γεγονός που καθιστά τους φορείς AAV κατάλληλους για εφαρμογές γονιδιακής μεταφοράς και σε αδρανή αλλά και σε διαιρούμενα κύτταρα.

### Χρησιμότητα των φορέων AAV

Πολλοί τύποι ιστών έχουν επιμολυνθεί επιτυχώς από φορείς AAV μετά από χορήγηση *in vivo* (μυς, αμφιβληστροειδής, πνεύμων, ΚΝΣ και ήπαρ)<sup>39-44</sup>. Η χρήση των AAV ως μέσον γονιδιακής μεταφοράς διερευνήθηκε για αρκετούς λόγους. Είναι μη παθογόνοι, διαθέτουν υψηλό δυναμικό ένθεσης, ικανοποιητική χωρητικότητα κλωνοποίησης και ένα σχετικά απλό από άποψη δομής γονιδίωμα και απλό κύκλο ζωής. Μεταφορά φορέων AAV σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα δεν έχει επιτευχθεί<sup>45</sup>. Οι φορείς AAV έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για να επιμολύνουν μυϊκά και ηπατικά κύτταρα με σκοπό τη θεραπεία της Αιμορροφιλίας Β. Δύο ζωικά μοντέλα της Αιμορροφιλίας Β έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα σε προκλινικές μελέτες. Και στα δύο μοντέλα θεραπευτικά επίπεδα έκφρασης του F9 της πήξης επιτεύχθηκαν μετά από χορήγηση ισοσωματιών AAV μέσω έγχυσης στην πυλαία φλέβα ή μετά από ενδομυϊκή χορήγηση<sup>46,47</sup>. Τα σημαντικά προ-κλινικά δεδομένα των φορέων AAV για την *in vivo* επιδιόρθωση της ανεπάρκειας του F9 στα μοντέλα της ασθένειας έδωσαν το πλαίσιο πάνω στο οποίο στηρίχτηκε η επιτυχημένη κλινική εφαρμογή της τεχνολογίας<sup>48</sup>. Ένα ακόμα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των φορέων AAV που μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο μελλοντικά στη θεραπεία γενετικών διαταραχών, αποτελεί η ικανότητά τους να στοχεύουν αποδοτικά ομόλογες αλληλουχίες DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή και να επιφέρουν συγκεκριμένες τροποποιήσεις στο DNA<sup>49</sup>.

### Περιορισμοί των φορέων AAV

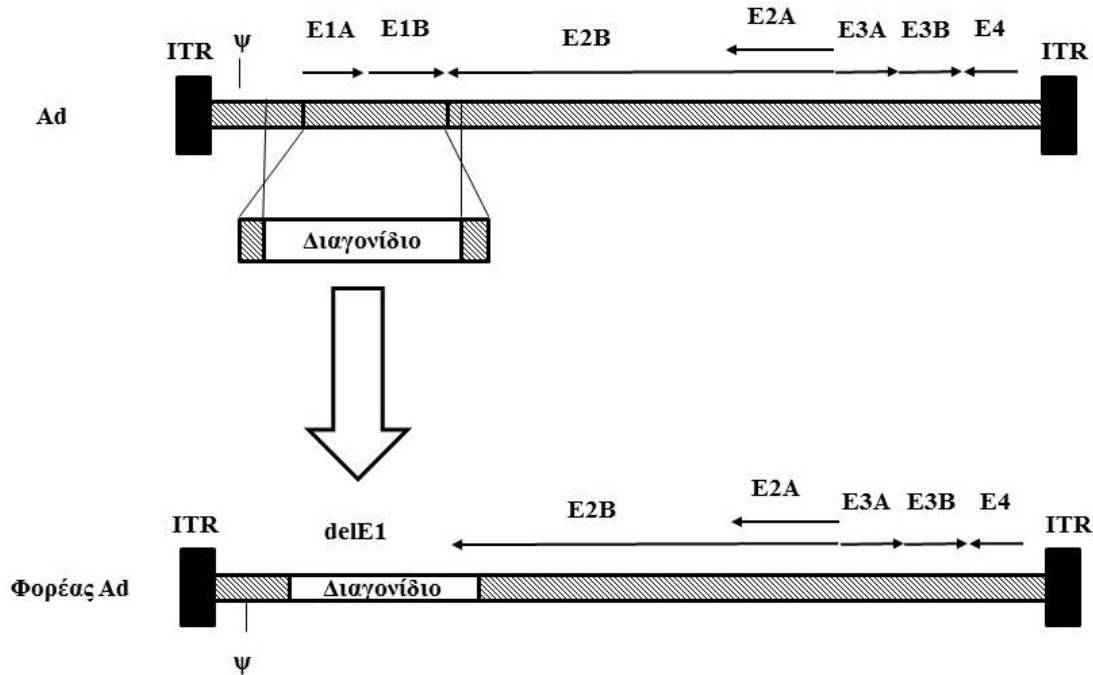
Το μόνο μείζον πρόβλημα των φορέων AAV είναι η χωρητικότητα κλωνοποίησής τους. Με τους διαθέσιμους φορείς αυτή περιορίζεται σε 4kb, γεγονός που τους αποκλείει από τη μεταφορά μεγάλων γονιδίων. Άλλα προβλήματα περιλαμβάνουν τη μεγάλη μεταβλητότητα της απόδοσης επιμόλυνσης ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, χαμηλά ποσοστά επιμόλυνσης *in vivo* μετά από επαναχορήγηση του φορέα, και η παρουσία αδρανοποιητικών αντισωμάτων ενάντια στον AAV στο 60% του ανθρώπινου πληθυσμού<sup>50</sup>. Παρόλο που η βιολογική σημασία των αντισωμάτων αυτών δεν έχει αξιολογηθεί με *in vivo* μελέτες, είναι αναμενόμενο ότι θα περιορίζουν την απόδοση της επιμόλυνσης των AAV φορέων *in vivo*.

### Αδενοϊκοί φορείς

Οι αδενοϊκοί αποτελούν ιούς με δίκλωνο DNA, με μέγεθος 36kb, που περιβάλλονται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί 49 διαφορετικοί ορότυποι του ανθρώπινου αδενοϊκού που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες του αναπνευστικού, επιπεφυκίτιδα, και εντερίτιδα<sup>51</sup>. Ο ιός καλύπτεται από πρωτεϊνικό καψίδιο που έχει τη μορφή εικοσάεδρου με 12 μακριές ράβδους να προεξέχουν από τις ακμές του. Το μεγαλύτερο μέρος της μάζας του καψιδίου αποτελείται από την πρωτεΐνη εξόνη, ενώ τα άλλα δύο συστατικά του (η βάση πεντόνης και η ράβδος) σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα σε κάθε μία από τις 12 ακμές που προεξέχουν του ισοσωματίου. Ο ιός προσκολλάται στα κύτταρα μέσω της αλληλεπίδρασης της πρωτεϊνικής ράβδου με τον υποδοχέα του αδενοϊκού Coxsackie (CAR, δέσμευση υψηλής συγγένειας) και μέσω της αλληλεπίδρασης της βάσης πεντόνης με την ιντεγκρίνη αV (χαμηλής συγγένειας δέσμευση)<sup>52,53</sup>. Μετά την προσκόλληση και την ενδοκυττάρωση, ο ιός μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ξεκινά η μεταγραφή και η αντιγραφή του γονιδιώματός του, περίπου 6-8 ώρες περίπου μετά τη μόλυνση. Το πολύπλοκο γονιδίωμα του αδενοϊκού συνοψίζεται στην Εικόνα 7. Οργανώνεται σε 4 κωδικοποιούσες περιοχές (ονομαζόμενες E1 έως E4), οι οποίες συνορεύουν πλευρικά με δύο ακραίες πλευρικές επαναλήψεις (ITR) με μήκος 103 bp και φέρουν ένα σήμα πακεταρίσματος δίπλα στο 5' ITR. Η περιοχή E1 κωδικοποιεί αποπτωτικές πρωτεΐνες που επάγουν τον κυτταρικό θάνατο του κυττάρου ξενιστή και η δράση τους εξισορροπείται από μία ομάδα πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται από την περιοχή E2. Η περιοχή E3 κωδικοποιεί πρωτεΐνες που τροποποιούν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και η E4 πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την όψιμη γονιδιακή έκφραση.

### Παραγωγή του αδενοϊκού φορέα

Οι διαθέσιμοι αδενοϊκοί φορείς (Ad) έχουν προέλθει από τους αδενοϊκούς που ανήκουν στους ορότυπους 2 και 5. Αυτοί οι ορότυποι επελέγησαν γιατί έχουν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού και είναι μη ογκογόνοι στα ζωικά μοντέλα<sup>54</sup>. Η βασική αρχή που διέπει την ανάπτυξη των Ad φορέων είναι παρόμοια με εκείνη των ρετροϊών. Οι αλληλουχίες που είναι απαραίτητες *in cis* διατηρούνται στη γονιδιακή κατασκευή του πλασμιδίου φορέα, ενώ η γονιδιακή κατασκευή του πλασμιδίου βοηθού παρέχει τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη συναρμολόγηση του ιικού φορέα. Ad φορείς ανίκανοι πολλαπλασιασμού, παρήχθησαν αρχικά με απαλοιφή της περιοχής E1 και αντικατάστασής της από το διαγονίδιο. Οι απαλοιφές προκαλούνται μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ 2 στοιχείων ενός πλήρους Ad γονιδιώματος και ενός πλασμιδίου που φέρει ένα διαγονίδιο που περιβάλλεται από



**Εικόνα 7.** Διαγραμματική αναπαράσταση της παραγωγής του απαλειμένου E1 αδενοϊκού φορέα. Το μήκους 36 kb γονιδίωμα του αδενοϊού απεικονίζεται στο επάνω μέρος της εικόνας. Το γονιδίωμα οργανώνεται σε τέσσερις λειτουργικές επικράτειες (E1 έως 4) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ποικίλες λειτουργίες. Οι κωδικοποιούσες περιοχές πλαισιώνονται από δύο αναστραμμένες ακραίες επαναλήψεις (ITR), ενώ το σήμα πακεταρίσματος  $\Psi$  βρίσκεται δίπλα στο 5' ITR. Τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση των πρώιμων μεταγράφων. Η παραγωγή του E1 απαλειμένου Ad φορέα εξαρτάται από την επιτυχή ανασυνδυασμό μεταξύ του Ad γονιδιώματος και ενός πλασμιδίου που φέρει το διαγονίδιο. Το διαγονίδιο πλαισιώνεται από αλληλουχίες DNA που εδράζονται ανοδικά και καθοδικά της περιοχής E. Μετά από διαμόλυνση μιας κυτταρικής σειράς και με τα δύο πλασμίδια, ο ανασυνδυασμός μεταξύ των ομόλογων περιοχών έχει ως αποτέλεσμα την εκτομή της περιοχής E1 και την εισαγωγή του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του Ad. Μια παρόμοια στρατηγική μπορεί να εφαρμοστεί για να παραχθούν Ad φορείς με απαλοιφές σε άλλες περιοχές του γονιδιώματος τους.

αλληλουχίες ομόλογες με τις περιοχές όπου πρόκειται να πραγματοποιηθεί η ένθεση (Εικόνα 7)<sup>55</sup>. Οι ιικοί φορείς παράγονται στην κυτταρική σειρά 293T, η οποία περιέχει τις E1 πρωτεΐνες. Αυτό το σύστημα είναι εξαιρετικά αποδοτικό και μπορεί να παράγει συνήθως  $10^{11}$  ιοσωμάτια/ml. Παρόλα αυτά οι φορείς με απαλοιφή της περιοχής E1 έχουν περιορισμένη κλωνοποιητική χωρητικότητα (περίπου 7kb) και διατηρούν ένα βαθμό κυτταροτοξικότητας αφού το 80% του ιικού γονιδιώματος διατηρείται. Οι προσπάθειες επίλυσης του προβλήματος αυτού έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη φορέων με μεγαλύτερες απαλοιφές, όπως απαλοιφή E1/E2 και E3/E4<sup>56</sup>. Μακροχρόνια έκφραση του διαγονιδίου με αυτούς τους ιικούς φορείς που φέρουν τις απαλοιφές έχει περιγραφεί *in vivo* αλλά η ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης από τις Ad πρωτεΐνες διέγειρε την έρευνα για την ανάπτυξη φορέων χωρίς αδενοϊκά γονίδια (επονομαζόμενοι και gutless)<sup>57-59</sup>. Μείζον πλεονέκτημά τους είναι η μειωμένη κυτταροτοξικότητα και η χωρητικότητα που ξεπερνά τα 30kb αλλά επιδεικνύουν αστάθεια του γονιδιώματός ενώ αποδίδουν χαμηλούς ιικούς τίτλους.

### Χρησιμότητα Ad φορέων

Οι φορείς αυτοί είναι κατάλληλοι για χορήγηση *in vivo* αφού δεν αδρανοποιούνται από το ανθρώπινο σύμπληρωμα. Μπορούν να παραχθούν με υψηλούς τίτλους και να επιμολύνουν ένα μεγάλο εύρος διαιρούμενων και αδρανών κυττάρων μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών, τα ηπατοκύτταρα<sup>60</sup> καθώς και ένα σημαντικό αριθμό νεοπλασμάτων.

### Περιορισμοί των Ad φορέων

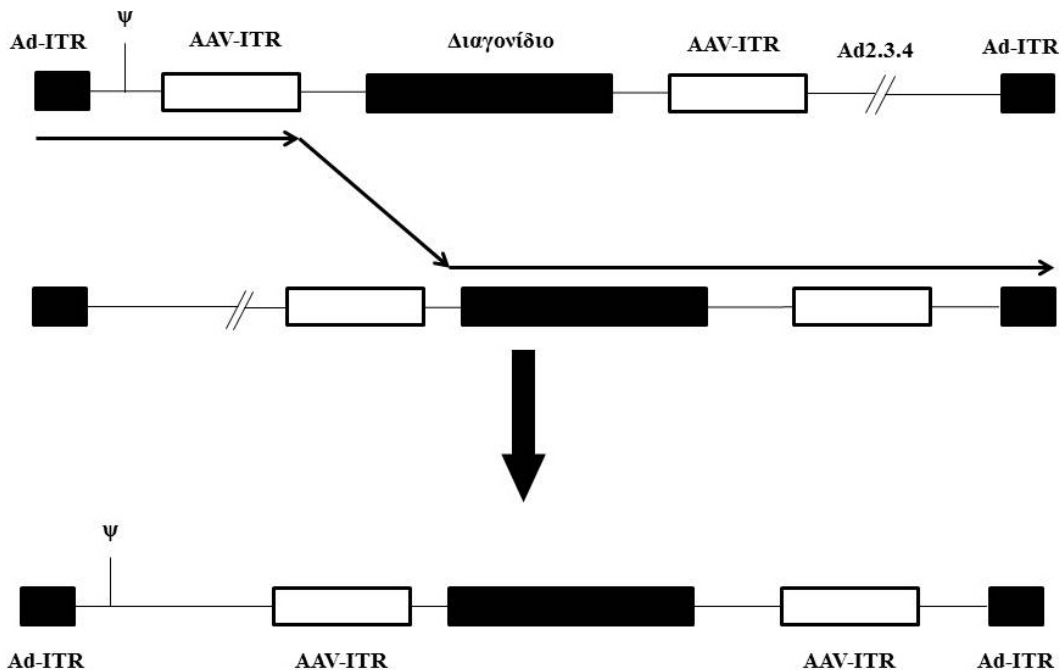
Το κύριο εμπόδιο στο πεδίο ανάπτυξης των φορέων Ad είναι ότι ο ιός είναι ανοσογονικός και αδρανοποιείται ταχέως μετά από επαναχορήγηση. Για την επίλυση του προβλήματος της ανοσογονικότητας έχουν γίνει προσπάθειες να αφαιρεθούν από το φορέα όλες οι περιοχές που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του ιού. Παρόλα αυτά, έχει αποδειχτεί ότι ακόμα και πλήρως αδρανοποιημένοι ιοί μπορούν να εγείρουν ανοσολογικές αποκρίσεις, οι οποίες πιθανά προκαλούνται από τα πρωτεϊνικά συστατικά του καμινιδίου.

ου του ιοσωματίου<sup>61</sup>. Οι ερευνητικές προσπάθειες για την επίλυση του προβλήματος αυτού επικεντρώνονται στην τροποποίηση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή στο διάστημα της χορήγησης (παρεμπόδιση της δράσης του TNF-α ή του προσδέτη CD40)<sup>62</sup>. Ένας άλλος περιορισμός με τους Ad ιικούς φορείς είναι ότι ο ανθρώπινος πληθυσμός διαθέτει ήδη αντισώματα για τον ορότυπο 5, γεγονός το οποίο θα περιορίζει τη βιοδιαθεσιμότητα των ιικών φορέων σε *in vivo* χορήγηση. Η λύση σ' αυτό επιχειρείται να δοθεί με την παραγωγή ενός Ad ιικού φορέα με χημειρικές πρωτεΐνες καψιδίου που θα διαφεύγουν της εκκαθάρισης/του ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρόλα αυτά η παρουσία αντισωμάτων δεν επηρεάζει την *in situ* χορήγηση του ιικού φορέα (παραδείγματος χάριν έγχυση εντός της μάζας του στερεού όγκου)<sup>63</sup>. Τέλος οι Ad φορείς δεν είναι κατάλληλοι για μόνιμη διόρθωση γονιδιακών νόσων αφού δεν ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή.

### Υβριδικοί Άδενο-AAV (AdAAV) φορείς

Η ιδέα πίσω από την ανάπτυξη των φορέων αυτών

είναι η παραγωγή ενός συστήματος γονιδιακής μεταφοράς που θα κατείχε τα επιθυμητά χαρακτηριστικά καθενός εκ των αρχικών ιών. Οι φορείς AdAAV συνδυάζουν την υψηλή απόδοση παραγωγής και τον ευρύ τροπισμό των Ad ιικών φορέων με την ικανότητα των AAV ιικών φορέων να εντίθενται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Στην ουσία, αυτοί οι Ad ιικοί φορείς χρησιμοποιούν το γονιδίωμα ενός AAV φορέα, πλήρες με τα ITR, το οποίο έχει κλωνοποιηθεί στον γονιδιακό τόπο E1 του αδενοϊού (Εικόνα 8). Κατά τη διάρκεια της παραγωγής του ιικού φορέα σε μία κυτταρική σειρά πακεταρίσματος, η αναδιάταξη του DNA οδηγεί στο σχηματισμό ενός γονιδιώματος εντός των αδενοϊικών ITR, που περιλαμβάνει το σήμα πακεταρίσματος του αδενοϊού και το τμήμα του AAV γονιδιώματος του ιικού φορέα. Αυτό το ιικό γονιδίωμα μπορεί να πακεταριστεί με το καψίδιο του αδενοϊού και να χρησιμοποιηθεί ώστε να επιμολύνει τα κύτταρα στόχους, ενώ μπορεί επίσης να εντεθεί στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή μέσω των AAV ITR που διαθέτει<sup>64</sup>. Τέτοιοι φορείς μπορούν να παραχθούν σε υψηλούς σε υψηλούς τίτλους, ενώ η ανοσογονικότητά τους αναμένεται να είναι σημαντικά μειωμένη αφού δεν περιέχουν καμία από τις αδενοϊικές πρωτεΐνες.



**Εικόνα 8.** Διαγραμματική απεικόνιση ενός υβριδικού Άδενο-AAV ιικού φορέα. Ο γονικός Ad ιικός φορέας στην κορυφή της εικόνας διαθέτει ένα AAV φορέα κλωνοποιημένο στη θέση της Ad περιοχής E1. Μετά τη διαμόλυνση σε ένα κύτταρο παραγωγό, οι ομόλογες περιοχές των γονιδιωμάτων των Ad φορέων ανασυνδυάζονται και η DNA πολυμεράση μπορεί να αλλάξει εκμαγεία (όπως υποδηλώνεται και από τα βέλη): το καθαρό αποτέλεσμα είναι η εκτομή του υπόλοιπου Ad γονιδιώματος και η παραγωγή ενός μικρού μεγέθους φορέα DNA. Αυτός ο μικρός φορέας υβρίδιο διατηρεί τα σήματα πακεταρίσματος του Ad και μπορεί να πακεταριστεί ως ένα αδενοϊικό σωματίο. Επιπλέον, η παρουσία των AAV-ITR επιτρέπει την αποδοτική ένθεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή.



## Συμπεράσματα

Το πρώτο πείραμα γονιδιακής μεταφοράς με ρετροϊκό φορέα σε κύτταρα θηλαστικού πραγματοποιήθηκε πριν από 30 χρόνια περίπου, ενώ η πρώτη κλινική μελέτη σε ανθρώπους για την έλλειψη της ADA συμπληρώνει πλέον τα 24 έτη και θεωρείται επιτυχημένη. Αποδοτική γονιδιακή μεταφορά σε πολλούς ιστούς στόχους επετεύχθη και *in vitro* και *in vivo*, αλλά υπάρχουν πολλά σημεία που χρήζουν βελτίωσης προτού η γονιδιακή θεραπεία να μπορεί να αποδώσει το πλήρες φάσμα των δυνατοτήτων της. Τα πεδία όπου αναμένονται μελλοντικές βελτιώσεις είναι α) η ειδική και αποδοτική ως προς τον κυτταρικό τύπο γονιδιακή μεταφορά, μέσω ιών που έχει τροποποι-

ηθεί ο φάκελός τους, β) η ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδιακού προϊόντος από στοιχεία που αποκρίνονται σε φαρμακευτικές ουσίες και τα οποία εμπεριέχονται στον θεραπευτικό ιικό φορέα, γ) η εντοπισμένη ένθεση του θεραπευτικού φορέα σε συγκεκριμένο σημείο του γονιδιώματος και η *in situ* επιδιόρθωση μονογονιδιακών διαταραχών και δ) η μακροχρόνια έκφραση από τους ιικούς φορείς, οι οποίοι είναι κατάλληλα μονωμένοι από την περιβάλλουσα χρωματίνη<sup>65</sup>. Εφόσον τα περισσότερα από τα παραπάνω ζητήματα επιλυθούν, η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να παρέχει λύσεις σε έναν αριθμό προβλημάτων όπου η παραδοσιακή φαρμακολογία είναι κάθε άλλο παρά επιτυχημένη.

---

## Basic principles of viral gene therapy vectors

by George Vassilopoulos<sup>1,2</sup>, Manolis Simantirakis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Affiliate Investigator Cell and Gene Therapy Laboratory, BRFAA, Athens, <sup>2</sup>Division of Hematology, Larisa University Hospital, University of Thessaly, Greece

**ABSTRACT** Gene transfer technology has been developed based on retroviruses, AAV and adeno-viruses. The basic principle for every vector development is based on the delineation of the regulatory *in cis* sequences and the helper *in trans* functions. Next technological steps have focused on the choice of proper promoters and chromatin insulators. Although vector improvements over the last 30 years are substantial and have led to clinical trials, the technology is still costly and has significant side effects from insertional mutagenesis. This has resulted in a shift towards gene editing technology and the use of vectors that can mediate genetic correction *in situ* (such as AAV).

---

## Βιβλιογραφία

- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*. 1993; 260:926-932.
- Miller AD, Eckner RJ, Jolly DJ et al. Expression of a retrovirus encoding human HPRT in mice. *Science*. 1984; 225:630-632.
- Williams DA, Lemischka IR, Nathan DG, Mulligan RC. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature*. 1984; 310:476-480.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1997.
- Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:11407-11413.
- Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, et al. Cell surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:7071-7075.
- Kiem HP, Heyward S, Winkler A, et al. Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood*. 1997; 90:4638-4645.
- Kiem HP, Andrews RG, Morris J et al. Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood*. 1998; 92:1878-1886.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [see comments]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:8033-8037.
- Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection [published erratum appears in *Mol Cell Biol*. 1992; 12:433]. *Mol Cell Biol*. 1990; 10: 4239-4242.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [see comments]. *Science*. 1996; 272:263-267.

12. Russell DW, Miller AD. Foamy virus vectors. *J Virol.* 1996; 70:217-222.
13. Schliephake AW, Rethwilm A. Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. *J Virol.* 1994; 68:4946-4954.
14. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]. *Nature.* 1993; 365:666-669.
15. Chen WY, Bailey EC, McCune SL, et al. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:5798-5803.
16. Challita PM, Kohn DB. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:2567-2571.
17. Robbins PB, Skelton DC, Yu XJ, et al. Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:10182-10187.
18. Miller AD, Miller DG, Garcia JV, Lynch CM. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.* 1993; 217:581-599.
19. Miller AD. Retroviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992; 158:1-24.
20. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol.* 1986; 6:2895-2902.
21. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008; 118:3132-3142.
22. Lochelt M, Muranyi W, Flügel RM. Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:7317-7321.
23. Trobridge GD, Russell DW. Helper-free foamy virus vectors. *Hum Gene Ther.* 1998; 9:2517-2525.
24. Chatziandreou I, Siapati EK, Vassilopoulos G. Genetic correction of X-linked chronic granulomatous disease with novel foamy virus vectors. *Exp Hematol.* 2011;39:643-652.
25. Vassilopoulos G, Trobridge G, Josephson NC, Russell DW. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. *Blood.* 2001;98:604-609.
26. Josephson NC, Vassilopoulos G, Trobridge GD, et al. Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:8295-8300.
27. Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:9825-9830.
28. Gallay P, Stitt V, Mundy C, et al. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol.* 1996; 70:1027-1032.
29. Miyoshi H, Smith ÉÁ, 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
30. Park F, Ohashi K, Chiu W, et al. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. *Nat Genet.* 2000; 24:49-52.
31. Korin YD, Zack JA. Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. *J Virol.* 1998; 72:3161-3168
32. Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992; 158:97-129.
33. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 1998; 72:1438-1445.
34. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection [see comments]. *Nat Med.* 1999; 5:78-82.
35. Russell DW, Alexander IE, Miller AD. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92:5719-5723.
36. Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM, Owens RA. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:5808-5812.
37. Rutledge EA, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration junctions. *J Virol.* 1997; 71:8429-8436.
38. Yang CC, Xiao X, Zhu X, et al. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol.* 1997; 71:9231-9247.
39. Fisher KJ, Jooss K, Alston J, et al. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med.* 1997; 3:306-312.
40. Miao CH, Snyder RO, Schowalter DB, et al. The kinetics of rAAV integration in the liver [letter]. *Nat Genet.* 1998; 19:13-15.
41. Koeberl DD, Alexander IE, Haibert CL, et al. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:1426-1431.
42. Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, et al. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet.* 1994; 8:148-154.
43. Flotte TR, Afione SA, Conrad C, et al. Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:10613-10617.
44. Hargrove PW, Vanin EF, Kurtzman GJ, Nienhuis AW. High-level globin gene expression mediated by a recombinant adeno-associated virus genome that contains the 3' gamma globin gene regulatory element and integrates as tandem copies in erythroid cells. *Blood.* 1997; 89:2167-2175.
45. Russell DW, Kay MA. Adeno-associated virus vectors and hematology. *Blood.* 1999; 94:864-874.
46. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung SH, et al. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:5804-5809.

47. Snyder RO, Miao C, Meuse L, et al. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors [see comments]. *Nat Med.* 1999; 5:64-70.
48. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2011; 365:2357-2365.
49. Russell DW, Hirata RK. Human gene targeting by viral vectors [see comments]. *Nat Genet.* 1998; 18:325-330.
50. Haibert CL, Standaert TA, Wilson CB, Miller AD. Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol.* 1998; 72:9795-9805.
51. Yeh P, Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *Faseb J.* 1997; 11:615-623.
52. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* 1997; 275:1320-1323.
53. Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993; 73:309-319.
54. Hitt MM, Addison CL, Graham FL. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol.* 1997; 40:137-206.
55. Crouzet J, Naudin L, Orsini C, et al. Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:1414-1419.
56. Lusky M, Christ M, Rittner K, et al. In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol.* 1998; 72:2022-2032.
57. Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol.* 1996; 70:8934-8943.
58. Clemens PR, Kochanek S, Sunada Y, et al. In vivo muscle gene transfer of full-length dystrophin with an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Gene Ther.* 1996; 3:965-972.
59. Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, et al. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and betagalactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:93:93-97.
60. Morsy MA, Gu M, Motzel S, et al. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:7866-7871.
61. Kafri T, Morgan D, Krahl T, et al. Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:11377-11382.
62. Yang Y, Su Q, Grewal IS, et al. Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. *J Virol.* 1996; 70:6370-6377.
63. Bramson JL, Hitt M, Gaudie J, Graham FL. Preexisting immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination. *Gene Ther.* 1997; 4:1069-1076.
64. Lieber A, Steinwaerder DS, Carlson CA, Kay MA. Integrating adenovirus-adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J Virol.* 1999; 73:9314-9324.
65. Emery DW, Yannaki E, Tubb J, Stamatoyannopoulos G. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:9150-9155.

## Η τεχνολογία της γονιδιακής μεταφοράς: Μη-ϊικοί φορείς

Αριστέιδης Γιαννακόπουλος, Ελέανα Φ. Σταύρου, Αγλαΐα Αθανασιάδου

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Οι μη-ϊικοί φορείς γονιδιακής μεταφοράς είναι συνήθως πλασμίδια, η βασική δομή των οποίων περιλαμβάνει το προς μεταφορά γονίδιο ή διαγονίδιο με τον κατάλληλο υποκινητή, μια θέση έναρξης της αντιγραφής του DNA και συνήθως, ένα γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για την ανάπτυξη τους σε βακτήρια. Οι μη-ϊικοί φορείς δεν έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς του DNA τους σε κύτταρα και έτσι απαιτείται η χρήση μεθόδων φυσικών ή χημικών προς τον σκοπό αυτό. Το κύριο πλεονέκτημα τους είναι η μη ενσωμάτωση τους στο ενδογενές γενετικό υλικό του κυττάρου και έτσι αποφεύγεται η πρόκληση ογκογένεσης και σχετικών προβλημάτων των ιικών φορέων. Απόρροια αυτού είναι και το κύριο μειονέκτημα των μη-ϊικών φορέων, καθότι η μη ενσωμάτωση στερεί από αυτούς τη δυνατότητα του πλήρους μιτωτικού διαχωρισμού που ακολουθούν τα χρωμοσώματα, με αποτέλεσμα το πλασμίδιο να μην βρίσκεται σε όλα τα θυγατρικά κύτταρα και να παρατηρείται το φαινόμενο της «απόλειας πλασμιδίων» σε αναπτυσσόμενους κυτταρικούς πληθυσμούς. Ως εκ τούτου, ένα μέρος της έρευνας με μη-ϊικούς φορείς εστιάζεται στον προσδιορισμό πρόσθετων στοιχείων, που είναι σε θέση να προσδώσουν στον φορέα τη δυνατότητα εγκατάστασης στον πυρήνα του κυττάρου για μακρύ χρονικό διάστημα ως μια αυτόνομη, αναπαραγόμενη μονάδα γενετικού υλικού. Οι κύριοι μη-ϊικοί φορείς είναι οι αναπαραγόμενοι επισωματικοί φορείς και τα παράγωγα τους. Οι πρώτοι παραμένουν στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή ως αυτόνομες αναπαραγόμενες μονάδες και ο διπλασιασμός του DNA τους εξασφαλίζεται από ειδική θέση έναρξης της αντιγραφής, που προέρχεται από ένα ιό, οι πιο αναπτυγμένοι από τον ιό EBV και κυρίως τον SV40. Οι φορείς αυτοί έχουν γίνει ικανοί να εγκαθίστανται στον πυρήνα με την προσθήκη ενός τμήματος από το DNA του ανθρώπου που λέγεται Scaffold/Matrix Attachment Region - S/MAR. Τα S/MAR περιοχές πλούσιες σε TA, βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα και έχουν τον ρόλο του σχηματισμού 'συνόρου' (boundary element) μεταξύ των διαφόρων περιοχών χρωματίνης (chromatin loops) και της πρόσδεσης των χρωμοσωμάτων στη θεμέλια ουσία του πυρήνα ώστε να εξυπηρετείται η αρχιτεκτονική του κυττάρου και η μεταγραφή του διαγονιδίου του. Τέτοιοι φορείς έχει δείχθει ότι είναι λειτουργικοί σε πειράματα *in vitro* καθώς και *in vivo* με πειράματα σε οργανισμούς. Ιδιαίτερα, έχει δείχθει ότι είναι ικανοί για σταθερή διαμόλυνση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων CD34+ και ότι υποστηρίζουν την έκφραση αιμοσφαιρινικών γονιδίων. Παράγωγα των αναπαραγόμενων επισωματικών φορέων είναι δύο τύποι φορέων, που δεν φέρουν προκαρυωτικές αλληλουχίες DNA: (1) Ο φορέας pFAR (free of antibiotic resistance) που εκ κατασκευής, δεν περιέχει γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό. Ως εκ τούτου δεν είναι δυνατή η παραγωγή του σε κοινά βακτήρια, παρά μόνο σε ειδικό στέλεχος της E. Coli. (2) Ο φορέας τύπου minicircle, κυκλικός μη ιικός φορέας που περιέχει μόνο την ευκαρυωτική κασέτα που φέρει το διαγονίδιο και παράγεται μέσω ανασυνδυασμού *in vivo* από ένα αρχικό πλασμίδιο. Τέλος, στους μη-ϊικούς φορείς εντάσσεται και ο φορέας του συστήματος τρανσποζονίου/τρανσποζάσης SB100X, ο οποίος ενσωματώνεται στο γενετικό υλικό και συνδυάζει σταθερή και μακρά έκφραση του διαγονιδίου, ενώ η ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα θεωρείται ασφαλέστερη από αυτή των ρετροϊών διότι είναι τυχαία, χωρίς προτίμηση σε εξόνια ή αλληλουχίες ρυθμιστικών περιοχών. Το σύστημα SB έχει χρησιμοποιηθεί σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές.

Haema 2016; 7(1): 72-80 Copyright EAE

## Εισαγωγή

Οι μη ιικοί φορείς γονιδιακής μεταφοράς αποτελούνται γενικά από ένα “γυμνό” μόριο νουκλεϊκού οξέος χωρίς πρωτεΐνες (“naked DNA”), το οποίο συνήθως είναι πλασμιδιακό DNA. Το πλασμίδιο αυτό φέρει το διαγονίδιο, η έκφραση του οποίου ελέγχεται από κατάλληλο υποκινητή, ίσως και άλλα ρυθμιστικά στοιχεία, μια αρχή της αντιγραφής του DNA καθώς και γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικό για την επιλογή των διαμολυσμένων κυττάρων (προκαρυωτικών ή/και ευκαρυωτικών). Οι πλασμιδιακοί φορείς έχουν εξελιχθεί αρκετά ώστε να επιτυγχάνεται αποδοτική μεταφορά και μακρόχρονη έκφραση γονιδίων σε κύτταρα διαφόρων ιστών, με απώτερο σκοπό τη γονιδιακή θεραπεία. Περίπου το 25% των κλινικών πρωτοκόλλων γονιδιακής θεραπείας που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα βασίζονται σε πλασμιδιακούς φορείς<sup>1</sup>. Πολλές ερευνητικές ομάδες, έχουν εξελίξει τους πλασμιδιακούς φορείς σε βαθμό τέτοιο ώστε να επιτυγχάνεται αποδοτική μεταφορά και μακρόχρονη έκφραση γονιδίων σε κύτταρα διαφόρων ιστών με σκοπό τη γονιδιακή θεραπεία.

Θα παρουσιαστούν τα κύρια πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των μη-ϊικών φορέων καθώς και οι τρόποι μεταφοράς τους σε κύτταρα ή οργανισμούς. Περαιτέρω θα παρουσιαστούν οι πλέον αναπτυγμένοι τύποι μη-ϊικών φορέων, οι οποίοι είναι οι επισωματικοί φορείς, τα πλασμίδια pFAR και minicircle, και το τραπεζοειδές Sleeping Beauty.

## Κύρια πλεονεκτήματα των ιικών φορέων γονιδιακής μεταφοράς

Τα μη ιικά συστήματα, θεωρητικά, μπορούν να γίνουν πιο εύκολα αποδεκτά στην κλινική πράξη ως μοντέλο γονιδιακής θεραπείας, από ότι τα ιικά συστήματα γονιδιακής μεταφοράς. Και αυτό γιατί εμφανίζουν μερικά βασικά πλεονεκτήματα όπως:

1) Έχουν πολύ μικρή έως μηδαμινή πιθανότητα να δημιουργήσουν κάποιο αυτό-αναπαραγόμενο σύστημα επικίνδυνο για τον οργανισμό κατά τα στάδια παραγωγής τους όπως μπορεί να γίνει με τα ιικά συστήματα. Παρόλο που η ασφάλεια των ιικών φορέων έχει εξελιχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό η θεωρητική πιθανότητα κάποιου πιθανού ανασυνδυαστικού γεγονότος δεν είναι μηδενική<sup>2,3</sup>.

2) Τα μη ενσωματούμενα μη ιικά συστήματα έχουν πολύ μικρότερη πιθανότητα πρόκλησης διαταραχών στο γονιδίωμα από ενσωμάτωση, ένα υπαρκτό πρόβλημα των ιικών συστημάτων<sup>4</sup> και με δραματικές συνέπειες σε προηγούμενες κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας<sup>5,6</sup>.

3) Δυνητικά μπορεί να έχουν μικρότερη τοξικότητα και ανοσογονικότητα για το κύτταρο λόγω απουσίας προκαρυωτικών αλληλουχιών.

4) Η παραγωγή τους σε μεγάλη κλίμακα για κλινικές δοκιμές είναι αρκετά πιο εύκολη από αυτή των ιικών συστημάτων και λιγότερο πολύπλοκη καθ' όσον, (α) δεν περιλαμβάνει κυτταρικούς βιο-αντιδραστήρες όπως απαιτείται για την παραγωγή ιικών σωματιδίων και (β) δεν επιβάλλεται συνεχής παρακολούθηση και έλεγχος όπως στα ιικά συστήματα, για την αποφυγή φαινομένων ανασυνδυασμού κατά τη διάρκεια της παραγωγής τους<sup>7,8</sup>.

5) Δεν έχουν τους περιορισμούς που προκύπτουν από τον τροπισμό των ιικών συστημάτων και επομένως έχουν τη δυνατότητα να μεταφέρουν γονίδια και να υποστηρίξουν την έκφραση τους σε οποιοδήποτε ιστό, εφόσον φέρουν τον κατάλληλο ιστό-ειδικό υποκινητή.

6) Έχουν τη δυνατότητα μεταφοράς μεγάλων τμημάτων DNA, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα μεταφοράς και ρυθμιστικών αλληλουχιών μαζί με το γονίδιο.

## Κύρια μειονεκτήματα των μη ιικών φορέων

- Σχετικά χαμηλή και παροδική διαμόλυνση που επιτυγχάνουν<sup>9</sup>
- Αυξημένη πιθανότητα απώλειας του πλασμιδίου κατά τη μιτωτική διαίρεση του κυττάρου
- Πιθανή αποσιώπηση της έκφρασης του διαγονιδίου που φέρει το πλασμίδιο
- Πιθανή τοξικότητα των χημικών κυρίως μέσω γονιδιακής μεταφοράς (όπως τα λιποσώματα) χωρίς ωστόσο να υπάρχουν βάσιμα ανησυχητικά δεδομένα.

## Τρόποι μεταφοράς γενετικού υλικού στα κύτταρα ή οργανισμό

Οι μη ιικοί -πλασμιδιακοί - φορείς, αντίθετα με τους ιικούς φορείς-- δε έχουν ίδια ικανότητα εισόδου στα κύτταρα και χρειάζεται να συνδυαστούν με μια μέθοδο γονιδιακής μεταφοράς, φυσική ή χημική. Η διαδικασία μεταφοράς ενός εξωγενούς γενετικού υλικού στα ευκαρυωτικά κύτταρα ονομάζεται *διαμόλυνση*. Γενικά, το προς μεταφορά μόριο DNA (ή RNA) έρχεται σε επαφή με την κυτταρική μεμβράνη και εισέρχεται στο κύτταρο με κάποια φυσική ή χημική μέθοδο. Η ανάπτυξη διαφόρων μεθόδων οφείλεται στην ανάγκη για γονιδιακή μεταφορά σε διαφορετικούς ιστούς ανάλογα με το είδος της γονιδιακής θεραπείας. Οι κύριες τεχνικές οι οποίες έχουν αναπτυχθεί είναι οι εξής:

### 1) Διαμόλυνση με χρήση λιποσωμάτων (*lipofection*)

Τα επονομαζόμενα λιποσώματα ή λιποσυμπλέγματα, δηλαδή μικκύλια θετικά φορτισμένων λιπιδίων που περιτοιχίζουν το μόριο DNA μπορούν να εισέλθουν στο

κύτταρο και να απελευθερώσουν το DNA στο κυτταρόπλασμα<sup>10,11</sup>. Επίσης τα κατιονικά λιπίδια μπορούν να στοχεύσουν ακόμα και ειδικούς τύπους κυττάρων με τη χρήση κατάλληλων συνδετών στη δομή τους προσφέροντας ιστο-ειδικότητα.

## 2) Ηλεκτρομεταφορά ή ηλεκτροδιάτρηση (electroporation)

Η εφαρμογή μικρών σε χρονική διάρκεια ηλεκτρικών παλμών οδηγεί στη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη. Έτσι τμήματα ή κυκλικά μόρια DNA όπως πλασμίδια μπορούν να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα<sup>12</sup>.

## 3) Μεταφορά στον πυρήνα ή πυρηνοδιάτρηση (Nucleofection)

Αποτελεί μια ηλεκτροχημική διαδικασία που είναι συνδυασμός των δύο ανωτέρω μεθόδων. Εμφανίζει το πλεονέκτημα ότι ευνοεί την εισαγωγή του DNA απευθείας μέσα στον πυρήνα μέσω επαγόμενων πόρων στην πυρηνική μεμβράνη. Είναι η τεχνική που έχει επικρατήσει τα τελευταία χρόνια λόγω της υψηλής της απόδοσης για τη διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων με διάφορους πλασμιδιακούς φορείς και όχι μόνο<sup>13</sup>.

## 4) Ένεση με εφαρμογή υδροδυναμικής πίεσης

Η γρήγορη ενδοφλέβια ένεση ικανού όγκου υγρού που περιέχει το μεταφερόμενο γενετικό υλικό σε πειραματόζωα δημιουργεί ροή τέτοια ώστε το DNA να εισάγεται κυρίως στα ηπατικά κύτταρα μέσω της πυλαίας φλέβας. Το μεταφερόμενο DNA μπορεί να ανιχνευθεί και σε άλλα όργανα<sup>14</sup>.

## 5) Αερολυματοποίηση του DNA

Η δημιουργία αερολύματος διαφόρων συμπλεγμάτων-DNA και η εισπνοή αυτού είναι χρήσιμη για τη μεταφορά γενετικού υλικού στον πνεύμονα και την προσπάθεια θεραπείας κυρίως της κυστικής ίνωσης<sup>15</sup>. Λόγω της συχνότητας και της βαρύτητας της νόσου η μέθοδος αυτή μελετηθεί και εξελιχθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό.

## 6) Μεταφορά γενετικού υλικού με τη χρήση υπερήχων

Η εφαρμογή παλμών υπερηχητικών κυμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πόρων και την εισαγωγή του DNA στα κύτταρα. Έχει χρησιμοποιηθεί σε γονιδιακή μεταφορά τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*<sup>16</sup>.

## 7) Γονιδιακή μεταφορά με βομβαρδισμό σφαιριδίων

Στην περίπτωση αυτή το DNA καθιλώνεται επάνω σε νάνο-σφαιρίδια που συνήθως είναι από χρυσό. Τα επικαλυμμένα με DNA σφαιρίδια τα προωθούνται με ταχύτητα στο δέρμα με τη βοήθεια ρεύματος αερίου. Η μέθοδος αυτή αποδοτική στη μεταφορά DNA στην επιδερμίδα<sup>17</sup>.

## 8) Ένεση γυμνού DNA με βελόνη

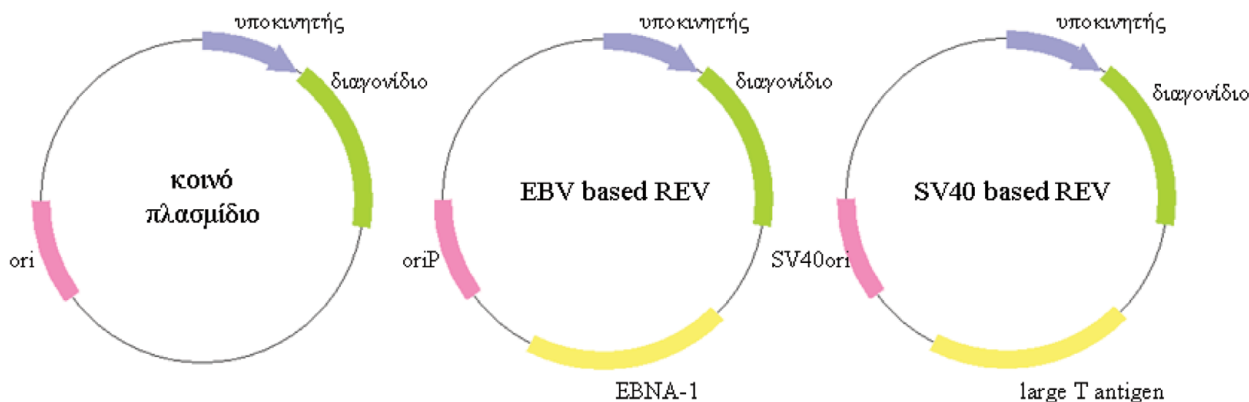
Έχει εφαρμοστεί κυρίως για τη διαμόλυνση μυϊκών ινών από γυμνό DNA<sup>18</sup>.

## Οι αναπαραγόμενοι επισωματικοί φορείς

Οι αναπαραγόμενοι επισωματικοί φορείς (replicating episomal vectors, REVs) είναι μη-ϊικοί φορείς που έχουν την ιδιότητα να παραμένουν στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή ως επισώματα, αυτόνομες αναπαραγόμενες μονάδες γενετικού υλικού, συνήθως χωρίς ενσωμάτωση στα χρωμοσώματα του κυττάρου. Ως εκ τούτου, εμφανίζουν το μεγάλο πλεονέκτημα να μην αλληλεπιδρούν με το γονιδίωμα και να μην διαταράσσουν τα μεταγραφικά προγράμματα του κυττάρου-ξενιστή<sup>19,20</sup>. Ο διπλασιασμός του DNA σε αυτά τα πλασμίδια εξασφαλίζεται με την παρουσία ειδικών περιοχών “Εναρξης της Αντιγραφής”, που προέρχεται από ένα ιό (Εικόνα 1).

Τα επισώματα αυτά φέρουν γονίδια για τις πρωτεΐνες, τις EBNA-1 και Large T-Antigen, οι οποίες είναι τοξικές για τα κύτταρα. Τα πλασμίδια που περιέχει την αρχή διπλασιασμού DNA του ιού SV40 αποτέλεσε τη βάση ανάπτυξης επισωματικών φορέων που δεν περιέχουν το γονίδιο Large T-Antigen και ως εκ τούτου βρίσκονται σε λίγα αντίγραφα στα κύτταρα.

Ένα βασικό πρόβλημα των επισωματικών φορέων είναι το ότι χάνονται σιγά-σιγά καθώς αυξάνονται οι κυτταρικές διαιρέσεις, εκτός αν είναι σε θέση να εγκατασταθούν στον πυρήνα του κυττάρου ως αυτόνομα επισώματα, ικανά να διαχωριστούν σωστά κατά τη μίτωση. Η διατήρηση της επισωματικής κατάστασης των φορέων αυτών είναι δυνατόν να επιτευχθεί με την προσθήκη ενός στοιχείου S/MAR (Scaffold/Matrix Attachment Region). Τα στοιχεία S/MAR ανήκουν στα “boundary elements” χρωματίνης, καθότι συμβάλλουν στην οργάνωση των αγκύλων της χρωματίνης που καθορίζουν τα όρια ανεξάρτητων περιοχών της μέσω αλληλεπίδρασης με την πυρηνική θεμέλια ουσία<sup>21,22</sup>. Η ανακάλυψη του ρόλου των S/MARs στη διαμεσολάβηση της επισωματικής διατήρησης γενετικών στοιχείων *in cis* επέτρεψε την ανάπτυξη του πρότυπου μικρού κυκλικού φορέα, του rEPI-1, που περιέχει το S/MAR προερχόμενο από την 5’ περιοχή του ανθρώπινου γονιδίου της ιντερφερόνης β και έχει την ιδιότητα

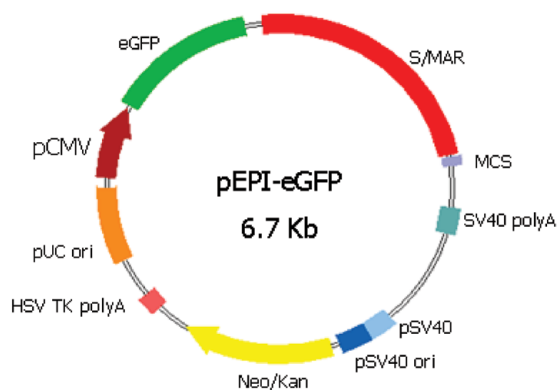


**Εικόνα 1.** Σχηματική απεικόνιση ενός κοινού πλασμιδιακού φορέα έκφρασης, ενός επισωματικού φορέα βασιζόμενου στον ιό EBV και ενός επισωματικού φορέα βασιζόμενου στον ιό SV40.

να λειτουργεί ως επίσωμα, ανεξάρτητα από πρωτεΐνες ιϊκής προέλευσης<sup>23,24</sup>. Η λειτουργία του σταθερού επισώματος, θεωρείται ότι βασίζεται στο ότι το S/MAR έχει την ικανότητα να στρατολογεί παράγοντες του κυττάρου οι οποίοι διαμεσολαβούν τόσο τη μιτωτική του σταθερότητα όσο και την επισωματική του αντιγραφή. Προϋπόθεση για την επισωματική διατήρηση των φορέων αυτών είναι η ενεργός μεταγραφή εντός της αλληλουχίας S/MAR<sup>25</sup>.

Ο φορέας pEPI-1 όσο και παράγωγα του, όπως ο πρότυπος φορέας pEPI-eGFP (Εικόνα 2) που φέρει το γονίδιο αναφοράς eGFP, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ερευνητικά πρωτόκολλα γονιδιακής μεταφοράς σε κυτταρικές σειρές και *in vivo*.

Ο φορέας pEPI-eGFP έχει δείξει ότι λειτουργεί ως επίσωμα *in vitro* σε καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και σε πρωταρχικές καλλιέργειες κυττάρων<sup>26,27</sup>, καθώς



**Εικόνα 2.** Ο φορέας pEPI-eGFP. Μικρό κυκλικό μόριο DNA που περιέχει την αλληλουχία S/MAR, το γονίδιο αναφοράς eGFP υπό τον έλεγχο του υποκινητή του μεγακαρουσίου (CMV), την αφητηρία έναρξης της αντιγραφής του DNA από τον ιό SV40 και τα γονίδια αντίστασης στα αντιβιοτικά νεομυκίνη και καμυκίνη (Neo/Kan). MCS: multiple cloning sites.

επίσης και *in vivo*, στο ήπαρ ποντικού<sup>27</sup>. Επί πλέον έχει χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένου χοίρου<sup>28</sup>.

Σημαντικές τροποποιήσεις του φορέα pEPI-eGFP είναι ο φορέας pEPito<sup>29</sup> από τον οποίο έχουν αφαιρεθεί μοτίβα CpG, που αποτελούν τη βάση μεθυλίωσης του DNA και αποσιώπησης του διαγονιδίου. Πρόσφατα, ένας πολλά υποσχόμενος υβριδικός φορέας δημιουργήθηκε - HCAdV-pEPito- με βάση τον αδενοϊό και τον φορέα pEPito, που συνδυάζει υψηλή ικανότητα μεταφοράς του φορέα με την επισωματική κατάσταση σε *in vitro* σε *in vivo* συστήματα<sup>30</sup>.

Ο πρότυπος φορέας pEPI-eGFP διαμολύνει επαρκώς κύτταρα CD34+ από ομφάλιο λώρο και υποστηρίζει την παροδική έκφραση του διαγονιδίου<sup>9</sup>. Ένα άλλος επισωματικός φορέας ο οποίος, εκτός του S/MAR περιέχει και το χρωμοσωμικό στοιχείο IR (Initiation of Replication), που φυσιολογικά εδράζεται στο γενετικό τόπο του συμπλέγματος της β-σφαιρίνης, παρουσιάζει αυξημένη επάρκεια διατήρησης του επισώματος στο πυρήνα του κυττάρου εκ μεταφοράς<sup>31</sup>. Ο συνδυασμός των στοιχείων S/MAR και IR σε ένα άλλο φορέα επιτρέπει την έκφραση του γονιδίου αναφοράς σε διαφοροποιημένα κύτταρα, προερχόμενα από ημι-στερεές καλλιέργειες διαμολυσμένων κυττάρων CD34+ (Stavrou et al (a) submitted). Επίσης, έχει γίνει εφικτή η ενεργοποίηση του γ-σφαιρινικού γονιδίου σε CD34+ με επισωματικό φορέα που φέρει ένα πεπτίδιο δακτύλων ψευδαργύρου, ικανού να προσδεθεί στον υποκινητή του γA-σφαιρινικού γονιδίου (Stavrou et al (β) in preparation). Επί πλέον, επισωματικοί φορείς με βάση τον φορέα pEPI-eGFP υποστηρίζουν την παραγωγή φυσιολογικών επιπέδων β-σφαιρίνης σε κυτταρική σειρά<sup>32</sup>. Οι εργασίες αυτές, προοδευτικά, ενισχύουν την άποψη ότι μπορεί να είναι εφικτή στο μέλλον η χρήση επισωματικών φορέων για τη γονιδιακή θεραπεία των αιμοσφαιρινοπαθειών.

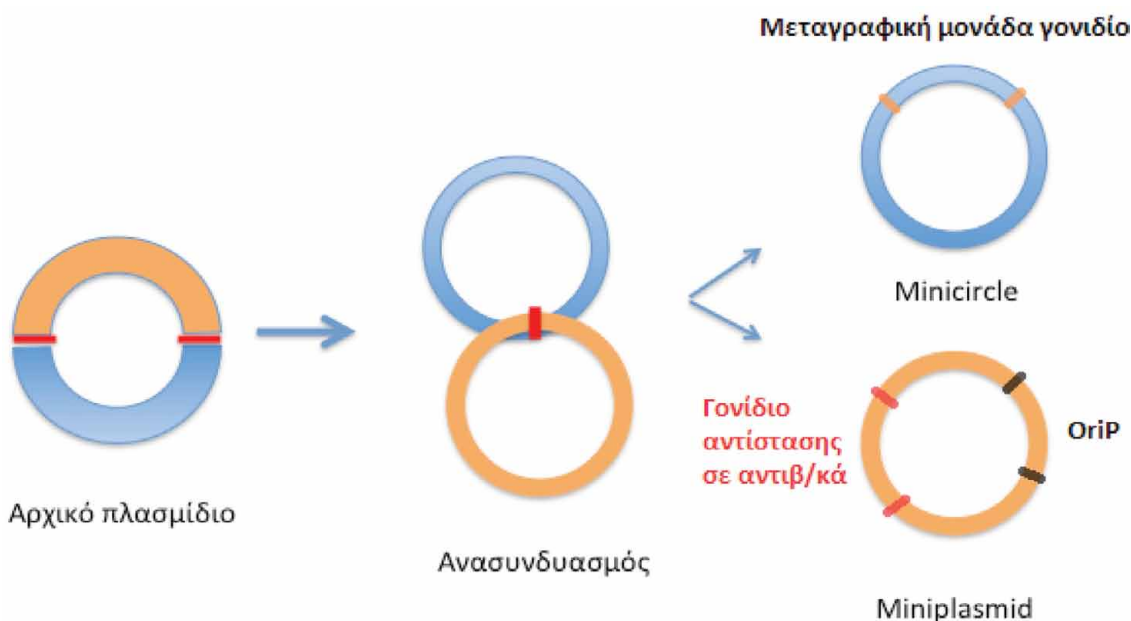
### Μη-ϊικοί φορείς χωρίς βακτηριακά γονίδια

Κλασικά οι μη ιικοί φορείς αποτελούνται από πλασμιδιακό DNA που περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό για την επιλογή του σε βακτήρια, απαραίτητο για την παραγωγή του πλασμιδίου-φορέα σε βακτήρια, πριν τη χρήση του σε εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Όλες όμως οι αλληλουχίες βακτηριακής προέλευσης έχουν αρνητική επίδραση αφού μπορεί να προκαλέσουν απρόσμενες ανοσολογικές απαντήσεις και επίσης να οδηγήσουν σε αποσιώπηση του διαγονιδίου. Στο πλαίσιο της έρευνας για την αποφυγή του παραπάνω προβλήματος αναπτύχθηκαν 2 στρατηγικές:

1) Δημιουργία του φορέα pFAR (free of antibiotic resistance) που, εκ κατασκευής, δεν περιέχει γονίδιο αντίστασης σε αντιβιοτικό και άρα δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε βακτηριακή καλλιέργεια. Αυτό έγινε εφικτό χάρις σε μια γενετική τροποποίηση στελέχους της *E. Coli*. Στο βακτήριο αυτό έχει εισαχθεί μια μετάλλαξη στο γονίδιο *thyA*, που είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου. Το πλασμίδιο pFAR κωδικοποιεί ένα κατασταλτικό tRNA (suppressor tRNA) που οδηγεί στην παράκαμψη της μετάλλαξης και στην παραγωγή της συνθετάσης της θυμιδίνης με αποτέλεσμα το βακτήριο να μπορεί να πολλαπλασιαστεί μόνο παρουσία του πλασμιδίου. Δεδομένα από μεταφορά pFAR φορέων σε μύες, δέρμα καθώς και σε όγκους έδειξαν υψηλότερα επίπεδα και μεγαλύτερη διάρκεια έκφρασης του διαγονιδίου<sup>33</sup>.

2) Δημιουργία των minicircles, κυκλικών μη ιικοί φορέων που περιέχουν μόνο την ευκαρυωτική κασέτα που

φέρει το διαγονίδιο. Τα minicircles παράγονται με τη δράση του ανασυνδυασμού *in vivo*, από ένα αρχικό πλασμίδιο. Το πλασμίδιο αυτό έχει την ευκαρυωτική κασέτα που οριοθετείται εκατέρωθεν από 2 αλληλουχίες στις οποίες προσδέεται η πρωτεΐνη ανασυνδυασμού, έναν παράγοντα επιλογής για τον πολλαπλασιασμό μέσα σε βακτήρια και το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ανασυνδυασμού οδηγούμενο από έναν επαγόμενο υποκινητή. Τα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί για να επιτευχθεί αυτός ο ενδομοριακός ανασυνδυασμός ανήκουν σε 2 κύριες οικογένειες α) tyrosine recombinases όπως η ιντεγκράση του βακτηριοφάγου λάμδα, η Cre recombinase του βακτηριοφάγου P1 και η FLP recombinase του σακχαρομύκητα και β) serine recombinases όπως η ιντεγκράση του βακτηριοφάγου PhiC31 ή η ParA resolvase<sup>34-36</sup>. Μετά την παραγωγή του αρχικού πλασμιδίου σε μεγάλη ποσότητα σε καλλιέργειες *E. Coli* επάγεται η λειτουργία της recombinase και από το αρχικό πλασμίδιο δημιουργούνται 2 πλασμίδια το minicircle και ένα miniplasmid που έχει όλα τα υπόλοιπα στοιχεία (εικόνα 3). Ο καθαρισμός τους επιτυγχάνεται με χρωματογραφία. Τα minicircles επιτυγχάνουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου, καλύτερα επίπεδα διαμόλυνσης λόγω του μικρού του μεγέθους και γενικά αποφεύγονται όλα τα αρνητικά τα οποία προέρχονται από την εισαγωγή βακτηριακών αλληλουχιών σε ευκαρυωτικά κύτταρα (π.χ. ανοσογονικότητα, φαινόμενα γονιδιακής αποσιώπησης)<sup>21</sup>. Τελευταίως τα minicircles έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς του συστήματος τρανσποζονίου-τρανσποζύσης με επιτυχία<sup>37</sup>.



**Εικόνα 3.** Τα minicircles παράγονται από ένα αρχικό πλασμίδιο, Με τη δράση του *in vivo* ενδομοριακού ανασυνδυασμού. Έτσι δημιουργούνται 2 πλασμίδια: το minicircle που φέρει το διαγονίδιο και ένα miniplasmid ως παραπροϊόν που έχει όλα τα υπόλοιπα στοιχεία.



## Ενσωματούμενο μη-ϊικό σύστημα γονιδιακής μεταφοράς

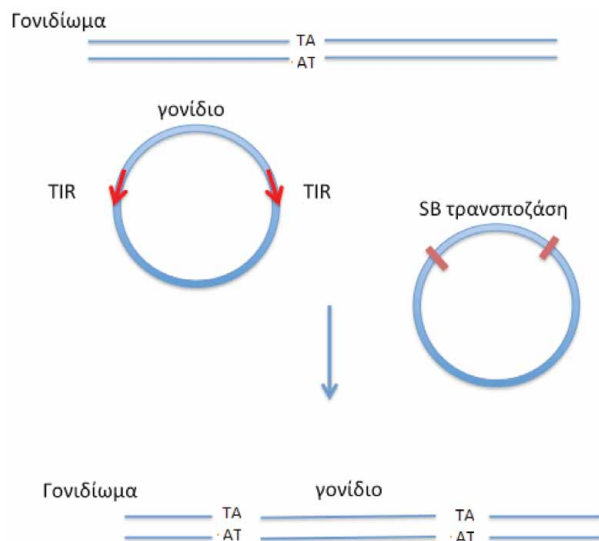
Τέτοιο σύστημα είναι το του τραπεζοζονίου που δι-αμεσολαβείται από την τραπεζοζάση και βρίσκεται σε συνεχή ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Βασική προϋ-πόθεση είναι η παρουσία ενός πλασμιδίου δότη που φέ-ρει το θεραπευτικό γονίδιο (τραπεζοζόνιο) και η δράση μιας εξωγενούς πρωτεΐνης (της τραπεζοζάσης) που κω-δικοποιείται από γονίδιο ενός άλλου πλασμιδιακού φο-ρέα. Η εισαγωγή των ανωτέρω πλασμιδίων στο κύτταρο ξενιστή γίνεται συγχρόνως και τεχνητά ή με ηλεκτροδι-άτρηση (electroporation) ή με τη βοήθεια λιπο-συμπλεγ-μάτων (lipofection) ή τέλος με απευθείας μεταφορά στον κυτταρικό πυρήνα (nucleofection). Υπάρχουν 2 βασικά μειονεκτήματα σύστημα αυτό: η μεταλλαξιγένεση από ενσωμάτωση που μπορεί να οδηγήσει σε ογκογένεση (αναμένεται σπάνια) όπως έχει παρατηρηθεί και στα ιικά συστήματα<sup>4</sup> και η πιθανή τοξικότητα από την έκφραση μιας εξωγενούς πρωτεΐνης (τραπεζοζάσης)<sup>38</sup>.

Τα τραπεζοζόνια είναι κινητά στοιχεία του γονιδιώμα-τος τα οποία υπάρχουν στη φύση και έχουν τη δυνατότητα της αποκοπής από την αρχική θέση τους στην αλληλουχία του DNA και της ενσωμάτωσής τους σε άλλη θέση στο γονιδίωμα<sup>39</sup>. Υπάρχουν 2 τάξεις τραπεζοζονίων, τα DNA τραπεζοζόνια και τα ρέτρο-τραπεζοζόνια με RNA<sup>40</sup>. Τα συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για τη έρευνα στη γο-νιδιακή θεραπεία βασίζονται στα DNA τραπεζοζόνια<sup>41</sup>. Η μεγαλύτερη οικογένεια DNA τραπεζοζονίων ονομάζε-ται Tc1/mariner και περιλαμβάνει το σύστημα Sleeping Beauty (SB)<sup>42</sup>. Το τελευταίο αναπτύχθηκε από τη σύγκρι-ση πολλών ανενεργών τραπεζοζονίων που ανήκουν στο γονιδίωμα ψαριών μέσα από τη δημιουργία συναινετικών (consensus) αλληλουχιών. Το σύστημα SB αποτελείται από 2 στοιχεία: το τραπεζοζόνιο και την τραπεζοζάση. Το τραπεζοζόνιο είναι ένα τμήμα DNA που φέρει το με-ταφερόμενο γονίδιο και στα 2 άκρα του βρίσκονται τα λεγόμενα terminal inverted repeats (TIR). Η πρωτεΐνη τραπεζοζάση, που εκφράζεται από ένα δεύτερο πλασμί-διο, προσδένεται στα άκρα TIR και επάγει την αποκοπή και ενσωμάτωση του γονιδίου σε (τυχαίες) θέσεις του γο-νιδιώματος σε TA (αδενίνη - θυμίνη)<sup>43</sup>.

Ο μηχανισμός της διαμετάθεσης<sup>44</sup> περιλαμβάνει τρία στάδια (Σχήμα 4) α) πρόσδεση 4 μορίων της τραπεζο-ζάσης στα άκρα του τραπεζοζονίου για το σχηματισμό συμπλόκου πρωτεΐνης-τραπεζοζονίου, β) αποκοπή του τραπεζοζονίου που γίνεται με σύγχρονη διάσπαση σε 3 τρία σημεία δημιουργώντας GTC προεξοχές στα άκρα του τραπεζοζονίου και TA προεξοχές στο γονιδίωμα του ξε-νιστή και γ) Επικόλλησή του τραπεζοζονίου στη νέα του θέση στο γονιδίωμα του ξενιστή με τη βοήθεια κυτταρι-κών ενζύμων (Nonhomologous end joining) (Σχήμα 4).

Η αρχική απομονωθείσα SB τραπεζοζάση είχε ονομα-σθεί “SB10” και το τραπεζοζόνιο “pT”. Αυτό το σύστημα ήταν ικανό να κάνει μετάθεση στο 0,3% των κυττάρων<sup>43</sup>. Το SB100X αποτελεί το τελευταίο σύστημα τραπεζοζά-σης/τραπεζοζονίου που έχει δράση 100 φορές μεγαλύτερη από το προηγούμενο και μπορεί να μεταφέρει διαγονίδιο μερικών χιλιάδων βάσεων. Γενικά ισχύει ότι όσο μεγαλύ-τερο το μέγεθος του διαγονιδίου τόσο μικρότερη η δυνα-τότητα διαμετάθεσης αυτού στο γονιδίωμα.

Το σύστημα γονιδιακής μεταφοράς με SB τραπεζοζό-νιο αποτελεί μια εναλλακτική λύση στα συστήματα που βασίζονται σε ιούς. Συνδυάζουν σταθερή και μακρά έκ-φραση του διαγονιδίου που μεταφέρουν, ενώ το προφίλ της ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα είναι πιθανώς ασφαλέ-στερο από αυτό των ρετροϊών δεδομένου ότι αυτό είναι τυχαίο χωρίς να φαίνεται ότι υπάρχει κάποια προτίμηση ενσωμάτωσης σε εξόνια ή αλληλουχίες ρυθμιστικών πε-ριοχών της γονιδιακής έκφρασης<sup>46</sup>. Το σύστημα SB έχει χρησιμοποιηθεί σε προκλινικές και κλινικές δοκιμές<sup>47,48</sup>.



**Σχήμα 4.** Ο μηχανισμός της διαμετάθεσης περιλαμβάνει την πρόσδεση 4 μορίων τραπεζοζάσης στα άκρα του τραπεζοζονίου για το σχηματισμό συμπλόκου πρωτεΐνης-τραπεζοζονίου, την αποκοπή του τραπεζοζονίου και την επικόλλησή του στη νέα θέση στο γονιδίωμα του ξενιστή με τη βοήθεια κυτταρικών ενζύμων.

**Συμπερασματικά,** υπάρχει μια συνεχώς αυξανόμε-νη ανάπτυξη μη ιικών φορέων γονιδιακής μεταφοράς με στόχο την επάρκεια αλλά και κυρίως την ασφάλεια της διαδικασίας για τη γονιδιακή θεραπεία σε σύγκριση με εκείνη των ιικών συστημάτων.

## Technology of gene transfer: non-viral vectors

by Aristidis Giannakopoulos, Eleana F. Stavrou, Aglaia Athanassiadou

*Laboratory of General Biology, Medical School, University of Patras, Patras, Greece*

**ABSTRACT:** Non viral Vectors of gene transfer are usually plasmids, whose basic structure involves the transgene under the control of an efficient promoter, an origin of DNA replication and a gene for antibiotic resistance. Non viral vectors cannot transmit their DNA into cells, and therefore physical or chemical methods have been developed for this purpose. Their main advantage is that they do not intergrate into the endogenous genetic material and therefore they circumvent insertional mutagenesis, an inherent problem of viral vectors. However, as a consequence of this, they tend to follow an erratic mitotic segregation that results in plasmid loss during culture. A major part of research on non viral vectors focuses on the development of structures that will give the plasmid the possibility of long term establishment in the cell nucleus, as an autonomously replicating unit. Replicating episomal vectors (REVs) and their derivatives are currently the main type of non viral vectors. REVs are maintained into the cell nucleus as autonomously replicating units and specific origins of replication, deriving from viral genomes (EBV and SV40), ensure their DNA replication. Most of the currently used REVs carry a Scaffold/Matrix Attachment Region - S/MAR that is rendering the plasmid capable for long term establishment in the cell nucleus. S/MARs are TA rich areas of DNA that belong to the 'boundary elements' of the genome, by defining chromatin loops and they are tethering chromatin to the nuclear matrix, for the maintenance of nuclear architecture and transcription of the transgene. These type of vectors have been shown to be functional in *in vitro* experiments with established cell lines and with primary cell cultures as well as *in vivo* experiments with whole organisms. Among other, it has been shown to have the capacity for stable transfection of the haematopoietic progenitor cells CD34+. Two types of derivative vectors that are devoid of prokaryotic DNA sequences, and therefore safer, are under development: (1) Vector pFAR (free of antibiotic resistance), which is constructed to be without a gene for antibiotic resistance. This vector needs a specially devised strain of E.Coli for culture. (2) Vector type minicircle, circular non viral vectors that are produced by *in vivo* recombination of the original plasmid, to contain only the eukaryotic transcription cassette. Finally, the transposon/transposase system SB1000X is a non viral vector, which, however, is integrated into the genome. This occurs quite randomly and no preference for the exonic or actively transcribed sequences is shown, and therefore the SB100X system is considered to be safer than the retroviral system. This system has been used in pre-clinical studies as well as in clinical trials.

## Βιβλιογραφία

1. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*. 1993; 260:926-932.
2. Miller AD, Eckner RJ, Jolly DJ et al. Expression of a retrovirus encoding human HPRT in mice. *Science*. 1984; 225:630-632.
3. Williams DA, Lemischka IR, Nathan DG, Mulligan RC. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature*. 1984; 310:476-480.
4. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. *Retroviruses*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1997.
5. Miller AD. Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:11407-11413.
6. Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, et al. Cell surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91:7071-7075.
7. Kiem HP, Heyward S, Winkler A, et al. Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood*. 1997; 90:4638-4645.
8. Kiem HP, Andrews RG, Morris J et al. Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor. *Blood*. 1998; 92:1878-1886.
9. Burns JC, Friedmann T, Driever W et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [see comments]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:8033-8037.
10. Miller DG, Adam MA, Miller AD. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection [published erratum appears in *Mol Cell*

- Biol. 1992; 12:433]. Mol Cell Biol. 1990; 10:4239-4242.
11. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [see comments]. Science. 1996; 272:263-267.
  12. Russell DW, Miller AD. Foamy virus vectors. J Virol. 1996; 70:217-222.
  13. Schliephake AW, Rethwilm A. Nuclear localization of foamy virus Gag precursor protein. J Virol. 1994; 68:4946-4954.
  14. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]. Nature. 1993; 365:666-669.
  15. Chen WY, Bailey EC, McCune SL, et al. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:5798-5803.
  16. Challita PM, Kohn DB. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91:2567-2571.
  17. Robbins PB, Skelton DC, Yu XJ, et al. Consistent, persistent expression from modified retroviral vectors in murine hematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:10182-10187.
  18. Miller AD, Miller DG, Garcia JV, Lynch CM. Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. Methods Enzymol. 1993; 217:581-599.
  19. Miller AD. Retroviral vectors. Curr Top Microbiol Immunol. 1992; 158:1-24.
  20. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. Mol Cell Biol. 1986; 6:2895-2902.
  21. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest. 2008; 118:3132-3142.
  22. Lochelt M, Muranyi W, Flügel RM. Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90:7317-7321.
  23. Trobridge GD, Russell DW. Helper-free foamy virus vectors. Hum Gene Ther. 1998; 9:2517-2525.
  24. Chatziandreou I, Siapati EK, Vassilopoulos G. Genetic correction of X-linked chronic granulomatous disease with novel foamy virus vectors. Exp Hematol. 2011;39:643-652.
  25. Vassilopoulos G, Trobridge G, Josephson NC, Russell DW. Gene transfer into murine hematopoietic stem cells with helper-free foamy virus vectors. Blood. 2001;98:604-609.
  26. Josephson NC, Vassilopoulos G, Trobridge GD, et al. Transduction of human NOD/SCID-repopulating cells with both lymphoid and myeloid potential by foamy virus vectors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99:8295-8300.
  27. Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94:9825-9830.
  28. Gallay P, Stitt V, Mundy C, et al. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. J Virol. 1996; 70:1027-1032.
  29. Miyoshi H, Smith EA, 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
  30. Park F, Ohashi K, Chiu W, et al. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling in vivo. Nat Genet. 2000; 24:49-52.
  31. Korin YD, Zack JA. Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells. J Virol. 1998; 72:3161-3168.
  32. Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. Curr Top Microbiol Immunol. 1992; 158:97-129.
  33. Summerford C, Samulski RJ. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. J Virol. 1998; 72:1438-1445.
  34. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection [see comments]. Nat Med. 1999; 5:78-82.
  35. Russell DW, Alexander IE, Miller AD. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92:5719-5723.
  36. Weitzman MD, Kyostio SR, Kotin RM, Owens RA. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91:5808-5812.
  37. Rutledge EA, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration junctions. J Virol. 1997; 71:8429-8436.
  38. Yang CC, Xiao X, Zhu X, et al. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. J Virol. 1997; 71:9231-9247.
  39. Fisher KJ, Jooss K, Alston J, et al. Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. Nat Med. 1997; 3:306-312.
  40. Miao CH, Snyder RO, Schowalter DB, et al. The kinetics of rAAV integration in the liver [letter]. Nat Genet. 1998; 19:13-15.
  41. Koeberl DD, Alexander IE, Haibert CL, et al. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94:1426-1431.
  42. Kaplitt MG, Leone P, Samulski RJ, et al. Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. Nat Genet. 1994; 8:148-154.
  43. Flotte TR, Afione SA, Conrad C, et al. Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90:10613-10617.
  44. Hargrove PW, Vanin EF, Kurtzman GJ, Nienhuis AW. High-level globin gene expression mediated by a recombinant adeno-associated virus genome that contains the 3' gamma globin gene regulatory element and integrates as tandem copies in erythroid cells. Blood. 1997; 89:2167-2175.
  45. Russell DW, Kay MA. Adeno-associated virus vectors and hematology. Blood. 1999; 94:864-874.

46. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung SH, et al. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:5804-5809.
47. Snyder RO, Miao C, Meuse L, et al. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors [see comments]. *Nat Med*. 1999; 5:64-70.
48. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011; 365:2357-2365.
49. Russell DW, Hirata RK. Human gene targeting by viral vectors [see comments]. *Nat Genet*. 1998; 18:325-330.
50. Haibert CL, Standaert TA, Wilson CB, Miller AD. Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol*. 1998; 72:9795-9805.
51. Yeh P, Perricaudet M. Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology. *Faseb J*. 1997; 11:615-623.
52. Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*. 1997; 275:1320-1323.
53. Wickham TJ, Mathias P, Cheres DA, Nemerow GR. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell*. 1993; 73:309-319.
54. Hitt MM, Addison CL, Graham FL. Human adenovirus vectors for gene transfer into mammalian cells. *Adv Pharmacol*. 1997; 40:137-206.
55. Crouzet J, Naudin L, Orsini C, et al. Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94:1414-1419.
56. Lusky M, Christ M, Rittner K, et al. In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J Virol*. 1998; 72:2022-2032.
57. Gao GP, Yang Y, Wilson JM. Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol*. 1996; 70:8934-8943.
58. Clemens PR, Kochanek S, Sunada Y, et al. In vivo muscle gene transfer of full-length dystrophin with an adenoviral vector that lacks all viral genes. *Gene Ther*. 1996; 3:965-972.
59. Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, et al. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and betagalactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:603-608.
60. Morsy MA, Gu M, Motzel S, et al. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:7866-7871.
61. Kafri T, Morgan D, Krahl T, et al. Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require de novo viral gene expression: implications for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:11377-11382.
62. Yang Y, Su Q, Grewal IS, et al. Transient subversion of CD40 ligand function diminishes immune responses to adenovirus vectors in mouse liver and lung tissues. *J Virol*. 1996; 70:6370-6377.
63. Bramson JL, Hitt M, Gauldie J, Graham FL. Preexisting immunity to adenovirus does not prevent tumor regression following intratumoral administration of a vector expressing IL-12 but inhibits virus dissemination. *Gene Ther*. 1997; 4:1069-1076.
64. Lieber A, Steinwaerder DS, Carlson CA, Kay MA. Integrating adenovirus-adenovirus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J Virol*. 1999; 73:9314-9324.
65. Emery DW, Yannaki E, Tubb J, Stamatoyannopoulos G. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:9150-9155.

## Γονιδιακή θεραπεία για τη θαλασσαιμία

Γαρυφαλιά Καρπώνη<sup>1</sup>, Ευαγγελία Γιαννάκη<sup>1,2</sup>

**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<sup>+</sup>) 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 β<sup>0</sup>/β<sup>E</sup> 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<sup>+</sup> 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

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

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

αναιμία, ωστόσο η ομοζυγωτία, που συνιστά τη βαριά μορφή της νόσου, (μειζών β-θαλασσαιμία), χαρακτηρίζεται είτε από παντελή έλλειψη HbA (β<sup>0</sup>-θαλασσαιμία), είτε από μερική παραγωγή της (β<sup>+</sup>-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.<sup>1</sup>

### 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.<sup>2</sup> 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.<sup>3</sup> 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 Pesaro<sup>4</sup> 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%).<sup>5-7</sup>

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.<sup>8</sup>

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,<sup>9</sup> 2) στη δυνατότητα να εσωκλείουν διαγονίδια μεγαλύτερου μεγέθους (~9-10 kb)<sup>10</sup> παραμένοντας γενετικά σταθεροί, 3) στο ασφαλέστερο προφίλ θέσεων ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα που διαθέτουν<sup>11</sup> και 4) στο σχεδιασμό αυτοαδρανοποίησης (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,<sup>12</sup> και αυξάνει την ιστοειδικότητα της έκφρασης<sup>13</sup> ανάλογα με το εκάστοτε στάδιο διαφοροποίησης του κυττάρου,<sup>14</sup> ενώ επιπρόσθετα προστατεύει τα γονίδια από την αποσιώπηση.<sup>15</sup> 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 της<sup>16</sup> και περιλαμβάνουν τουλάχιστον δύο HS στοιχεία της LCR.<sup>17-20</sup> 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.<sup>21,22</sup> 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.<sup>23</sup>

### Ασφάλεια

Παρά την αδιαφισβήτητη επιτυχία της ΓΘ στις ανοσοανεπάρκειες<sup>24-26</sup> και τα μεταβολικά νοσήματα αποθήκευσης,<sup>27,28</sup> 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)<sup>29</sup> ή σύνδρομο Wiscott-Aldrich (6/10)<sup>30</sup> 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.

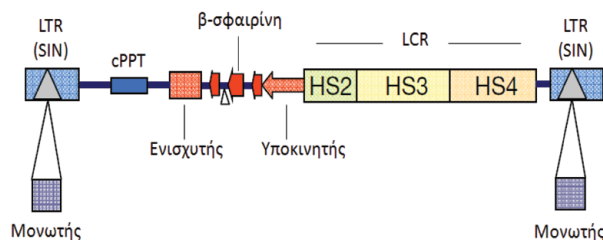
Οι λεντι-ϊικοί φορείς που κωδικοποιούν την ανθρώπινη β-σφαιρίνη και οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε κλινικές

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.<sup>31,32</sup> 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.<sup>33,34</sup> 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.<sup>35</sup>

## Προκλινικές Μελέτες

Η ομάδα του Michel Sadelain, χρησιμοποιώντας τον λεντι-ικό φορέα TNS9, κατέδειξε για πρώτη φορά διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινοτύπου τόσο σε Hbb<sup>th3/+</sup> ποντίκια<sup>36</sup> που προσομοιάζουν στην ενδιάμεση β-θαλασσαιμία του ανθρώπου, όσο και σε τεχνητό μοντέλο μείζονος β-θαλασσαιμίας.<sup>37</sup> 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,<sup>38</sup> του Persons,<sup>39</sup> της Malik<sup>40</sup> και της Ferrari<sup>41</sup> που έδειξαν επιτυχή γονιδιακή διόρθωση τόσο σε ζωικά μοντέλα θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής νόσου<sup>42</sup> όσο και σε κύτταρα θαλασσαιμικών ασθενών.<sup>43,44</sup>

## 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<sup>+</sup>), 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<sup>+</sup> κυττάρων μετά τη γονιδιακή μεταφορά, απαιτεί είτε την *in vivo* επιλογή τους<sup>45</sup> είτε εφαρμογή μυελοκαταστολής στον ασθενή.

Η χορήγηση ολικής μυελοκαταστολής, θα εξασφαλίσει την καθ' ύπεροχήν 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<sup>+</sup> στους ασθενείς με θαλασσαιμία, το βάθος μυελοκαταστολής που μπορεί να εξασφαλίσει επαρκή εμφύτευση με αποδεκτή, αιμοποιητική και μη αιμοποιητική, τοξικότητα, παραμένει αντικείμενο επιστημονικών αντιπαραθέσεων.



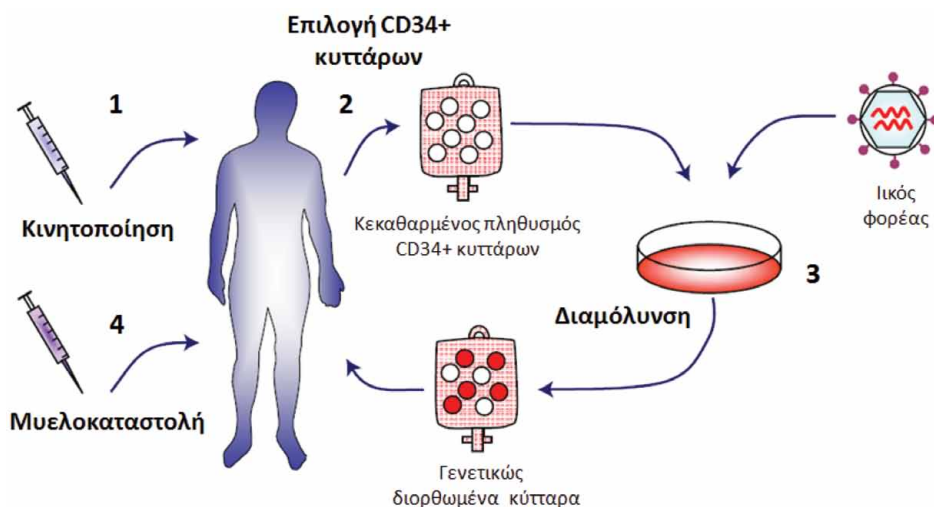
Μελέτες στην αλλογενή μεταμόσχευση για τη θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική νόσο έδειξαν ότι ακόμη και χαμηλά επίπεδα χίμαιρας του δότη μπορούν να προσφέρουν ανεξαρτησία από μεταγγίσεις, υποστηρίζοντας την άποψη ότι και χαμηλά ποσοστά εμφύτευσης των γενετικά διορθωμένων κυττάρων μπορούν να αποδώσουν θεραπευτικό όφελος.<sup>46</sup> 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.<sup>47</sup>

Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, εκτιμάται ότι ένα ελαττωμένης έντασης προπαρασκευαστικό σχήμα, με Busulfan 8-12 mg/kg ή Melphalan 140 mg/m<sup>2</sup> 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.<sup>35</sup> 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<sup>+</sup> κυττάρων πρέπει να είναι πολύ υψηλότερος από το χαμηλότερο αποδεκτό όριο των  $2 \times 10^6$ /kg CD34<sup>+</sup> κυττάρων για αυτόλογη μεταμόσχευση.<sup>35,48</sup> 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<sup>+</sup> 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.<sup>35</sup> Γίνεται *ex vivo* γονιδιακή μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου της β-σφαιρίνης μέσω λεντιϊκού φορέα σε κινητοποιημένα και κεκαθαρισμένα CD34<sup>+</sup> κύτταρα του ασθενούς (1, 2). Η γονιδιακή μεταφορά επιτυγχάνεται με συγκαλλιέργεια του ιικού φορέα με τα CD34<sup>+</sup> κύτταρα στη διάρκεια της οποίας γίνεται η είσοδος και η ενσωμάτωσή του στα κύτταρα-στόχος (3). Τα αυτόλογα, γενετικά 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<sup>+</sup> κύτταρα με ταχύτερη ικανότητα εμφύτευσης.<sup>48,49</sup> 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,<sup>50</sup> καθώς και σε κλινικές δοκιμές ΓΘ.<sup>27,44,51</sup> Η χρήση του G-CSF ωστόσο, έχει σχετιστεί με συγκεκριμένη νοσηρότητα<sup>52,53</sup> και υπάρχουν ασθενείς που αποτυγχάνουν να κινητοποιήσουν επιτυχώς, καθώς και φυσιολογικοί δότες που υποβάλλονται σε πολλαπλές συνεδρίες λευκαφαίρεσης.<sup>54</sup> 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,<sup>55</sup> ενώ άτομα με αναιμία Fanconi κινητοποιούν φτωχά ακόμα και μετά από πολύ υψηλές δόσεις G-CSF.<sup>56</sup> 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<sup>+</sup> κύτταρα ενώ αυξάνει πολλαπλάσια την απόδοση της κινητοποίησης όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον G-CSF.<sup>57,58</sup>

Με την προοπτική της ΓΘ για τη νόσο και για τη βελτιστοποίηση της κινητοποίησης των CD34<sup>+</sup> κυττάρων σε ενήλικες ασθενείς με θαλασσαιμία, διερευνήσαμε δύο κλινικές μελέτες κινητοποίησης των CD34<sup>+</sup> κυττάρων.<sup>59,60</sup> 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<sup>+</sup> 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.<sup>59</sup>

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)<sup>55,56</sup> διερευνήσαμε την κινητοποίηση με Plerixafor (Mozobil) μόνο ή Plerixafor+G-CSF στις περιπτώσεις αποτυχίας συλλογής επαρκών δόσεων CD34<sup>+</sup> κυττάρων ( $\geq 6 \times 10^6/\text{kg}$ ).<sup>60</sup> Η μελέτη THAL002, που συμπεριέλαβε 20 ασθενείς, κατέδειξε ότι το Plerixafor κινητοποιεί ταχέως και αποτελεσματικά τα CD34<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 β<sup>0</sup>/β<sup>E</sup> 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.<sup>61,62</sup> Ο πρώτος ασθενής εμφάνισε αποτυχία εμφύτευσης και παρατεταμένη απλασία και έλαβε διάσωση με τα μη γενετικά τροποποιημένα CD34<sup>+</sup> 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.<sup>63</sup> 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 β<sup>0</sup>/β<sup>+</sup> θαλασ-

σαιμία έλαβαν γενετικά διορθωμένα CD34<sup>+</sup> 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 β<sup>0</sup>/β<sup>E</sup> 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 υποβέλτστου 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 γεινιάζοντα 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.<sup>33</sup>

### Αποτελεσματικότητα των φορέων σφαιρίνης

Παρά την εξαιρετικά επιτυχή διαμόλυνση των HSCs στη ΓΘ των ανοσοανεπαρκειών<sup>26</sup> και των λυσοσωμικών νόσων,<sup>28</sup> 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  $\beta^0/\beta^E$  θαλασσαιμία που έλαβε πλήρη μυελοκαταστολή πριν από την έγχυση των γενετικά τροποποιημένων CD34<sup>+</sup> 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 ( $\beta^0/\beta^E$ ) της θαλασσαιμίας που στοχεύει. Πρέπει να υπογραμμιστεί, ότι το γεγονός της πρώιμης απεξάρτησης από τις μεταγίσεις για  $\beta^0/\beta^E$  ασθενείς, είναι εντυπωσιακό και ιδιαίτερα

ελπιδοφόρο, ωστόσο η απεξάρτηση από τις μεταγίσεις για ασθενείς  $\beta^0/\beta^0$  ή ακόμη και  $\beta^0/\beta^+$  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  $\beta^0/\beta^E$  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 επιβεβαιώνουν την παραδοχή της θαλασσαιμίας ως μιας μείζονος και συνεχιζόμενης πρόκλησης για τη ΓΘ, η απόδειξη της αρχής έχει επιτευχθεί και σύντομα αναμένονται θεραπευτικά και αναπαραγωγικά αποτελέσματα στο πλαίσιο κλινικών μελετών.

---

## Gene therapy for thalassemia

by Garyfalia Karponi,<sup>1</sup> Evangelia Yannaki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gene and Cell Therapy Center, Hematology-Bone Marrow Transplantation Unit, George Papanicolaou Hospital, Thessaloniki, Greece, <sup>2</sup>Department 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<sup>+</sup>), 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 β<sup>0</sup>/β<sup>E</sup> 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<sup>+</sup> 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

1. Weatherall DJ, Clegg JB. Genetic disorders of hemoglobin. *Semin Hematol.* 1999; 36:24-37.
2. Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood.* 2010; 115:4331-4336.
3. Lucarelli G, Andreani M, Angelucci E. The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Reviews.* 2002; 16:81-85.
4. Lucarelli G, Clift RA, Galimberti M, et al. Marrow transplantation for patients with thalassemia: results in class 3 patients. *Blood.* 1996; 87:2082-2088.
5. 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.
6. 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.
7. Lucarelli G, Gaziev D. Advances in the allogeneic transplantation for thalassemia. *Blood Rev.* 2008; 22:53-63.
8. 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.
9. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, et al. Transduction of human CD34<sup>+</sup> cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.* 1999; 283:682-686.
10. Kumar M, Keller B, Makalou N, et al. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gen Ther.* 2001; 12:1893-1905.
11. 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.
12. Engel JD, Tanimoto K. Looping, linking and chromatin activity: new insights into  $\beta$ -globin locus regulation. *Cell.* 2000; 100:499-502.
13. 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.
14. Forrester WC, Novak U, Gelinas R, et al. Molecular analysis of the human  $\beta$ -globin locus activation region. *PNAS.* 1989; 86:5439-5443.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Imren S, Fabry M, Westerman K, et al. High-level  $\beta$ -globin expression and preferred intragenic integration after lentiviral transduction of human cord blood stem cells. *J Clin Invest.* 2004; 114:953-962.
19. Sadelain M, Lisowski L, Samakoglu S, et al. Progress toward the genetic treatment of the  $\beta$ -thalassemias. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1054:78-91.
20. 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.
21. Bell A, West AG, Felsenfeld G. Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science.* 2001; 19:447-450.
22. Kunn EJ, Geyer PK. Genomic insulators: connecting properties to mechanism. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15:259-265.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science.* 2013; 341:1233151.
27. 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.
28. Biffi A, Montini E, Lorioli L, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science.* 2013; 341:1233158.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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  $\beta$ -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  $\beta$ -globin locus control region elements promote consistent therapeutic expression of a  $\gamma$ -globin lentiviral vector in murine  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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  $\beta$ -thalassemia. *Nature*. 2010; 467:318-322.

## Γονιδιακή Θεραπεία για τον Καρκίνο: Υποσχέσεις ή πραγματικότητα;

Έλενα Κ. Σιαπάτη<sup>1</sup>, Κωνσταντίνα Βαΐτση<sup>1</sup>, Γεώργιος Βασιλόπουλος<sup>1,2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Η έρευνα για την γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου είχε θέσει υψηλούς στόχους τα τελευταία 20 χρόνια αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν εφάμιλλα των προσδοκιών. Ο καρκίνος αποτελεί μια επίκτητη γενετική διαταραχή και η γονιδιακή θεραπεία προσφέρει τη δυνατότητα της εξατομικευμένης παρέμβασης προσαρμοσμένης στο ακριβές γενετικό προφίλ του κάθε όγκου. Ως εκ τούτου, η στοχευμένη γενετική παρέμβαση, υπόσχεται χαμηλή τοξικότητα σε αντίθεση με τη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία. Στη συγκεκριμένη ανασκόπηση παρουσιάζουμε τις προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου, τα εμπόδια στην εφαρμογή τους και τις στρατηγικές βελτίωσης. Πρόσφατες τεχνολογικές πρόοδοι υποδηλώνουν ότι η μεταφορά γονιδίων θα μπορούσε τελικά να αποτελέσει μια ισχυρή μέθοδο για την ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων κατά του καρκίνου.

Haema 2016; 7(1): 92-99 Copyright EAE

---

### Εισαγωγή

Η διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου αποτελεί μία από τις μεγαλύτερες ιατρικές προκλήσεις. Ο επιστημονικός αγώνας δρόμου που έχει διανυθεί την τελευταία δεκαετία έχει σαφώς βελτιώσει την κατανόηση της μοριακής βάσης των διαφορετικών τύπων καρκίνου, αλλά η πρόοδος όσο αφορά τις θεραπευτικές προσεγγίσεις δεν ήταν ισόποση. Η πλειοψηφία των ασθενών με καρκίνο – με ελάχιστες εξαιρέσεις – υπόκεινται σε γενικευμένες θεραπείες όπως χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία οι οποίες όμως δρουν και στα φυσιολογικά κύτταρα με αποτέλεσμα μεγάλη τοξικότητα και μικρή βελτίωση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων. Είναι επόμενο ότι η έκρηξη των γνώσεων στην παθογένεια του καρκίνου και η ανάγκη για βελτιστοποίηση των θεραπευτικών χειρισμών, οδήγησε στην ανάγκη για εξατομικευμένες ή στοχευμένες θεραπείες κατά του καρκίνου.

Δεδομένου ότι ο καρκίνος αποτελεί επίκτητη γονιδιακή διαταραχή, η γονιδιακή στόχευση υπόσχεται αποτελεσματική θεραπεία, προσαρμοσμένη στην ακριβή

γενετική δομή του κάθε όγκου. Η εφαρμογή της όμως ξεφεύγει από την κλασική έννοια της αντικατάστασης ενός μεταλλαγμένου γονιδίου, όπως συμβαίνει στις μονογονιδιακές γενετικές διαταραχές, και επεκτείνεται στη γενικότερη χρήση γενετικού υλικού για την τροποποίηση κυττάρων (*in vitro* ή *in vivo*)<sup>1</sup>.

Η κλινική εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας για μονογονιδιακές ασθένειες, έχει αρχίσει να δίνει απτά αποτελέσματα με την επιτυχή αντιμετώπιση διαφόρων νόσων όπως ανοσοανεπαρκειών, αιμορροφιλίας και β-Μεσογειακής αναιμίας.<sup>2</sup> Σε αντίθεση, η επιτυχία των κλινικών δοκιμών στη γονιδιακή θεραπεία κακοηθειών είναι σε γενικές γραμμές πολύ κατώτερη. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη γενετική ετερογένεια του νεοπλασματος μεταξύ ασθενών η οποία απαιτεί τη μεταφορά περισσότερων του ενός γονιδίων και αποκλείει την ανάπτυξη μιας κοινής θεραπευτικής προσέγγισης. Επίσης, η κλινική διόρθωση των περισσότερων μονογονιδιακών ασθενειών αρκείται στη διόρθωση ενός μικρού ποσοστού των κυττάρων. Για παράδειγμα, στην αιμορροφιλία Β, έκφραση του παράγοντα ΙΧ σε επίπεδο 10% των φυσιολογικών επαρκεί για τη διόρθωση της νόσου.<sup>3</sup> Εν αντιθέσει, για τη θεραπεία κακοηθών νόσων ένα μικρό ποσοστό διαμόλυνσης των κυττάρων είτε με το επιδιορθωτικό είτε με το καταστροφικό γονίδιο δε θα ήταν επαρκές. Έτσι, η γονιδιακή μεταφορά από μόνη της δεν αποτελεί θεραπευτική επιλογή

<sup>1</sup>Εργαστήριο Γονιδιακής Θεραπείας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ)

<sup>2</sup>Αιματολογική Κλινική, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Ε.Κ. Σιαπάτη, e-mail: esiapati@bioacademy.gr



εκτός εάν το κύριο μέρος των κυττάρων του όγκου είναι γενετικά τροποποιημένο όπως για παράδειγμα με έναν θανατηφόρο ιικό φορέα που θα ήταν ικανός να αναπαρραχθεί μόνο μέσα στα κύτταρα του όγκου. Για αυτό το λόγο οι προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας έχουν στραφεί στο μικροπεριβάλλον του όγκου, στην ανοσολογική απάντηση ενάντια των καρκινικών κυττάρων καθώς και στην αύξηση της ανθεκτικότητας των φυσιολογικών κυττάρων σε ακτινοβολία και χημειοθεραπεία. Στην παρούσα ανασκόπηση, θα παρουσιάσουμε τη σύγχρονη state-of-the-art του επιστημονικού πεδίου, τα επιτεύγματα και τις προοπτικές του.

## 1. Προσεγγίσεις που στοχεύουν στον όγκο

### 1.1. Μεταφορά ενζύμων στοχευμένης μεταβολής φαρμάκων

Σημαντική προσέγγιση στη γενετική τροποποίηση των καρκινικών κυττάρων αποτελεί η μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων. Το ένζυμο ενεργοποιεί ένα χορηγούμενο προφάρμακο σε κυτταροτοξική ουσία και επιφέρει στοχευμένο κυτταρικό θάνατο. Πάνω από 20 ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό με κύριο εκπρόσωπο την κινάση της θυμιδίνης (HSV-tk), υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του valaciclovir σε τοξικά νουκλεοσίδια.<sup>4</sup> Τα κύρια πλεονεκτήματα της θεραπείας αυτής εστιάζονται στην αυξημένη επιλεκτικότητα των φαρμάκων για τα καρκινικά κύτταρα, γεγονός που μειώνει πιθανές παρενέργειες, καθώς και στο ότι επιτυγχάνονται υψηλότερες συγκεντρώσεις του ενεργού φαρμάκου από ό,τι με την κλασσική χημειοθεραπεία. Τέλος, ο κυτταρικός θάνατος που επέρχεται στον όγκο ενδέχεται να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα, ενισχύοντας τη συνολική θεραπευτική απόκριση. Για την αποτελεσματική εφαρμογή όμως, είναι απαραίτητη η στοχευμένη μεταφορά των ενζύμων στα καρκινικά κύτταρα, τα υψηλά ποσοστά μεταγωγής του όγκου και η χρήση ασφαλών, μη ανοσογόνων φορέων. Σε σχετική μελέτη φάσης III ασθενών με γλοιοβλάστωμα, έχουν ανακοινωθεί ενθαρρυντικά αποτελέσματα<sup>5</sup> αλλά ακόμα η συγκεκριμένη μέθοδος δεν έχει λάβει επίσημη έγκριση από τις αρμόδιες αρχές.

### 1.2. Ογκολυτικοί ιοί

Στα μέσα του 20ού αιώνα άρχισε η χρήση ογκολυτικών ιών που έχουν την ικανότητα να αναπαράγονται επιλεκτικά στα καρκινικά κύτταρα, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο ενώ ταυτόχρονα δεν επηρεάζουν τα υγιή κύτταρα.<sup>6</sup> Οι ιοί που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό έχουν περαιτέρω τροποποιηθεί γενετικά ώστε να στοχεύουν επιλεκτικά τα καρκινικά κύτταρα, να επάγουν τη

μετάδοση του ιού, την έκφραση κυτταροτοξικών πρωτεϊνών και τελικά να επιφέρουν κυτταρική λύση. Ένα πλήθος ιών έχουν επιταχθεί για ογκολυτική θεραπεία συμπεριλαμβανομένου του αδενοϊού, του ιού του απλού έρπητα τύπου 1 (HSV, Herpes Simplex Virus type 1) και του ιού της ασθένειας του Newcastle.<sup>7,8</sup> Αυτοί οι ιοί έχουν επιλεγεί λόγω της ικανότητάς τους να στοχεύουν καρκινικά κύτταρα, όπως επίσης και λόγω της ευκολίας να υποστούν γενετικές τροποποιήσεις. Σημαντικό παράδειγμα ογκολυτικής θεραπείας αποτελεί η χρήση του αδενοϊού Onyx-015 από τον οποίο απουσιάζει το γονίδιο E1B, γνωστό για την απενεργοποίηση που προκαλεί στην πρωτεΐνη p53 του κυτταρικού κύκλου.<sup>9</sup> Ενώ ο φυσιολογικός ιός για να πολλαπλασιαστεί πρέπει να απενεργοποιήσει την πρωτεΐνη p53, ο γενετικά τροποποιημένος ιός πολλαπλασιάζεται μόνο σε κύτταρα με μεταλλάξεις στην p53 όπως συμβαίνει σε καρκινικά κύτταρα. Η αποτελεσματικότητα της προσέγγισης σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία δοκιμάστηκε σε κλινικές μελέτες ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα της κεφαλής/τραχήλου.<sup>10</sup> Αν και ικανοποιητικό ποσοστό των ασθενών ανταποκρίθηκε στη θεραπεία, η εμπορική προώθηση του συγκεκριμένου ιού διεκόπη στην Αμερική. Παρόμοιες ογκολυτικές θεραπείες στοχεύουν κύτταρα με υπερενεργό RAS μονοπάτι ή ελαττωματική σηματοδότηση μέσω ιντερφερονών, και έχουν παρουσιάσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα χωρίς όμως να φτάσουν σε μελέτες τελικής φάσης.<sup>10,11</sup>

Σημαντικό εμπόδιο στην εφαρμογή της θεραπείας με ογκολυτικούς παράγοντες αποτελεί η φτωχή μεταγωγική ικανότητα των ιών η οποία ενδέχεται να οδηγήσει σε ένα μικρό μόνο ποσοστό λύσης των καρκινικών κυττάρων. Επιπρόσθετα, η υπάρχουσα ανοσία ενάντια στους αδενοϊούς συχνά οδηγεί σε ανοσολογική απόκριση και εξάλειψη του ιού προτού προλάβει να διαμολύνει τα κύτταρα. Αυτή την ανεπιθύμητη ανοσολογική απάντηση έχουν εκμεταλλευτεί οι επιστήμονες σε κάποιες περιπτώσεις ογκολυτικών ιών, ενσωματώνοντας ανοσοδιεγερτικά γονίδια, όπως αυτά των GM-CSF ή της ιντερλευκίνης 12.<sup>2</sup> Το κύριο πλεονέκτημα της ογκολυτικής θεραπείας είναι πως εξασφαλίζει ότι ο υγιής ιστός θα επηρεαστεί ελάχιστα. Επίσης, όταν συνδυαστεί με την έκφραση κυτταροτοξικών γονιδίων η θεραπεία αυτή μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο τα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα αλλά και αυτά στον περιβάλλοντα ιστό κάνοντας το μικροπεριβάλλον λιγότερο ευνοϊκό για την ανάπτυξη του καρκίνου.

## 2. Προσεγγίσεις που ενισχύουν στην αντίσταση του ξενιστή

### 2.1. Ανοσοθεραπεία

Η ανοσοθεραπεία αφορά την ενίσχυση του αμυντικού συστήματος ώστε να αναγνωρίσει, να εντοπίσει και

να καταστρέψει τα καρκινικά κύτταρα. Μελέτες σε ασθενείς με καρκίνο υποδεικνύουν την ύπαρξη αντισωμάτων και T-λεμφοκυττάρων που αναγνωρίζουν καρκινικά αντιγόνα, καθιστώντας το ανοσοποιητικό σύστημα ικανό να αναγνωρίζει ως ξένα τα κύτταρα του όγκου. Μία από τις πρώτες προσεγγίσεις αφορά τον εμβολιασμό του ασθενούς με ακέραια καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν καταστεί ανενεργά με ακτινοβολία και έχουν αναμιχθεί με ένα ανοσοενισχυτικό. Σε γενικές γραμμές ο εμβολιασμός αποτελεί μια αποτελεσματική στρατηγική για την προστασία των ζώων και των ανθρώπων από βακτηριδιακές και ιογενείς λοιμώξεις, αλλά τα εμβόλια δεν είναι γενικά αποτελεσματικά έναντι προϋπάρχουσας νόσου. Επιπρόσθετα, για να εδραιωθεί ο εμβολιασμός ως μια ασφαλής μέθοδος ενάντια στον καρκίνο θα πρέπει να βρεθούν ειδικά αντιγόνα τα οποία να απουσιάζουν από τα υγιή κύτταρα του ξενιστή. Οι πιο μελετημένες προσεγγίσεις που αφορούν τον εμβολιασμό κατά του καρκίνου παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Δεδομένου ότι σε αρκετές περιπτώσεις προχωρημένης ασθένειας το ανοσοποιητικό σύστημα είναι εξασθενημένο, οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι η ανοσοθεραπεία θα πρέπει να επάγει κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL) αντί αντισωμάτων.<sup>12</sup> Η αντιγονοπαρουσίαση στα T λεμφοκύτταρα επιτυγχάνεται μέσω των υποδοχέων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC I ή II). Οι MHC I υποδοχείς εκφράζονται σε όλα τα εμπύρρινα κύτταρα και οδηγούν στην άμεση ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων. Η αντιγονοπαρουσίαση μέσω των υποδοχέων MHC II, οι οποίοι συναντώνται σε αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα όπως τα δένδριτικά (DCs), οδηγεί σε προσαρμοστική ανοσοαπόκριση μέσω των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων (T helper cells). Και στις δύο περιπτώσεις σημαντική είναι η ανάπτυξη κυττάρων μνήμης, τα οποία σε επόμενη επαφή με το αντίγονο θα παρέχουν άμεση και ενισχυμένη ανοσία.

Στα πλαίσια αυτά, η γονιδιακή θεραπεία αποσκοπεί στη μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν καρκινικά αντιγόνα σε συνδυασμό με ανοσοδιεγερτικά μόρια όπως κυταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (π.χ. ιντερλευκίνη-2, GM-CSF). Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά *in vitro* ή *in vivo* ώστε να εκφράζουν γονίδια που επάγουν μια ή περισσότερες από τις φάσεις ενεργοποίησης των T λεμφοκυττάρων (Εικόνα 1). Στην περίπτωση όπου τα καρκινικά κύτταρα μετατρέπονται σε αντιγονοπαρουσιαστικά, η συλλογή γίνεται είτε από τον ασθενή (αυτόλογα κύτταρα) ή από καρκινικές κυτταρικές σειρές (αλλογενή κύτταρα). Στα κύτταρα αυτά εν συνεχεία προστίθενται ένα ή περισσότερα γονίδια με διάφορες μεθόδους μεταγωγής ή παροδικής διαμόλυνσης.<sup>13</sup> Ένας άλλος τύπος ανοσοθεραπείας που δοκιμάζεται είναι η άμεση έγχυση ανοσοδιεγερτικών γονιδίων *in vivo*. Στην περίπτωση αυτή το DNA λαμβάνεται και εκφράζεται από αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ή από τα

κύτταρα του όγκου.<sup>14,15</sup> Για ενίσχυση και εξειδίκευση της απόκρισης, τα συγκεκριμένα εμβόλια συνήθως εμπεριέχουν και καρκινικά αντιγόνα (π.χ. CEA).<sup>16-18</sup>

Εναλλακτικά, η γενετική τροποποίηση μπορεί να γίνει σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ασθενούς ώστε να τα ευαισθητοποιήσει στα καρκινικά κύτταρα. Σε αυτή την περίπτωση, χρησιμοποιούνται μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος ή μυελού των οστών από τον ασθενή τα οποία διαμολύνονται με καρκινικά αντιγόνα σε συνδυασμό με ανοσοδιεγερτικά μόρια *ex vivo*. Η χρήση δένδριτικών κυττάρων έχει δοκιμαστεί σε πληθώρα κλινικών μελετών με ανάμεικτα αποτελέσματα. Επιτυχές παράδειγμα αποτελεί το εμβόλιο κατά του καρκίνου του προστάτη που στοχεύει την όξινη φωσφατάση μέσω της έγχυσης δένδριτικών κυττάρων διαμολυσμένων με το αντίστοιχο cDNA.<sup>19</sup> Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα κλινικής μελέτης σε άνδρες με προχωρημένη νόσο συνέβαλαν στην έγκριση του προϊόντος στις ΗΠΑ. Ωστόσο, η επιτυχία της παραδοσιακής ανοσοθεραπείας αποδεικνύεται περιορισμένη καθώς τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς αποφυγής της ανοσολογικής ανίχνευσης. Αν και η βιβλιογραφία κατακλύζεται από σχετικές μελέτες με πολλά υποσχόμενα προκλινικά δεδομένα, οι επακόλουθες κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ποσοστά επιτυχίας της τάξης του 10%.

## 2.2. Θεραπεία με γενετικά τροποποιημένα T λεμφοκύτταρα

Λόγω των εγγενών ανεπαρειών στο ανοσοποιητικό σύστημα των ασθενών με καρκίνο, έχει εναλλακτικά μελετηθεί η άμεση ενίσχυσή του με τροποποίηση των T λεμφοκυττάρων *ex vivo* και στη συνέχεια επιστροφή των κυττάρων αυτών στον ασθενή. Η μεταφορά γενετικά τροποποιημένων T λεμφοκυττάρων αποτελεί μια υποσχόμενη στρατηγική στην καταπολέμηση του καρκίνου. Το κύριο πλεονέκτημα της είναι ότι προσπερνά την ανάγκη για αντιγονοπαρουσίαση, και ενεργοποιεί ακόμη και κύτταρα που έχουν πληγεί άμεσα από τον καρκίνο ή έμμεσα από χημειοθεραπεία.<sup>2</sup>

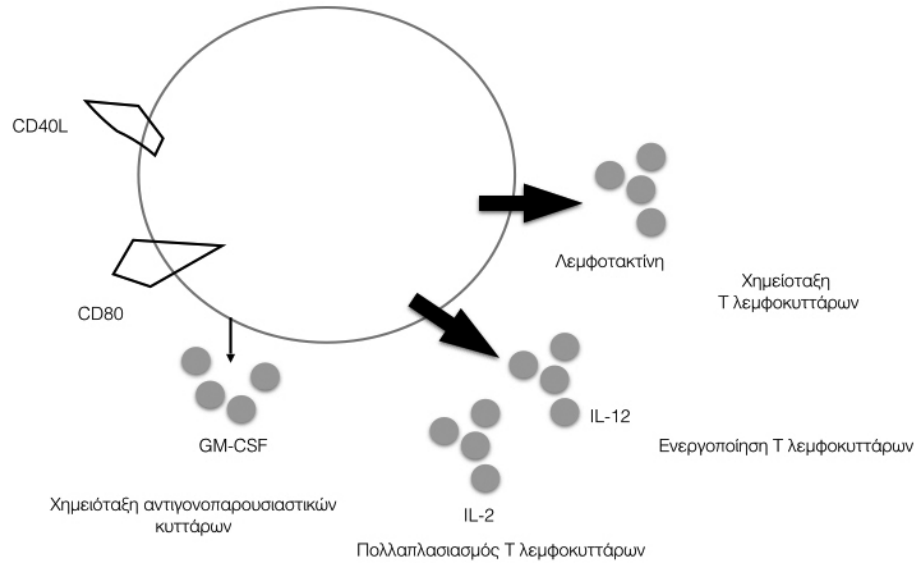
Για να εξαλειφθούν πιθανά προβλήματα στην απομόνωση και καλλιέργεια αυτόλογων T λεμφοκυττάρων από τον ασθενή, οι ερευνητές έχουν καταλήξει στη γενετική μεταφορά TCR υποδοχέων ειδικών για συγκεκριμένα καρκινικά αντιγόνα (π.χ. MART-1, CEA, MAGE-A3)<sup>20</sup> όπως φαίνεται στην Εικόνα 2Α. Σε κλινικές μελέτες, η μεταφορά γενετικά τροποποιημένων T λεμφοκυττάρων με TCR υποδοχείς, αν και επιφέρει μείωση του όγκου, παρουσιάζει σοβαρή τοξικότητα και κάποιες φορές οδηγεί και στην ανάπτυξη φλεγμονής. Αυτό υποδηλώνει ότι οι TCR υποδοχείς αντιδρούν και με το ίδιο αντιγόνο που εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα φυσιολογικά κύτταρα. Ένα περαιτέρω σοβαρό μειονέκτημα της συγκεκριμένης

νης μεθόδου έγκειται στο γεγονός ότι οι TCR υποδοχείς μπορεί να αλληλεπιδράσουν με συγκεκριμένα HLA, περιορίζοντας σημαντικά τη χρήση τους.

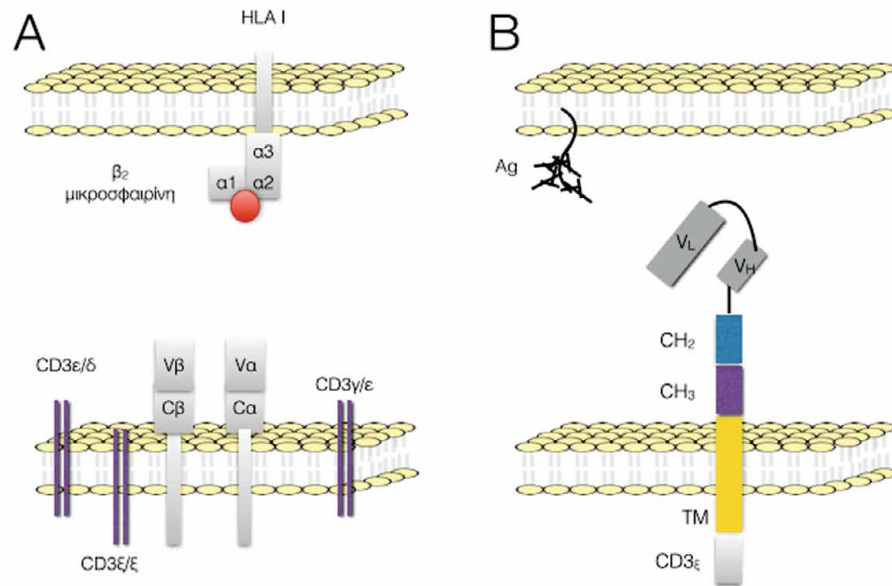
Η λύση στο πρόβλημα επήλθε με τη δημιουργία των χιμαϊρικών αντιγονοϋποδοχέων (chimeric antigen receptors, CARs) οι οποίοι συνδυάζουν την ενδοκυττάρια σημα-

**Πίνακας 1. Μειονεκτήματα και Πλεονεκτήματα Εμβολίων κατά του καρκίνου**

Τύπος εμβολίου	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
<b>Καρκινικά κύτταρα</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Εκτενώς μελετημένο</li> <li>2. Επεξεργάζεται για να ενισχύσει την αντιγονοπαρουσίαση</li> <li>3. Μπορεί να χορηγηθεί με ανοσοενισχυτικά</li> <li>4. Μεγάλη πιθανότητα να εκφράζει τα σχετικά καρκινικά αντιγόνα</li> <li>5. Τα καρκινικά αντιγόνα δεν χρειάζεται να ταυτοποιηθούν</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Προϋποθέτει την ύπαρξη αυτόλογου όγκου ή κυτταρικής σειράς που να μοιράζονται τα σχετικά καρκινικά αντιγόνα</li> <li>2. Μειωμένη Ικανότητα επαγωγής ανοσολογικής απόκρισης</li> </ol>
<b>Γενετικά τροποποιημένα καρκινικά κύτταρα</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Μεγάλη πιθανότητα να εκφράζουν τα σχετικά καρκινικά αντιγόνα</li> <li>2. Τα καρκινικά αντιγόνα δεν χρειάζεται να ταυτοποιηθούν</li> <li>3. Συχνά είναι τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν και ανοσοδιεγερτικά μόρια και κυτταροκίνες</li> <li>4. Χρήση αλλογενών καρκινικών κυτταρικών σειρών και ινοβλαστών ως προσέγγιση για την πιο γρήγορη παραγωγή εμβολίων</li> <li>5. Έχουν αναφερθεί ανοσολογικές και κλινικές αποκρίσεις στη θεραπεία</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Είναι απαραίτητη η ύπαρξη αλλογενούς όγκου ή καρκινικών κυτταρικών σειρών που να εκφράζουν τα σχετικά αντιγόνα του όγκου</li> <li>2. Μεγάλος χρόνος παραγωγής</li> <li>3. Αδύναμη αντιγονοπαρουσίαση από πολλά είδη όγκων</li> <li>4. Ανάγκη για <i>ex vivo</i> κυτταρική καλλιέργεια</li> <li>5. Κόστος, χρόνος και δυσκολία στην παραγωγή</li> </ol>
<b>Dna</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Έχει κατασκευαστεί έτσι ώστε να εκφράζει το καρκινικό αντιγόνο ενδιαφέροντος</li> <li>2. Εύκολη και σταθερή παραγωγή</li> <li>3. Μπορεί να χορηγηθεί απευθείας</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Απαιτεί λεπτομερή γνώση της γονιδιακής αλληλουχίας του αντιγόνου</li> <li>2. Απαραίτητη η δόση υψηλής ποσότητας πλασμιδιακού DNA ώστε να επάγει ανοσολογική απόκριση</li> </ol>
<b>Ιικοί φορείς</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Έχουν κατασκευαστεί ώστε να εκφράζουν το καρκινικό αντιγόνο ενδιαφέροντος</li> <li>2. Μπορούν να κατασκευαστούν ώστε να συνεκφράζουν ανοσοδιεγερτικά μόρια και κυτταροκίνες</li> <li>3. Μεγάλη ποικιλία διαθέσιμων φορέων</li> <li>4. Έχουν αναφερθεί κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Επικράτηση ιικών αντιγόνων έναντι καρκινικών αντιγόνων</li> <li>2. Ασθενής αντιικική απόκριση</li> <li>3. Κίνδυνος τοξικότητας</li> </ol>
<b>Δενδριτικά κύτταρα</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Χρήση ισχυρών αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων</li> <li>2. Ικανότητα παραγωγής μεγάλης ποσότητας δενδριτικών κυττάρων</li> <li>3. Τα αντιγόνα στόχοι μπορεί να είναι προσδιορισμένα ή και όχι</li> <li>4. Πολλαπλές μέθοδοι "φόρτωσης" αντιγόνων</li> <li>5. Έχουν αναφερθεί ανοσολογικές και κλινικές αποκρίσεις</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ανάγκη για <i>ex vivo</i> κυτταροκαλλιέργεια</li> <li>2. Κόστος, χρόνος και δυσκολία στη παρασκευή</li> <li>3. Πιθανότητα αντοχής στα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα</li> <li>4. Έλλειψη κριτηρίων για τυποποίηση τελικού προϊόντος</li> </ol>



**Εικόνα 1.** Γενετική τροποποίηση καρκινικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να τροποποιηθούν γενετικά ώστε να βελτιωθεί η αντιγονοπαρουσιαστική τους ικανότητα ή η ικανότητα τους να προσελκύουν αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) (CD40L, GM-CSF), να προσελκύουν ή να ενεργοποιούν Τ λεμφοκύτταρα (CD80, IL12) ή να ενεργοποιούν την κλωνική έκπτυξη των Τ λεμφοκυττάρων (IL2).



**Εικόνα 2.** Γενετική τροποποίηση του Τ λεμφοκυτταρικού Υποδοχέα (TCR). Στο πάνελ Α φαίνεται ο κυτταρικός υποδοχέας με τις α (VaCa) και (VβCβ) αλυσίδες που αναγνωρίζει πεπτίδια συνδεδεμένα με μόρια HLA τάξης I (σύμπλοκο β2 μικροσφαιρίνης, α1, α2, α3). Ο χημειρικός TCR (πάνελ Β) αναγνωρίζει το αντιγόνο (Ag) με τις αλυσίδες VL και VH (προερχόμενες από ανοσοσφαιρίνη) οι οποίες έχουν συνδεθεί με το σηματοδοτικό τμήμα του TCR (CH2, CH3, TM και CD3ξ).

τοδοτική ικανότητα των TCR υποδοχέων με το τμήμα πρόσδεσης αντιγόνου ενός μονοκλωνικού αντισώματος (Εικόνα 2B). Οι CARs παρέχουν την ευελιξία ενός μονοκλωνικού αντισώματος όσο αφορά την αναγνώριση αντιγόνων ανεξαρτήτου ιστοσυμβατότητας, ενώ διατηρούν

την ικανότητα των Τ λεμφοκυττάρων να στρατολογούν διάφορους μηχανισμούς ανοσοαπόκρισης (κυτταρικούς και χημικούς) ενάντια στον όγκο.

Στην πράξη, η χρήση γενετικά τροποποιημένων Τ λεμφοκυττάρων με CAR υποδοχείς δεν επέφερε τα αναμε-

νόμμενα αποτελέσματα.<sup>21</sup> Περαιτέρω τροποποιήσεις των υποδοχέων με την ενσωμάτωση συνδιεγερτικών μορίων (π.χ. CD27, CD28) οδήγησε σε καλύτερη ενεργοποίηση και επιβίωση των T λεμφοκυττάρων.<sup>22</sup> Ενθαρρυντικά είναι και τα κλινικά αποτελέσματα μετά από έγχυση T λεμφοκυττάρων που φέρουν τους βελτιωμένους CAR υποδοχείς σε ασθενείς με οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία ή νευροβλάστωμα.<sup>23-30</sup> Παρ' όλα αυτά, πολλοί όγκοι μπορεί να αποδειχθούν εντελώς ανθεκτικοί σε αυτή την αντιμετώπιση επειδή διαθέτουν στρατηγικές διαφυγής της ανοσολογικής απόκρισης. Γι' αυτό το σκοπό, ενισχύεται η δραστηριότητα των T λεμφοκυττάρων έναντι του όγκου με στρατηγικές που αποσκοπούν στη βελτίωση της μετανάστευσης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης τους *in vivo*. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη γονιδίων για χημειοτακτικούς παράγοντες, για κυτταροκίνες ή με την εξουδετέρωση της έκφρασης του ανασταλτικού παράγοντα FasL. Επιπρόσθετη ασφάλεια στην όλη διαδικασία προσδίδει η συν-μεταφορά γονιδίων αυτοκτονίας, όπως της κινάσης της θυμιδίνης (HSV-tk), που μπορεί να ενεργοποιηθούν αν χρειαστεί.

## Συμπεράσματα και Προοπτικές

Γιατί ο εμβολιασμός κατά του καρκίνου δεν έχει επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα; Η επιτυχία της χρήσης αυτόλογων καρκινικών κυττάρων εξαρτάται από την πιθανότητα αποφυγής της ανοσοαπόκρισης και από τα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου. Επιπρόσθετα, η αποτυχία του εμβολιασμού ως αντι-καρκινικής θεραπείας, μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη ενός μικρού κυτταρικού υποπληθυσμού, των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs, Cancer Stem Cells). Αντίστοιχα με τα φυσιολογικά αρχέγονα κύτταρα, τα CSCs παρουσιάζουν την ικανότητα αυτο-ανανέωσης και σε αυτά οφείλεται η αρχική ανάπτυξη του όγκου καθώς και η υποτροπή. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι σε αυτόν τον κυτταρικό πληθυσμό οφείλεται και η αντίσταση του καρκίνου στη χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Βάσει των δεδομένων αυτών, η στόχευση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων, της ρίζας της καρκινογένεσης αποτελεί τη νέα στρατηγική θεραπείας του καρκίνου.

Το μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελεί έναν εναλλακτικό θεραπευτικό στόχο, δεδομένου του ρόλου που παίζει στην ανάπτυξη και στην δρραίωση του καρκίνου. Στο μικροπεριβάλλον, σημαντικό ρόλο παίζει η αγγειογένεση που είναι αναγκαία για την εξέλιξη του καρκίνου και φάρμακα τα οποία την παρεμποδίζουν έχουν σημαντική θεραπευτική αξία. Η αγγειογένεση είναι μια σύνθετη διαδικασία η οποία εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών και αγγειοκατασταλτικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μονο-

κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα αιμοπετάλια.<sup>30</sup>

Μέσω της γονιδιακής θεραπείας θα μπορούσε να στοχευθεί η αγγείωση του όγκου παρεμποδίζοντας την έκφραση και δράση ενός ή περισσοτέρων αγγειογενετικών παραγόντων [π.χ. του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα (bFGF) ή του ηπατικού αυξητικού παράγοντα (HGF)]. Εναλλακτικά, η έκφραση αναστολέων της αγγειογένεσης (π.χ. της ενδοστατίνης, αγγειοστατίνης, θρομβοσπονδίνης-1) αποτελεί μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση που στοχεύει στο μικροπεριβάλλον του όγκου.<sup>30</sup>

Σε γενικές γραμμές, η γονιδιακή θεραπεία για τον καρκίνο εγκυμονεί κινδύνους λόγω της χρήσης εξωγενούς γενετικού υλικού και την ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου. Παρ' όλη την αναπτυσσόμενη τεχνολογία φορέων για γονιδιακή μεταφορά, η ενσωμάτωση των ικόν φορέων παραμένει τυχαία και διατρέχει τον κίνδυνο της περαιτέρω μεταλλαξιγένεσης στα ήδη παθολογικά καρκινικά κύτταρα. Η συνεχής τεχνολογική ανάπτυξη φορέων όμως που φέρουν ρυθμιστικά στοιχεία και μονωτές της χρωματίνης για μεταγραφική αυτονομία, υπόσχεται να μειώσει την πιθανότητα ενεργοποίησης ογκογονιδίων λόγω της ενσωμάτωσης των φορέων.

Εν αντιθέσει με την τοξικότητα από τα κοινά φάρμακα, τα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ενδέχεται να έχουν πολλαπλάσια καρκινική δράση όταν παραμένουν *in vivo*. Επίσης ο εμβολιασμός με απευθείας έγχυση DNA *in vivo* ενδέχεται να προκαλέσει ανεπιθύμητη ενσωμάτωση του γονιδίου σε φυσιολογικούς κυτταρικούς πληθυσμούς. Σαν διακόπτης ασφαλείας σε περιπτώσεις μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιείται η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την HSV-tk, μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική η οποία βρίσκεται σε τελική φάση κλινικών δοκιμών σε T λεμφοκυτταρική θεραπεία.<sup>31</sup> Πρέπει όμως να επισημάνουμε ότι η δράση της είναι χρονοβόρος και ενδέχεται να είναι ατελής αν τα κύτταρα βρίσκονται σε μεταμιτωτικό στάδιο. Επιπλέον, λόγω της ικής προέλευσης του γονιδίου, μπορεί να προκαλέσει και ανοσοαπόκριση πριν προλάβει να δράσει.

Αν και ελάχιστα εγκεκριμένα προϊόντα γονιδιακής θεραπείας του καρκίνου έχουν αναπτυχθεί κατά τα τελευταία 20 χρόνια, αυτό αναμένεται ότι σύντομα θα αλλάξει. Είναι πλέον κοινά αποδεκτό ότι, λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης του καρκίνου, απαιτείται πρόοδος όσον αφορά την κατανόηση της βιολογίας του για να μπορέσουν να αναπτυχθούν εξατομικευμένες θεραπείες που θα έχουν υψηλή αποτελεσματικότητα σε συγκεκριμένες υποκατηγορίες ασθενών. Καθώς οι ερευνητές έχουν αρχίσει να αξιοποιούν ένα συνδυασμό συνεργικών προσεγγίσεων για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου, μπορούμε να ελπίζουμε για μεγαλύτερη επιτυχία στον τομέα αυτό στο εγγύς μέλλον.

## Gene therapy for cancer: Promises or reality?

by Elena K. Siapati<sup>1</sup>, Konstantina Vaitis<sup>1</sup>, George Vassilopoulos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Gene Therapy Laboratory, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (BRFAA),

<sup>2</sup>Haematology Clinic, Medical School, University of Thessaly, Greece

**ABSTRACT:** Research on gene therapy for cancer had set high standards over the past 20 years but has essentially delivered very little. Since cancer is an acquired genetic disorder, gene therapy can accommodate individual genetic variability, thereby minimising the toxicities achieved with generic drugs. In this review we present the strategies employed for the gene therapy of cancer, the obstacles and ways around them. Recent technological advances in the field indicate that gene transfer could finally entail a powerful approach for the development of safe and efficacious treatment of cancer.

### Βιβλιογραφία

1. Cross D, Burmester JK. Gene therapy for cancer treatment: Past, Present and Future. *Clinical Medicine & Research*. 2006; 4:218-227.
2. Brenner KM, Gottschalk S, Leen MA, Vera FJ. Is Cancer Gene Therapy an empty suit? *Lancet Oncology*. 2013; 14:e447-456.
3. Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011; 365:2357-2365.
4. Niculescu-Duvaz I, Springer CJ. Introduction to the background, principles, and state of the art in suicide gene therapy. *Mol Biotechnol*. 2005; 30:71-88.
5. Westphal M, Yi-Herttuala S, Martin J, et al. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. (in press).
6. Chiocca EA. Oncolytic Viruses. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:938-950.
7. Lin E, Nemunaitis J. Oncolytic viral therapies *Cancer Gene Therapy*. 2004; 11:643-664.
8. Liu TC, Galanis E, Kim D. Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol*. 2007; 4:101-117.
9. Heise C, Sampson-Johannes A, Williams A, McCormick F, Von Hoff DD, Kim DH. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med*. 1997; 3:639-645.
10. Patel MR, Kratzke RA. Oncolytic virus therapy for cancer: the first wave of translational clinical trials. *Transl Res*. 2013; 161:355-364.
11. Heo J, Reid T, Ruo L, et al. Randomized dose-finding clinical trial of oncolytic immunotherapeutic vaccinia JX-594 in liver cancer. *Nat Med*. 2013; 19:329-336.
12. Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, et al. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest*. 2004; 113:1515-1525.
13. Siapati KE, Barker S, Kinnon C, et al. Immunotherapy for neuroblastoma using syngeneic fibroblasts transfected with IL-2 and IL-12. *British Journal of Cancer*. 2003; 88:1641-1648.
14. Stevenson FK, Mander A, Chudley L, Ottensmeier CH. DNA fusion vaccines enter the clinic. *Cancer Immunol Immunother*. 2011; 60:1147-1151.
15. Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev*. 2011; 239:62-84.
16. Timmerman JM, Singh G, Hermanson G, et al. Immunogenicity of a plasmid DANN vaccine encoding chimeric idiootype in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res*. 2002; 62:5845-5852.
17. Tagawa ST, Lee P, Snively J, et al. Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with stage IV melanoma. *Cancer*. 2003; 98:144-154.
18. Conry RM, Curiel DT, Strong TV, et al. Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:2782-2787.
19. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363:411-422.
20. Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, et al. Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother*. 2013; 36:133-151.
21. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006; 314:126-129.
22. Gottschalk S, Edwards OL, Sili U, et al. Generating CTLs against the subdominant Epstein-Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. *Blood*. 2003; 101:1905-1912.
23. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011; 365:725-733.
24. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*. 2011; 3:95ra73.
25. Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, et al. B-cell depletion and remissions of malignancy along with cy-

- tokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood*. 2012; 119:2709-2720.
26. Brentjens RJ, Riviere I, Park JH, et al. *Blood*. 2011; 118:4817-4828.
27. Savoldo B, Ramos CA, Liu E, et al. *J Clin Invest*. 2011; 121:1822-1826.
28. Brentjens RJ, Davila ML, Riviere L, et al. Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Sci Transl Med*. 2013;5:177ra38.
29. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptormodified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 368:1509-1518.
30. Tandle A, Blazer GD, Libutti KS. Antiangiogenic gene therapy of cancer: recent developments. *Journal of Translational Medicine*. 2004; 2:22.
31. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011; 365:1673–1683.

## Γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία για τη β-Μεσογειακή Αναιμία και τη Δρεπανοκυτταρική Νόσο με επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs): Οι νέοι ορίζοντες

Ειρήνη Παπαπέτρου

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Τα τελευταία χρόνια, καινοτομίες στην έρευνα των ανθρώπινων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (human pluripotent stem cells, hPSCs), ήτοι ο κυτταρικός επαναπρογραμματισμός και η ανάπτυξη προηγμένων τεχνολογιών γενετικής μηχανικής, άνοιξαν νέους ορίζοντες για την κυτταρική και γονιδιακή θεραπεία. Η προοπτική χρήσης των hPSCs, είτε αυτόλογων είτε ιστοσυμβατών, ως κυττάρων-στόχων για γενετική τροποποίηση και παράλληλα η χρήση των διαφοροποιημένων απογόνων τους σαν κυτταρικά προϊόντα για μεταμόσχευση, αποτελεί μία νέα προσέγγιση στην αναγεννητική ιατρική, με τεράστιες δυνατότητες για τη θεραπεία διαταραχών του αίματος όπως της β-Μεσογειακής Αναιμίας (β-MA) και της Δρεπανοκυτταρικής νόσου (ΔΝ). Παρ' όλη την ταχεία πρόοδο και τα αισιόδοξα μηνύματα του πεδίου, πολλά εμπόδια παραμένουν προτού η κλινική εφαρμογή αποτελέσει υλοποιήσιμο στόχο. Στην παρούσα ανασκόπηση, αναλύουμε τα θεωρητικά πλεονεκτήματα των κυτταρικών θεραπειών που χρησιμοποιούν παράγωγα των hPSC, τις πρόσφατες μελέτες που τεκμηριώνουν τις βασικές αρχές της τεχνολογίας και τις κύριες προκλήσεις που αντιμετωπίζουμε για την εφαρμογή της τεχνολογίας σε κλινικό επίπεδο.

Haema 2016; 7(1): 100-110 Copyright EAE

### I. Γιατί επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC);

Η γονιδιακή θεραπεία για τη β-MA χρησιμοποιώντας Αρχέγονα Αιμοποιητικά Κύτταρα (AAK) εφαρμόζεται ήδη σε κλινικό επίπεδο<sup>1,2</sup>, και παρόλο που η απόδοση και η ασφάλειά της είναι ακόμα υπό αξιολόγηση, έχει επιδείξει ευοίωνα αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένου κλινικού οφέλους σε ένα ασθενή<sup>1</sup>. Μπορούμε λοιπόν να αναρωτηθούμε: Γιατί να εξετάσουμε εναλλακτικές στρατηγικές; Θα αναλύσουμε πρώτα τις προκλήσεις και τους περιορισμούς των σύγχρονων γονιδιακών θεραπειών που βασίζονται στα AAK για τη θεραπεία της β-Μεσογειακής Αναιμίας (β-MA) και της Δρεπανοκυτταρικής Νόσου (ΔΝ) και τα δυνητικά οφέλη που προσφέρουν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSC) έναντι εκείνων των AAK.

### Περιορισμοί των γονιδιακών θεραπειών που βασίζονται στα AAK

Οι σύγχρονες προσεγγίσεις της κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας για τη β-MA και την ΔΝ, όπως και όλες οι σχετικές προσεγγίσεις για γενετικές διαταραχές του αιμοποιητικού συστήματος, χρησιμοποιούν τα AAK ως στόχο για απομόνωση, γονιδιακή τροποποίηση και μεταμόσχευση στον εκάστοτε ασθενή (Εικόνα 1). Το μείζον πλεονέκτημα αυτής της στρατηγικής είναι ότι εκμεταλλεύεται την αξιοσημείωτη ικανότητα των AAK να ανασυστήσουν το αιμοποιητικό σύστημα στο σύνολό του ενώ επωφελείται από την εκτενή τεχνολογία που προέρχεται από το πεδίο της μεταμόσχευσης των AAK. Η συγκεντρωμένη εμπειρία του πεδίου έδωσε βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα και τυποποιημένες τεχνικές για την κινητοποίηση, την απομόνωση, τον *ex vivo* χειρισμό, την κρυοσυντήρηση και την χορήγηση των AAK στον ασθενή. Υιοθετώντας αυτές τις τεχνικές, οι ειδικοί στη γονιδιακή θεραπεία, μπορούν να απομονώσουν αιμοποιητικά κύτταρα, να εμπλουτίσουν τον πληθυσμό των AAK σε αυτά, να μεταφέρουν το θεραπευτικό γονίδιο (στα περισσότερα

Departments of Oncological Sciences, Hematology and Medical Oncology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA

Συγγραφέας υπεύθυνος για επικοινωνία: Ειρήνη Παπαπέτρου, M.D., Ph.D., e-mail: eirini.papapetrou@mssm.edu

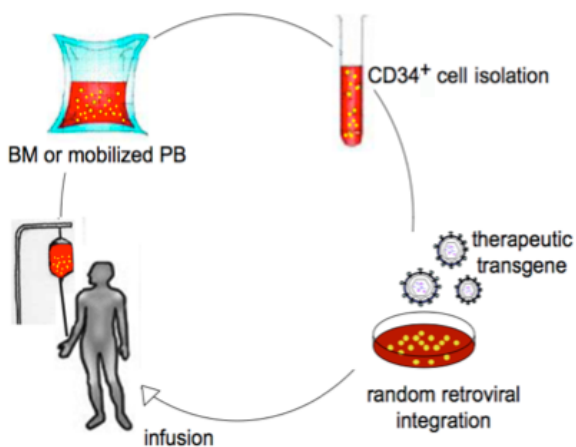


από αυτά) μετά από ένα σύντομο διάστημα καλλιέργειας, και να επιστρέψουν τα κύτταρα στον ασθενή (Εικόνα 1).

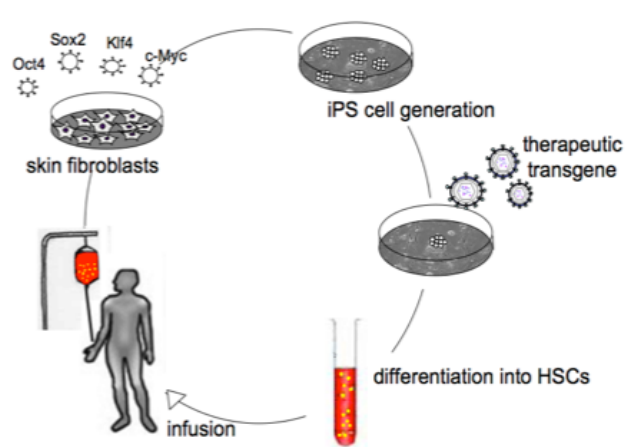
Παρ' όλη την αξιοσημείωτη πρόοδο, τη μερική επιτυχία και το μελλοντικό της δυναμικό, αυτή η εφαρμογή υπόκειται σε έναν σημαντικό περιορισμό, εγγενή στη χρήση των AAK ως στόχων. Ο περιορισμός συνίσταται στην αδυναμία να διατηρηθούν τα AAK *ex vivo* παρά μόνο για μια σύντομη περίοδο (τυπικά έως 72 ώρες). Παρά τις κοπιώδεις προσπάθειες, δεν έχουν ακόμα τυποποιηθεί οι συνθήκες καλλιέργειας που επιτρέπουν τον εμπλουτισμό ή τη διατήρηση των AAK *ex vivo* σε κατάσταση πλειοδυναμίας χωρίς απώλεια της ικανότητας για μεταμόσχευση. Η ανάγκη για βραχείς *ex vivo* χειρισμούς των AAK, επιβάλλει σημαντικούς περιορισμούς στις στρατηγικές γενετικής τροποποίησης: περιορίζει την επιλογή μεθόδων μεταγωγής, την δυνατότητα ποιοτικού ελέγχου των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων και αποκλείει τη δυνατότητα εφαρμογής σταδίων επιλογής ή απόρριψης. Είναι εύλογο λοιπόν, ότι τεχνολογίες που επιτρέπουν αρκετά υψηλό ποσοστό γενετικά τροποποιημένων AAK επί του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού, είναι η μόνη ρεαλιστική επιλογή για μια αγωγή γονιδιακής θεραπείας με θεραπευτικό δυναμικό. Ιικοί φορείς προερχόμενοι αρχικά από την οικογένεια των γάμα ρετροϊών (κυρίως από τον ιό της λευχαιμίας των επίμων, MLV) και στη συνέχεια από την οικογένεια των λεντιϊών (κυρίως από

τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας, HIV-1), έχουν προς το παρόν αποτελέσει τις μοναδικές τεχνολογίες μεταφοράς γονιδίων, που είναι αρκετά αποδοτικές, ώστε να επιτρέπουν την έκφραση του διαγονιδίου στο αιμοποιητικό σύστημα σε επίπεδα που έχουν θεραπευτική δράση. Η αποδοτική μεταφορά γονιδίων μέσω ρετροϊκών και λεντικών φορέων βασίζεται στην τυχαία (ή περίπου τυχαία) ενσωμάτωση του διαγονιδίου στο γονιδίωμα, η οποία είναι εκτενώς καταγεγραμμένο ότι προκαλεί διεισδυτική μεταλλαξιγένεση (insertional mutagenesis). Η τελευταία αποτελεί σοβαρό κίνδυνο καρκινικής εξαλλαγής, συνήθως λόγω ενεργοποίησης της έκφρασης ενός ογκογονιδίου από τον υποκινητή ή ενισχυτή του φορέα ή σπανιότερα λόγω αλλοίωσης (που οδηγεί σε σύντηξη ή σε ανώμαλα ματισμένα γονιδιακά προϊόντα) ογκογονιδίων που εδράζονται στο σημείο ενσωμάτωσης του φορέα στο γονιδίωμα του κυττάρου στόχου. Η λευχαιμογένεση λόγω διεισδυτικής μεταλλαξιγένεσης συνιστά προς το παρόν, το πιο σοβαρό και ανησυχητικό πρόβλημα της γονιδιακής θεραπείας με στόχο τα AAK. Παρόλο που η επικινδυνότητα της μεθόδου πρόκειται να μειωθεί αισθητά πιθανότατα σε κλινικά ανεκτά επίπεδα χρησιμοποιώντας τους αυτό-αδρανοποιούμενους φορείς (self-inactivating, SIN), ο κίνδυνος της ογκογένεσης θα παραμείνει υπολογίσιμος. Η αποφυγή της τυχαίας ένθεσης του εξωγενούς DNA στα AAK θα μπορούσε ίσως να

## Genetic modification of HSCs



## Genetic modification of iPSCs



**Εικόνα 1.** Κυτταρική και Γονιδιακή θεραπεία με τη χρήση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (AAK ή HSC αριστερά) ή επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων (iPSCs δεξιά). Αριστερά: Η σύγχρονη τεχνολογία κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας του αιμοποιητικού συστήματος περιλαμβάνει την απομόνωση AAK από το περιφερικό αίμα ή από το ΜΟ, απομόνωση των CD34<sup>+</sup> κυττάρων, διαμόλυνση με το θεραπευτικό φορέα (ρετροϊό ή λεντιϊό) και έγχυση των κυττάρων στον ασθενή. Δεξιά: Η μελλοντική χρήση iPSC αντί HSC θα περιλαμβάνει: α) απομόνωση σωματικών κυττάρων (π.χ. ινοβλάστες δέρματος, κύτταρα του αίματος, λιποκύτταρα και κερατινοκύτταρα), β) επαναπρογραμματισμό και απομόνωση 1-2 iPSC κλώνων, γ) γενετική τροποποίηση για την επιδιόρθωση του προβλήματος (στην εικόνα φαίνεται ένας ρετροϊός αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιαδήποτε άλλη τεχνολογία) και δ) διαφοροποίηση σε AAK και έγχυση στον ασθενή.

γίνει εφικτή μέσω προσεγγίσεων γονιδιακής διόρθωσης, οι οποίες χρησιμοποιούν ενδονουκλεάσες με συγκεκριμένες θέσεις αναγνώρισης, όπως οι νουκλεάσες δακτυλίου ψευδαργύρου ZFN. Οι τελευταίες έχει προσφάτως αποδειχτεί ότι μπορούν να είναι δυνητικά αρκετά αποδοτικές, τουλάχιστον σε ορισμένες εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας. Παρόλα αυτά, δεδομένα για τις ZFN σε κλινικό επίπεδο εκκρεμούν. Μείζονος σημασίας εμπόδιο για την εφαρμογή των ZFN, αποτελεί ο κίνδυνος γεγονότων εξαλλαγής των AAK μέσω εκτοπικών θραύσεων της διπλής αλυσίδας του DNA (double strand breaks, DSB) στο γονιδίωμα, ο οποίος προς το παρόν δεν έχει αξιολογηθεί επαρκώς και αποτελεί σημαντικό λόγο ανησυχίας.

Στην επόμενη παράγραφο θα αναλύσουμε το μείζον πλεονέκτημα των iPSCs ως στόχων για συνδυασμένη γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία: η γενετική τροποποίηση εφαρμόζεται σε κύτταρα (iPSC) που μπορούν να διατηρηθούν *ex vivo* και να χαρακτηριστούν εκτενώς για την πιστότητα και την ακρίβεια τις γενετικής διόρθωσης αλλά και να ελεγχθούν για επιπλέον παραμέτρους ασφαλείας, όπως κρίνεται απαραίτητο. Τα κύτταρα που περνούν επιτυχώς τον ποιοτικό έλεγχο αυτό, χαρακτηρίζονται ταυτοχρόνως επαρκή για να επιφέρουν θεραπευτικό αποτέλεσμα αλλά και ασφαλή για να καλλιεργηθούν σε κλινική κλίμακα ώστε ακολούθως να διαφοροποιηθούν στον επιθυμητό κυτταρικό τύπο για μεταμόσχευση.

### **iPSCs: Χαρακτηριστικά και καταβολές**

Σε μια πρωτοποριακή μελέτη που ανακοινώθηκε το 2006, ο Yamanaka στο Πανεπιστήμιο του Κιότο, κατόρθωσε την απευθείας παραγωγή κυττάρων από σωματικά κύτταρα επίμυος με χαρακτηριστικά πλειοδυναμίας, μέσω παροδικής έκφρασης μόνο τεσσάρων γονιδίων: των *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* και *c-Myc*<sup>3</sup>. Σε λιγότερο από ένα χρόνο αργότερα οι ίδιοι ερευνητές και η ομάδα του Jamie Thomson από το Πανεπιστήμιο του Wisconsin, αναπαρήγαγαν το αποτέλεσμα αυτό σε ανθρώπινα κύτταρα<sup>4,5</sup>. Αυτή η καταπληκτική ανακάλυψη, η οποία έκανε εφικτή για πρώτη φορά τη δημιουργία αυτόλογων πλειοδυναμών βλαστοκυττάρων (human pluripotent stem cells, hPSCs) από κάθε άνθρωπο, βασίστηκε σε προηγούμενα ευρήματα: στις αρχές του επαναπρογραμματισμού των κυττάρων του Hal Weintraub (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA)<sup>6</sup>, στην επαγωγή πλειοδυναμίας σε σωματικά κύτταρα αμφιβίων (δεκαετία του 1950, John Gurdon, Πανεπιστήμιο της Οξφόρδης) και προβάτων (Ian Wilmut, δεκαετία του 90, Πανεπιστήμιο του Εδιμβούργου)<sup>7,8</sup> και στις τεχνικές εξελίξεις στην απομόνωση ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστοκυττάρων (EB) από τον Jamie Thomson, επίσης τη δεκαετία του '90<sup>9</sup>. Δύο μοναδικά χαρακτηριστικά των hPSCs τα καθιστούν εξαιρετικά εργαλεία για έρευνα και θεραπευτική εφαρμογή: α)

η ικανότητα απεριόριστης αυτό-ανανέωσης *in vitro*, η οποία επιτρέπει τη διατήρηση των κυττάρων αυτών σαν κυτταρικές σειρές και β) η (θεωρητική) δυνατότητα για κατευθυνόμενη διαφοροποίηση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ανθρώπινου σώματος. Πρακτικά, το τελευταίο εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των κατάλληλων μεθόδων διαφοροποίησης *in vitro* για ένα δεδομένο κυτταρικό τύπο. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, τα hPSCs (συμπεριλαμβανομένων των iPSCs) προσφέρουν την δυνατότητα για γενετικό χειρισμό, που κανένας άλλος ανθρώπινος πρωτογενής κυτταρικός τύπος δεν παρουσιάζει. Έτσι, στα κύτταρα αυτά: 1) μπορούν να εφαρμοστούν μη αποδοτικές, αλλά ακριβείς μέθοδοι γενετικής τροποποίησης και 2) γίνεται εφικτή η επιλογή και ο ποιοτικός έλεγχος κυτταρικών κλώνων που είναι φορείς μιας επιθυμητής και καμμίας άλλης γενετικής τροποποίησης.

Στις αρχικές μελέτες παραγωγής iPSCs χρησιμοποιήθηκαν οι μόνιμα εντιθέμενοι στο DNA γάμμα-ρετροϊκοί ή λεντιϊκοί φορείς για να εκφραστούν οι παράγοντες επαναπρογραμματισμού (τυπικά οι OCT4, SOX2, KLF4 και c-MYC, ή συνδυασμός άλλων παραγόντων). Παρά το γεγονός ότι τα γονίδια που εκφράζουν τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού σταματούν να εκφράζονται όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, η μόνιμη ενσωμάτωσή τους στο γονιδίωμα των iPSC μπορεί να προκαλέσει κάποια προβλήματα: α) ακόμα και χαμηλά επίπεδα υπολειμματικής έκφρασης των παραγόντων μπορεί να τροποποιήσει τα μοριακά και πιθανώς τα λειτουργικά χαρακτηριστικά των κυτταρικών σειρών iPSC, β) πιθανή επανενεργοποίηση της έκφρασης των παραγόντων μπορεί να αναστείλει τη διαφοροποίηση ή να προάγει την ογκογονικότητα και γ) είναι γνωστό ότι η τυχαία ενσωμάτωση των ρετροϊκών φορέων προκαλεί μεταλλαξιγένεση λόγω ένθεσης όπως αναφέρθηκε.

Η παρατήρηση ότι η έκφραση των παραγόντων μετά το πέρας του επαναπρογραμματισμού δεν είναι απαραίτητη<sup>4,10-12</sup> και η ανάγκη να κινηθεί το ερευνητικό πεδίο προς την ανάπτυξη μεθόδων για κλινική εφαρμογή, οδήγησε πολλούς ερευνητές να διερευνήσουν τεχνικές παραγωγής iPSC χωρίς μόνιμη ενσωμάτωση των διαγονιδίων στο DNA του κυττάρου. Η πρώτη γενιά φορέων που παρέκαμπταν την μόνιμη ενσωμάτωση των διαγονιδιακών παραγόντων ήταν εκτεμνόμενοι (excisable). Πρόκειται για φορείς, πλασμιδιακούς ή λεντιικούς<sup>13,14-18</sup>, οι οποίοι αρχικά εντίθενται στο γονιδίωμα και στη συνέχεια μπορούν να αποκοπούν, μέσω των συστημάτων Cre/loxP ή του piggyBac τρανσποζονίου και τρανσποζάσης<sup>13,19,20</sup>. Το μείζον πλεονέκτημα των εκτεμνόμενων συστημάτων, ειδικά των λεντιικών, είναι ότι διατηρούν την υψηλή απόδοση επαναπρογραμματισμού των εντιθέμενων φορέων. Ένα μειονέκτημά τους είναι η ανάγκη για ένα επιπλέον στάδιο παροδικής εξωγενούς έκφρασης της ρεκομπινάσης (ή τρανσποζάσης) και επιλογής κλώνων με εξακρι-

βωμένη πλήρη εκτομή του φορέα, γεγονός που παρατείνει τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ακόμα ένα αξιοσημείωτο μειονέκτημα είναι ότι οι εκτεμνόμενοι μέσω Cre φορείς αφήνουν μετά την αποκοπή τους, ένα αποτύπωμα 30 νουκλεοτιδίων (μία αλληλουχία loxP) και θα πρέπει να βεβαιωθούμε ότι αυτό δεν επηρεάζει το γονιδίωμα του κυττάρου κατά κάποιον τρόπο. Έχει προταθεί ότι μια υπολειμματική περιοχή loxP μπορεί να θεωρηθεί «ακίνδυνη» εάν εδρεύει εκτός κωδικοποιουσών αλληλουχιών<sup>21</sup>. Εναλλακτικά, τα συστήματα τρανσποζάσης μπορούν να πραγματοποιήσουν μη υπολειμματική εκτομή, αλλά η πιθανότητα μετάθεσης σε άλλη γονιδιακή αλληλουχία θα πρέπει να αποκλειστεί.

Ακολούθως, αναπτύχθηκαν μέθοδοι άνευ ένθεσης για την παραγωγή iPSC από ανθρώπινα κύτταρα ή κύτταρα επίμυος, ελεύθερα από την παρουσία διαγονιδίων<sup>22</sup>. Αυτές περιλαμβάνουν: α) μη-εντιθέμενους (επισωματικούς) φορείς DNA και β) μεθόδους ελεύθερες από DNA. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνονται οι αδενοϊοί<sup>23</sup>, τα συμβατικά πλασμίδια<sup>24</sup>, τα oriP/EBNA1 επισώματα<sup>25</sup> και τα mini-κυκλικά DNA<sup>26</sup>. Παρόλο που όλες αυτές οι μέθοδοι έχουν τη δυνατότητα παραγωγής γενετικά μη τροποποιημένων iPSC, το κύριο μειονέκτημά τους είναι η γενικά χαμηλή απόδοση επαναπρογραμματισμού, η οποία είναι συχνά τάξεις μεγέθους χαμηλότερη σε σχέση με εκείνη των εντιθέμενων φορέων και για το λόγο αυτό ανεπαρκής για την παραγωγή iPSC από βιοψίες ασθενών. Δευτερευόντως, τα iPSC που προκύπτουν από αυτές τις μεθόδους πρέπει να διερευνηθούν για έλλειψη εξωγενούς DNA και μπορεί να φέρουν τυχαία εντεθειμένα θραύσματα του φορέα, τα οποία να διαφεύγουν της διακριτικής ικανότητας των κλασικών τεχνικών PCR. Οι μέθοδοι χωρίς τη χρήση DNA, βασίζονται στη μεταγωγή μορίων RNA μέσω φορέων του ιού Sendai<sup>27</sup> ή μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων διαμόλυνσης (transfection) με τροποποιημένα μόρια mRNA<sup>28</sup> ή μέσω της εφαρμογής πρωτεϊνών ή κυτταρικών εκχυλισμάτων<sup>29,30</sup>. Το μείζον πλεονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η παραγωγή iPSC με πλήρη απουσία ένθεσης εξωγενούς DNA στο γονιδίωμά τους. Όμως, η εξαιρετικά χαμηλή αποδοτικότητα και η ελειμματική επαναληψιμότητα του επαναπρογραμματισμού με τη χρήση πρωτεϊνών, καθιστά τη χρήση τους μη ρεαλιστική επιλογή προς το παρόν. Αντίθετα, η χρήση RNA, προσφέρει επαρκή αποδοτικότητα επαναπρογραμματισμού αλλά απαιτεί επαναλαμβανόμενους κύκλους διαμόλυνσης που είναι αρκετά κοπιώδης και ακατάλληλη για τα αιμοποιητικά κύτταρα. Η εμπορική διαθεσιμότητα ιών Sendai που εκφράζουν τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού του Yamanaka έχουν κάνει την τεχνολογία αυτή ευρέως προσβάσιμη και ολοένα και πιο δημοφιλή. Τέλος, γίνονται προσπάθειες ανάπτυξης μεθόδων, που δεν απαιτούν κανενός είδους γονιδιακό χειρισμό των κυττάρων, μέσω της χρήσης μικρών μορίων<sup>31</sup>.

## II. Πρωτοποριακές μελέτες της χρήσης iPSC για γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία της β-MA και της ΔΝ

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες αποτελούν τις πιο εκτενώς μελετημένες μονογονιδιακές κληρονομικές διαταραχές του ανθρώπινου πληθυσμού και η «διόρθωσή» τους μέσω γονιδιακής θεραπείας έχει εμπνεύσει γενιές ερευνητών για πολλές δεκαετίες. Ήταν εύλογο λοιπόν που η ΔΝ επιλέχθηκε να γίνει η πρώτη μελέτη απόδειξης των αρχών λειτουργίας (proof-of-principle) του συνδυασμού γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας με αυτόλογα iPSC. Ο Jacob Hanna, όντας μεταδιδακτορικός ερευνητής στο εργαστήριο του Rudolph Jaenisch, πραγματοποίησε μια μελέτη «σταθμό» που δημοσιεύτηκε μόλις 16 μήνες αργότερα από την αρχική μελέτη του Yamanaka<sup>32</sup>. Χρησιμοποιώντας σαν μοντέλο ένα «εξανθρωπισμένο» επίμυ που έπασχε από ΔΝ, οι Hanna et al παρουσίασαν το γενικό σχεδιασμό γονιδιακής θεραπείας βασισμένης στα αυτόλογα iPSC, η οποία περιλαμβάνει: 1) επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων (συγκεκριμένα, ινοβλαστών της ουράς) σε iPSC, 2) γενετική διόρθωση *in situ* μέσω «κλασσικού» ομόλογου ανασυνδυασμού, 3) *in vitro* διαφοροποίηση σε αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα και 4) μεταμόσχευση. Παρόλο που αυτή η μελέτη παρείχε ξεκάθαρη απόδειξη της αρχής λειτουργίας των iPSC, πολλές πλευρές της την καθιστούν κλινικά μη εφαρμόσιμη: χρησιμοποιήθηκαν μόνιμα εντιθέμενοι στο γονιδίωμα ρετροϊκοί φορείς για την έκφραση τριών από τους παράγοντες επαναπρογραμματισμού, οι κλώνοι iPSC ελέγχθηκαν ελάχιστα μόνο για την παρουσία γενετικών ανωμαλιών, και το σημαντικότερο όλων, δεν αποδείχθηκε η μακρόχρονη ανασύσταση όλου του αιμοποιητικού συστήματος.

Μετά από την πρώτη παραγωγή ανθρώπινων iPSC, μερικές ομάδες ερευνητών παρήγαγαν iPSC από ασθενείς με ΔΝ<sup>33-37</sup> και μείζονα β-MA με ποικίλους γονοτύπους β<sup>0</sup>/β<sup>0</sup> ή β<sup>0</sup>/β<sup>+</sup><sup>21,38-41</sup>. Η πρώτη μελέτη γενετικής διόρθωσης iPSC ανθρώπου από τους Papapetrou et al πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του M. Sadelain<sup>21</sup>. Η μελέτη αυτή πρότεινε μια νέα στρατηγική γενετικής διόρθωσης, χρησιμοποιώντας προσθήκη γονιδίου (εν αντιθέσει με την *in situ* γονιδιακή διόρθωση) και επιλογή κλώνων που έχουν διορθωθεί γενετικά και φέρουν μόνο ένα φυσιολογικό αλληλόμορφο της β-σφαιρίνης που έχει εντεθεί σε θέση του ανθρώπινου γονιδιώματος χαρακτηριζόμενη ως “ασφαλής λιμένας” (safe harbour). Η μέθοδος αυτή αποτελεί δυνητικά μια κλινικά εφαρμόσιμη και καθολική προσέγγιση στην γονιδιακή θεραπεία με αυτόλογα κύτταρα για τη β-MA. Μια εναλλακτική και πιο ακριβής στρατηγική για την γονιδιακή διόρθωση είναι η εκμετάλλευση του ομόλογου ανασυνδυασμού του DNA για να επιδιορθωθεί η μεταλλαγή στον ενδογενή γενετικό τόπο. Αυτή η στρατηγική εκμεταλλεύεται τον ενδογενή μηχανισμό επιδιόρ-

θωσης του DNA, ο οποίος ενεργοποιείται σε θραύση της διπλής αλυσίδας (double strand break, DSB) και χρησιμοποιεί εργαλεία γονιδιακής στόχευσης σύμφωνα με τις αρχές που αναπτύχθηκαν για την δημιουργία διαγονιδιακών ποντικών τις δύο προηγούμενες δεκαετίες. Αν και απλή σαν σύλληψη, η *in situ* γενετική διόρθωση στα ανθρώπινα κύτταρα έχει αποδειχθεί πιο δύσκολη σε σχέση με εκείνη των βλαστοκυττάρων του ποντικού χωρίς οι λόγοι για το φαινόμενο αυτό να είναι πλήρως κατανοητοί. Πιο πρόσφατες εξελίξεις κατέστησαν τη γονιδιακή στόχευση στα hPSCs εφικτή και σχετικά αποδοτική. Στις εξελίξεις περιλαμβάνονται: α) η βελτίωση στις συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες επιτρέπουν την επιβίωση κλωνικών hPSCs χωρίς την παρουσία υποστηρικτικού στρώματος κυττάρων όπως με τη χρήση ικρωμάτων και του αναστολέα Rock Y-27632<sup>42</sup>, β) η βελτίωση στις μεθόδους μεταγωγής και γ) η κατασκευή ενδονουκλεασών που αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες, οι οποίες αυξάνουν σημαντικά την αποδοτικότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού<sup>43</sup>. Στην τελευταία περιλαμβάνονται οι νουκλεάσες με δάκτυλο ψευδαργύρου (Zn<sup>2+</sup>)<sup>44</sup>, οι μεγανουκλεάσες<sup>45</sup>, οι νουκλεάσες TALE, και το σύστημα CRISPR-Cas<sup>9</sup><sup>47</sup>.

Πέντε (5) μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία 3 χρόνια, ανέφεραν στρατηγικές βασισμένες στον ομόλογο ανασυνδυασμό για τη γενετική διόρθωση μεταλλαγών σε iPSC που προέρχονταν από ασθενείς με ΔN<sup>36,37,48</sup> και β-MA<sup>39,41</sup>. Παρόλο που η αποκατάσταση της έκφρασης του αλληλομόρφου στόχου σε φυσιολογικά επίπεδα μένει ακόμα να αποδειχθεί και πρέπει να οριστεί ένας βελτιστοποιημένος σχεδιασμός του φορέα στόχευσης, αυτές οι μελέτες αποτελούν απόδειξη της αρχής λειτουργίας ότι ο γενετικός τόπος της β-σφαιρίνης μπορεί να στοχευθεί στα ανθρώπινα iPSC. Τα εμπόδια που παραμένουν για την κλινική εφαρμογή των iPSC θα αναπτυχθούν περαιτέρω.

### III. Δυνατότητες και προκλήσεις των iPSC για τη γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία της β-MA και της ΔN

Παρά το δυναμικό των iPSC να προσφέρουν νέες μορφές κυτταρικής και γονιδιακής θεραπείας για τη β-MA και τη ΔN, πολλά εμπόδια για την κλινική εφαρμογή τους παραμένουν και πρέπει να αντιμετωπιστούν.

#### A. Προβλήματα κοινά σε όλες τις θεραπείες που βασίζονται στα iPSC

##### A1. Παραγωγή και ποιοτικός έλεγχος των κυτταρικών σειρών iPSC

Αρχικά, οι σειρές iPSC που προορίζονται για κλινική

χρήση θα χρειαστεί να παραχθούν με μεθόδους και διαδικασίες που πληρούν επιστημονικά και νομικά κριτήρια. Τα κύρια ζητήματα που πρέπει να επιλυθούν είναι: 1) ποια είναι η επιθυμητή μέθοδος επαναπρογραμματισμού, 2) ποιος είναι ο καταλληλότερος αρχικός κυτταρικός τύπος και 3) τι είδους ποιοτικός έλεγχος είναι απαραίτητος ώστε μια κυτταρική σειρά iPSC να χαρακτηριστεί κατάλληλη για κλινική χρήση. Όσον αφορά τον επαναπρογραμματισμό, οι μέθοδοι που είναι ελεύθερες από την παρουσία DNA και βασίζονται στο RNA φαίνονται προς το παρόν να κερδίζουν έδαφος, καθώς συνδυάζουν ασφάλεια και σχετική αποδοτικότητα. Καθώς επιπλέον νέες μέθοδοι είναι πιθανόν να εμφανιστούν, είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπ' όψιν η επαρκής απόδοση, όχι μόνον από άποψη χρόνου αλλά και κόστους για την παραγωγή επαρκούς αριθμού iPSC για να καλυφθούν όλες οι ανάγκες, συμπεριλαμβανομένης και της παραγωγής από σπάνιους δότες. Ίσως όμως πιο σημαντικό είναι η μέριμνα για την αποφυγή επιλογής σπάνιων κυττάρων με ακραία ικανότητα επαναπρογραμματισμού που είναι παρόντα στον αρχικό κυτταρικό πληθυσμό. Αυτό αναφέρεται γιατί υπάρχουν ενδείξεις ότι η ακραία ικανότητα επαναπρογραμματισμού μπορεί να σχετίζεται με αυξημένο δυναμικό εξαλλαγής, γεγονός που δημιουργεί ανησυχία ότι τέτοια κύτταρα μπορεί να έχουν αυξημένη πιθανότητα να δημιουργήσουν ένα κακοήγη θυγατρικό κλώνο μετά από την μεταμόσχευση. Πράγματι, εκτιμάται ολόένα και περισσότερο ότι ο βαθμός του γενετικού μωσαϊκισμού στα σωματικά κύτταρα είναι σημαντικός και ότι οι σωματικές μεταλλαγές μπορεί να ασκούν ισχυρή θετική ή αρνητική επιρροή στην ικανότητα επαναπρογραμματισμού του κυττάρου<sup>49-51</sup>.

Ο προβληματισμός αυτός εμπλέκεται και στην επιλογή του καταλληλότερου αρχικού κυτταρικού τύπου. Το ιδανικό σωματικό κύτταρο για την παραγωγή iPSC πρέπει να είναι εύκολα προσβάσιμο (π.χ. δέρμα ή αίμα), να επαναπρογραμματίζεται αποδοτικά και να είναι λιγότερο πιθανόν να φέρει προϋπάρχουσες γενετικές αλλοιώσεις. Έρευνες που συνδυάζουν τον επαναπρογραμματισμό κυττάρων με υψηλής ανάλυσης γονιδιωματική θα χρειαστούν ώστε να προσδιοριστεί ο βαθμός του μωσαϊκισμού στους διάφορους ανθρώπινους ιστούς και να καταγραφούν μεταλλαγές σε γονίδια που έχουν επιπτώσεις στην απόδοση επαναπρογραμματισμού και που μπορεί να προδιαθέτουν σε καρκινογένεση. Λιγότερο ξεκάθαρα είναι τα κριτήρια που πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να χαρακτηριστεί μία σειρά iPSC ως γενετικά φυσιολογική. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι κυτταρικές σειρές iPSC συχνά φέρουν γενετικές αλλοιώσεις, υπό τη μορφή χρωμοσωμικών ανωμαλιών, όπως επίσης τις πιο δυσδιάκριτες αλλαγές αριθμού αντιγράφων (copy number variations, CNV) και υποκαταστάσεις νουκλεοτιδίων (single nucleotide variants, SNV)<sup>52-55</sup>, οι περισσότερες από τις οποίες, αν όχι όλες,

προϋπάρχουν στα αρχικά κύτταρα<sup>56,57</sup>. Συγκεντρώνοντας δεδομένα από μεγάλες μελέτες όπως το «1000 Genomes Project», το «The Cancer Genome Atlas» και άλλες, θα γίνει εφικτή μέσα στα επόμενα χρόνια η καλύτερη ταξινόμηση των μεταλλαγών που προσδίδουν αυξημένη πιθανότητα νοσημάτων. Οι σειρές iPSC που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε κυτταρικές θεραπείες, είναι πιθανόν να πρέπει να εξετάζονται με τεχνικές υψηλής ανάλυσης, όπως η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος. Επιπλέον, οι κυτταρικές σειρές iPSC που προορίζονται για θεραπευτική χρήση οφείλουν να είναι συμβατές με τα πρότυπα GMP (good manufacturing practice) και κατάλληλες για έγκριση από τον FDA ή άλλο ανάλογο φορέα (για το λόγο αυτό θα πρέπει να συμμορφώνονται με τα πρότυπα του FDA για τη δωρεά ιστών). Τέλος, στις διαδικασίες παραγωγής, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη αυτοματοποιημένων χειρισμών και καλλιεργειών μεγάλης κλίμακας σε βιοαντιδραστήρες.

## A2. Αυτόλογα έναντι ιστοσυμβατών iPSC

Η παραγωγή νέων σειρών iPSC είναι χρονοβόρα και κοπιώδης, καθιστώντας την προοπτική της κυτταρικής θεραπείας με αυτόλογα iPSC απαγορευτικά ακριβή και έτσι απίθανο να γίνει ιατρική πρακτική ρουτίνας. Μία εναλλακτική και πιο ρεαλιστική λύση θα ήταν η δημιουργία κυτταρικών τραπεζών με αλλογενείς κυτταρικές σειρές iPSC που θα ήταν συμβατές με την πλειοψηφία του πληθυσμού<sup>58,59</sup>. Για το σκοπό αυτό, θα απαιτείται τουλάχιστον μερική συμβατότητα ως προς το σύστημα HLA. Η μεταμόσχευση AAK προερχόμενων από iPSCs πιθανώς να χρειάζεται υψηλότερη συμβατότητα HLA από ότι η μεταμόσχευση άλλων ιστών όπως υποδεικνύει η τρέχουσα πρακτική μεταμόσχευσης συμπλεγμάτων οργάνων. Μια ρεαλιστική προσέγγιση είναι η παραγωγή iPSC από δωρητές ομόζυγους για κοινούς (συχνούς) HLA απλοτύπους. Εκτιμάται ότι 78% των Βορειο-Ευρωπαίων, 63% των Ασιατών, 52% των Λατίνων και 45% των Αφρικανών θα ήταν συμβατοί με κάποια σειρά, εάν παράγονταν 100 ομόζυγες για το HLA κυτταρικές σειρές από τους πληθυσμούς αυτούς. Μία εναλλακτική λύση είναι η δημιουργία μέσω γενετικής μηχανικής μιας iPSC σειράς με χαρακτηριστικά «παγκόσμιου δότη» για να παραχθούν είτε ομόζυγα για το HLA είτε αρνητικά για τα HLA τάξης I και II αντιγόνα, μέσω π.χ. απομάκρυνσης αμφοτέρων των αλληλομόρφων του γονιδίου της β2-μικροσφαιρίνης, απαραίτητης για τα HLA-I<sup>60</sup>.

Όλες αυτές οι διαφορετικές επιλογές θα πρέπει να απαντηθούν μέσω ερευνών που θα αφορούν την αντιγονικότητα των αυτόλογων ή ιστοσυμβατών iPSC και των προϊόντων τους καθώς και της ευπάθειάς τους σε ανοσολογική απόρριψη, προβλήματα που παραμένουν προς

το παρόν μερικώς κατανοητά<sup>61,62</sup>. Η αντίδραση που επάγεται από την έκφραση νεο-αντιγόνων λόγω της *in vitro* καλλιέργειας, είναι επίσης ένα θέμα που απαιτεί την ανάγκη περαιτέρω διερεύνησης. Γενικά, υπάρχουν πολλά αναπάντητα ερωτήματα όπως ο βαθμός ιστοσυμβατότητας που απαιτείται, η βέλτιστη στρατηγική για τη δημιουργία κυτταρικών τραπεζών και η ανάγκη ανοσοκαταστολής μετά τη μεταμόσχευση. Οι τράπεζες κυττάρων αποτελούν μια ελκυστική επιλογή, ειδικά σε περιοχές με εθνική και φυλετική ομοιογένεια (π.χ. στην Ιαπωνία). Μία βιομηχανοποιημένη θεραπεία, συνδυασμένη με κάποιο επίπεδο ανοσοκαταστολής φαίνεται προς το παρόν να είναι το πιθανότερο σενάριο για ευρεία εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής.

## A3. Ο σχηματισμός τερατώματος και η ογκογονικότητα

Ένας σημαντικός λόγος ανησυχίας για τη μεταμόσχευση των κυτταρικών προϊόντων που προέρχονται από iPSCs είναι η πιθανότητα ανάπτυξης όγκων<sup>63,64</sup>. Υπάρχουν τρία σενάρια που αποτελούν κίνδυνο. (i) Υπολειμματικά πολυδύναμα κύτταρα που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη διαφοροποίηση μπορεί να παραμείνουν σε ένα κυτταρικό μόσχευμα και να δημιουργήσουν τερατώματα μετά από μεταμόσχευση. (ii) Μερικώς διαφοροποιημένα αρχέγονα κύτταρα μπορεί να είναι παρόντα στο μόσχευμα και να προκαλέσουν ανώμαλο πολλαπλασιασμό. Ακόμα και αν αυτοί οι όγκοι είναι καλοήθεις, μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα, ειδικά αν εντοπίζονται σε περιοχές του σώματος, όπως το ΚΝΣ ή το μυοκάρδιο. (iii) Πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα μπορεί να υποστούν απο-διαφοροποίηση και εξαλλαγή. Υπάρχουν ορισμένα λιγοστά στοιχεία που υποστηρίζουν ότι τα θυγατρικά κύτταρα των iPSC μπορεί να διαθέτουν αυξημένη ικανότητα εξαλλαγής. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις συγκεντρωμένες γενετικές ανωμαλίες, που τα προδιαθέτουν για καρκινογένεση ή σε ασταθή επιγενετικά σημεία που μπορεί να ενισχύουν την απο-διαφοροποίηση και/ή την εξαλλαγή. Η ογκογονική τάση μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προήλθαν τα iPSC<sup>65</sup>. Παρόλο που είναι αντιληπτό ότι βελτιστοποιημένα πρωτόκολλα διαφοροποίησης μπορούν να ελαχιστοποιήσουν την πιθανότητα να συμβούν τα δύο πρώτα σενάρια, κάποιες επιπλέον μέθοδοι εκκαθάρισης υπολειμματικών αδιαφοροποίητων κυττάρων<sup>66</sup> και/ή η θετική επιλογή των διαφοροποιημένων θυγατρικών κυττάρων<sup>67,68</sup> μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική, τουλάχιστον σε ορισμένες εφαρμογές. Επιπλέον, γονιδιακοί διακόπτες ασφαλείας όπως τα γονίδια αυτοκτονίας<sup>69</sup> μπορεί να εισαχθούν στις κυτταρικές σειρές των iPSCs, για την επιλεκτική τους καταστροφή όταν αυτό απαιτηθεί.

## **Β. Συχνά προβλήματα των κυτταρικών θεραπειών του αιμοποιητικού που βασίζονται στα iPSCs**

### **B1. Παραγωγή AAK με ικανότητα μεταμόσχευσης**

Δύο γενικά συστήματα καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για να επάγουν τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων iPSC σε αιμοποιητικό ιστό: συγκαλλιέργεια επί στρωματικών κυττάρων (συνήθως επί της σειράς OP9), και ο σχηματισμός των λεγόμενων εμβρυοειδών σωματίων. Παρόλο που τα αρχέγονα και τα περισσότερα διαφοροποιημένα αιμοποιητικά κύτταρα μπορούν να προκύψουν από τη διαφοροποίηση των hPSCs, αποδοτική παραγωγή AAK (όπως ορίζονται από την ικανότητα μακρόχρονης αιμοποίησης μετά από μεταμόσχευση) δεν έχει καταστεί δυνατή μέχρι σήμερα.

Η αδυναμία της διαφοροποίησης των ανθρώπινων hPSCs (iPSCs και ESC) σε AAK κατάλληλα για μεταμόσχευση αποτελεί ίσως τη μεγαλύτερη τροχοπέδη της εφαρμογής της κυτταρικής θεραπείας για διαταραχές του αίματος<sup>70</sup>. Πράγματι, η παραγωγή AAK από ανθρώπινα hPSCs αποδείχθηκε πολύ δυσκολότερη σε σχέση με το αναμενόμενο και παραμένει σχεδόν αδύνατη παρά τις σημαντικές προσπάθειες που κατέβαλε ένας μεγάλος αριθμός εργαστηρίων. Μελέτες προερχόμενες από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες έδειξαν κατά κανόνα πολύ χαμηλή (λιγότερη από 2%) ή μηδαμινή εγκατάσταση σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια (NSG) ενώ περιοριζόταν κυρίως στην παραγωγή κυττάρων της μυελικής σειράς<sup>71-74</sup>. Ενδομηριαία έγχυση και μεταμόσχευση σε νεογνά NSG δεν έφερε κάποια βελτίωση. Παρά το ότι η αποδοτική *in vitro* παραγωγή AAK από ανθρώπινα hPSCs παραμένει ανέφικτη, είναι ξεκάθαρο ότι αυτό αποτελεί τεχνικό εμπόδιο και δεν σημαίνει ότι τα ανθρώπινα PSCs δεν διαθέτουν το εγγενές βιολογικό δυναμικό της παραγωγής AAK<sup>75,76</sup>. Πολλοί λόγοι μπορεί να ευθύνονται για αυτό. Στα σύγχρονα μοντέλα ξено-μεταμόσχευσης μπορεί να υπάρχουν τεχνικοί λόγοι που εμποδίζουν την μακροχρόνια εγκατάσταση των AAK που προέρχονται από ανθρώπινα PSCs. Επίσης, μπορεί να απουσιάζουν συστατικά του αιμοποιητικού μικροπεριβάλλοντος, απαραίτητα για τη διαφοροποίηση ή την εγκατάσταση των κυττάρων αυτών. Αιμοποιητικά κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινα PSCs, κατ' αναλογία και με άλλα κύτταρα που προέρχονται από PSCs, έχουν ένα πιο εμβρυονικό ή αρχέγονο φαινότυπο. AAK προερχόμενα από τον λευκίτιο σάκο στερούνται εγγενώς της ικανότητας εγκατάστασης σε ενήλικους λήπτες και πολλές έρευνες έδειξαν ότι τουλάχιστον ένα ποσοστό των αιμοποιητικών κυττάρων που προέρχονται από καλλιέργειες ανθρώπινων PSCs (συνήθως το πρώιμο κύμα) μοιάζουν με αυτόν τον τύπο αρχέγονων κυττάρων, αν και αυτές έχει αποδειχθεί ότι παράγουν και πλήρως διαφο-

ροποιημένους τύπους αιμοποιητικών κυττάρων. Τέλος, ανεπαρκής γνώση των κατάλληλων συνθηκών καλλιέργειας, περιορίζει την ικανότητά μας να απομονώσουμε, να συντηρήσουμε και να πολλαπλασιάσουμε τον πληθυσμό των AAK, τα οποία μπορούν να εμφανιστούν παροδικά σε αυτές τις καλλιέργειες. Η κατανόηση της οντογένεσης του αιμοποιητικού συστήματος των θηλαστικών από το πεδίο της αναπτυξιακής αιμοποίησης<sup>77</sup> και η διερεύνηση των συνθηκών καλλιέργειας, των αυξητικών παραγόντων και της διακυτταρικής σηματοδότησης πιθανώς τελικά θα ευδοδώσουν τον επί μακρόν επιδιωκόμενο στόχο της παραγωγής AAK από ανθρώπινα PSCs.

### **B2. Στρατηγικές γονιδιακής επιδιόρθωσης**

Όπως συζητήθηκε παραπάνω, τα iPSCs επιτρέπουν περισσότερους γενετικούς χειρισμούς σε σχέση με τα AAK. Κυρίως δύο προσεγγίσεις γενετικής επιδιόρθωσης συζητήθηκαν προηγουμένως, οι οποίες περιλαμβάνουν την γονιδιακή προσθήκη σε «ασφαλείς λιμένες» και την γονιδιακή επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Η γονιδιακή προσθήκη σε «ασφαλείς λιμένες» παρέχει ίσως μια καθολική προσέγγιση στην αντιμετώπιση νοσημάτων που προκαλούνται από μειωμένη ή μηδαμινή έκφραση ενός γονιδίου και επιτρέπει την ταυτόχρονη έκφραση υπεράριθμων γονιδίων, όπως τα γονίδια αυτοκτονίας ή γονίδια αντοχής σε φαρμακευτικές ουσίες. Μπορούμε να οραματιστούμε, ένα σχέδιο παρόμοιο με αυτό που προτάθηκε από τους Parapetrou et al, όπου κλώνοι με τυχαίες ενθέσεις αναλύονται προοπτικά ή εναλλακτικά οι ενθέσεις στοχεύουν σε μία εξαρχής επιλεγμένη θέση ασφαλείας (safe harbor). Παρόλο που οι θέσεις ασφαλείας παρέχουν ένα σημείο εκκίνησης, επιπλέον δεδομένα θα χρειαστούν για να καθιερώσουν καθολικές θέσεις στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η εξελισσόμενη ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος και η καλύτερη κατανόηση της λειτουργίας του μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση των σύγχρονων κριτηρίων, για παράδειγμα με την ενσωμάτωση της γνώσης των αλληλεπιδράσεων της χρωματίνης σε μεγάλες αποστάσεις, των μη-κωδικών RNA και του ρυθμιστικού DNA.

Η επιδιόρθωση του ενδογενούς γονιδίου της β-σφαιρίνης *in situ* είναι επίσης μια επιθυμητή προσέγγιση και πολλές μελέτες δείχνουν ότι είναι εφικτή. Η β-MA προκαλείται από ένα πολύ μεγάλο αριθμό διαφορετικών μεταλλαγών που καλύπτουν όλο το γονίδιο, αλλά το γονίδιο της β-σφαιρίνης περιλαμβάνει μόνο τρία μικρά εξόνια και δύο μικρά ιντρόνια που καλύπτουν περίπου 1.6 kb. Επομένως, είναι δυνατόν να φανταστούμε την ανάπτυξη ενός στοχευμένου φορέα για επιδιόρθωση, κατάλληλου για τις περισσότερες μεταλλαγές, αν και η απόδοσή του θα ποικίλε μεταξύ των ασθενών με διαφορετικούς γονότυπους και με πιθανούς πολυμορφισμούς στις ομόλογες περιοχές. Η γονιδιακή επιδιόρθωση μόνο του ενός αλληλομόρφου

θα ήταν επαρκής για να βελτιώσει το φαινότυπο, αρκεί ο επιδιορθωμένος γονιδιακός τύπος να εκφράζεται στα επίπεδα του φυσιολογικού αλληλόμορφου. Ένας σημαντικός όγκος δουλειάς θα απαιτούνταν, όπου θα εμπλεκόταν η συστηματική σύγκριση διαφορετικών φορέων με ή χωρίς την επαγωγή θραύσης της διπλής αλυσίδας του DNA από ενδονουκλεάσες και διαφορετικές στρατηγικές για την διαμόλυνση του εξωγενούς DNA (donor DNA), όπως επίσης επιπλέον δεδομένα για την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των διάφορων νουκλεασών. Οι ZFN (zinc finger nucleases) προηγούνται των άλλων τεχνολογιών στην κλινική εφαρμογή αλλά η στόχευση βλαστοκυττάρων, αντί διαφοροποιημένων κυττάρων, επιβάλλει αποδείξεις για πολύ μεγαλύτερα περιθώρια ασφαλείας. Παράλληλα, δοκιμασίες για την γενοτοξικότητα που επάγεται από τις ενδονουκλεάσες, κυρίως λόγω έκτοπης κατάπτωσης του DNA, θα χρειαστεί να καθιερωθούν και να τυποποιηθούν.

Εφόσον τα iPSCs είναι δυνατόν να κλωνοποιηθούν και να πολλαπλασιαστούν, η παραγωγή ενός μόνον ή λίγων γενετικά επιδιορθωμένων κλώνων με τεκμηριωμένα ασφαλή γενετικό υπόστρωμα επαρκεί για την κλινική εφαρμογή της τεχνολογίας. Ανεξαρτήτως της στρατηγικής γονιδιακής επιδιόρθωσης, είναι σημαντικό να αποφευχθεί η παρατεταμένη καλλιέργεια, καθώς αυτό μπορεί να αυξήσει την συχνότητα απόκτησης γενετικών ανωμαλιών<sup>78</sup>. Παρόλα αυτά ο γενετικός χειρισμός θα επιβάλλει αναπόφευκτα την παρατεταμένη καλλιέργεια των σειρών iPSCs. Έτσι, δοκιμασίες για την επαλήθευση της γονιδιακής ακεραιότητας, όπως αναλύθηκε στο προηγούμενο εδάφιο, θα είναι απαραίτητες.

### **Γ. Προβλήματα ειδικά για τις κυτταρικές θεραπείες της β-MA και της ΔN που βασίζονται στα iPSCs. Προϊόντα αίματος προερχόμενα από τα iPSCs**

Πολλοί ασθενείς που πάσχουν από β-MA και ΔN θα επωφελούνταν επίσης από την ανάπτυξη προϊόντων αίματος από iPSCs. Αν και αυτή η προσέγγιση δεν θα παρείχε μακροχρόνια θεραπεία, αυτόλογα ή συμβατά ερυθρά θα ήταν πολύτιμα για τους ασθενείς με αλλο-αντισώματα, κάτι που συμβαίνει συχνά λόγω των πολλαπλών μεταγίσεων. Μεταγίσεις με ερυθρά αιμοσφαίρια προερχόμενα από ανθρώπινα PSCs αντιπροσωπεύουν μια από τις πιο θελκτικές βραχυπρόθεσμες στρατηγικές κυτταρικής θεραπείας με παράγωγα PSCs. Παρόλο που τα ερυθρά αιμοσφαίρια δεν εκφράζουν αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA, εκφράζουν έναν αριθμό επιφανειακών αντιγόνων

και έχουν περιγραφεί αντισώματα έναντι όλων (σχεδόν 400 αντιγόνα) τα οποία ανήκουν σε 30 οικογένειες. Το γεγονός αυτό καθιστά δύσκολο να φανταστούμε τράπεζες με iPSCs που να είναι συμβατά με όλους τους συνδυασμούς, αλλά μπορούμε να φανταστούμε μία κύρια τράπεζα με μερικές μόνο σειρές οι οποίες θα είναι αρνητικές για τα αντιγόνα Rhesus καθώς και για όσο το δυνατόν περισσότερα ελάσσονα αντιγόνα.

Πολλές μελέτες έχουν επιδείξει την δυνατότητα παραγωγής κυττάρων της ερυθράς σειράς από ανθρώπινα ESCs και iPSCs *in vitro* με διαφορετικά πρωτόκολλα<sup>21,79-81</sup>. Είναι ξεκάθαρο από τις μελέτες αυτές ότι τα κύτταρα που προκύπτουν εκφράζουν κυρίως την εμβρυική (ε), τη νεογνική (γ) και πρακτικά καθόλου τη β-αλυσίδα της αιμοσφαιρίνης. Παρόλο που μπορεί στο μέλλον να αναπτυχθούν πρωτόκολλα *in vitro* για να επάγουν και τη β-αλυσίδα, μία ενδιαφέρουσα ιδέα είναι να χρησιμοποιήσουμε αυτήν την αναπτυξιακή τους “αωρότητα” για να πάρουμε φαινοτυπικά επιδιορθωμένα κύτταρα από ασθενείς με β-MA και ΔN χωρίς την ανάγκη γενετικής τροποποίησης μέσω γενετικής μηχανικής. Τέλος, θα απαιτηθούν μελέτες που να αξιολογούν τη λειτουργικότητα και την αντιγονικότητα των ερυθρών αιμοσφαιρίων που παράγονται *in vitro*, όπως επίσης και πρόοδος στην μαζική παραγωγή των κυττάρων<sup>82</sup>. Μια ενδιαφέρουσα προοπτική είναι η παραγωγή από τα iPSCs, προγονικών κυτταρικών σειρών που θα ανήκουν στην ερυθρά σειρά και θα είναι ικανές για τελική διαφοροποίηση. Αυτές θα μπορούν να εκπτυχθούν και να φυλαχθούν σε τράπεζες, αυξάνοντας τους υποψήφιους λήπτες και εξοικονομώντας χρόνο και κόστος<sup>83</sup>.

### **Επίλογος**

Η τεχνολογία των iPSC βρίσκεται στο επίκεντρο της επιστημονικής κοινότητας και των μέσων ενημέρωσης και είναι πολλά υποσχόμενη για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών επιλογών για τη β-MA, τη ΔN και πολλών άλλων κληρονομικών και επίκτητων διαταραχών του αιμοποιητικού ιστού. Κάποιες από τις εφαρμογές της στην αναγεννητική ιατρική, όπως η παραγωγή παραγώγων αίματος, φαίνεται να είναι επικείμενες. Άλλες, όπως η παραγωγή AAK για μεταμόσχευση, φαίνονται πιο απομακρυσμένες στο μέλλον. Καινοτομίες σε πολλά μέτωπα, όπως στην παραγωγή iPSC υψηλής ποιότητας και στην ανάπτυξη καλύτερων πρωτοκόλλων διαφοροποίησης, προτύπων για τη διασφάλιση της ποιότητας, νομικών πλαισίων και οικονομικά αποδοτικών διαδικασιών παραγωγής, θα είναι απαραίτητες για να κινηθούμε από την έρευνα αυτής της συναρπαστικής τεχνολογίας στην κλινική εφαρμογή της.

## Gene and cell therapy for beta-thalassemia and sickle cell disease with induced pluripotent stem cells (iPSCs): the next frontier

by Eirini P. Papapetrou

*Departments of Oncological Sciences, Hematology and Medical Oncology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA*

**ABSTRACT:** In recent years, breakthroughs in human pluripotent stem cell (hPSC) research, namely cellular reprogramming and the emergence of sophisticated genetic engineering technologies, have opened new frontiers for cell and gene therapy. The prospect of using hPSCs, either autologous or histocompatible, as targets of genetic modification and their differentiated progeny as cell products for transplantation, presents a new paradigm of regenerative medicine of potential tremendous value for the treatment of blood disorders, including SCD and BT. Despite advances at a remarkable pace and great promise, many roadblocks remain before clinical translation can be realistically considered. Here we discuss the theoretical advantages of cell therapies utilizing hPSC derivatives, recent proof-of-principle studies and the main challenges towards realizing the potential of hPSC therapies in the clinic.

### Βιβλιογραφία

1. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*. 2010; 467:318-322.
2. Sadelain M, Riviere I, Wang, X Boulad, F, et al. Strategy for a multicenter phase I clinical trial to evaluate globin gene transfer in beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1202:52-58.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126:663-676.
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007; 131:861-872.
5. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007; 318:1917-1920.
6. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987; 51:987-1000.
7. Gurdon JB. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006; 22:1-22.
8. Wilmut I, Schnieke A.E, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385:810-813.
9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282:1145-1147.
10. Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, et al. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:12759-12764.
11. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007; 448:313-317.
12. Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007; 448:318-324.
13. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 2009; 458:771-775.
14. Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, et al. Polycistronic lentiviral vector for «hit and run» reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2009; 27:1042-1049.
15. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009; 136:964-977.
16. Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, et al. Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells*. 2010; 28:64-74.
17. Somers A, Jean JC, Sommer CA, et al. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*. 2010; 28:1728-1740.
18. Papapetrou EP, Sadelain M. Generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells with an excisable single polycistronic vector. *Nat Protoc*. 2011; 6:1251-1273.
19. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009; 458:766-770.
20. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods*. 2009; 6:363-369.
21. Papapetrou EP, Lee G, Malani N, et al. Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011; 29:73-78.



22. Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet.* 2011; 12:231-242.
23. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science.* 2008; 322:945-949.
24. Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc.* 2010; 5:418-428.
25. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science.* 2009; 324:797-801.
26. Narsinh KH, Jia F, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protocols.* 2011; 6:78-88.
27. Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, et al. Development of defective and persistent sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem.* 2011; 286:4760-4771.
28. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010; 7:618-630.
29. Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009; 4:381-384.
30. Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell.* 2009; 4:472-476.
31. Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science.* 2013; 341:651-654.
32. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSCs generated from autologous skin. *Science.* 2007; 318:1920-1923.
33. Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu, et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells.* 2008; 26:1998-2005.
34. Mali P, Chou BK, Yen J, et al. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells.* 2010; 28:713-720.
35. Chou BK, Mali P, Huang X, et al. Efficient human iPSC cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res.* 2011; 21:518-529.
36. Sebastiano V, Maeder ML, Angstman JF, et al. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem Cells.* 2011; 29:1717-1726.
37. Li M, Suzuki K, Qu J, et al. Efficient correction of hemoglobinopathy-causing mutations by homologous recombination in integration-free patient iPSCs. *Cell Res.* 2011; 21:1740-1744.
38. Ye L, Chang JC, Lin C, Sun X, Yu J, Kan YW. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:9826-9830.
39. Wang Y, Zheng CG, Jiang Y, et al. Genetic correction of beta-thalassemia patient-specific iPSCs and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell Res.* 2012; 22:637-648.
40. Fan Y, Luo Y, Chen X, Li Q, Sun X. Generation of human beta-thalassemia induced pluripotent stem cells from amniotic fluid cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *J Reprod Dev.* 2012; 58:404-409.
41. Ma N, Liao B, Zhang H, et al. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free beta-thalassemia induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem.* 2013; 288:34671-34679.
42. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007; 25:681-686.
43. Jasin M. Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases. *Trends Genet.* 1996; 12:224-228.
44. Porteus MH, Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotechnol.* 2005; 23:967-973.
45. Paques F, Duchateau P. Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2007; 7:49-66.
46. Boch J. TALEs of genome targeting. *Nat Biotechnol.* 2011; 29:135-136.
47. Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013; 339:823-826.
48. Zou J, Mali P, Huang X, Doney SN, Cheng L. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPSCs derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood.* 2011; 118:4599-4608.
49. Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, et al. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature.* 2009; 460:1132-1135.
50. Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPSCs. *Nature.* 2009; 460:1145-1148.
51. Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009; 460:53-59.
52. Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011; 471:63-67.
53. Taapken SM, Nisler BS, Newton MA, et al. Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2011; 29:313-314.
54. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 7:521-531.
55. Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature.* 2011; 471:58-62.
56. Abyzov A, Mariani J, Palejev D, et al. Somatic copy number

- mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells. *Nature*. 492:438-442.
57. Young MA, Larson DE, Sun CW, et al. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012; 10:570-582.
  58. Turner M, Leslie S, Martin NG, et al. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell*. 2013; 13:382-384.
  59. Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, Bradley JA, Bolton EM. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell*. 2012; 11:147-152.
  60. Rioloobos L, Hirata RK, Turtle CJ, et al. HLA engineering of human pluripotent stem cells. *Mol Ther*. 2013; 21:1232-1241.
  61. Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013; 494:100-104.
  62. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 474:212-215.
  63. Wakitani S, Takaoka K, Hattori T, et al. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. *Rheumatology (Oxford)*. 2003; 42:162-165.
  64. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*. 2007; 21:1345-1357.
  65. Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2009; 27:743-745.
  66. Ben-David U, Gan QF, Golan-Lev T, et al. Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen. *Cell Stem Cell*. 2013; 12:167-179.
  67. Yuan SH, Martin J, Elia J, et al. Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011; 6:e17540.
  68. Dubois NC, Craft AM, Sharma P, et al. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011; 29:1011-1018.
  69. Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a «suicide» gene. *Stem Cells*. 2003; 21:257-265.
  70. Slukvin II. Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells: current advances and challenges toward de novo generation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2013; 122:4035-4046.
  71. Lu SJ, Feng Q, Caballero S, et al. Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. *Nat Methods*. 2007; 4:501-509.
  72. Wang L, Menendez P, Shojaei F, et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. *J Exp Med*. 2005; 201:1603-1614.
  73. Tian X, Woll PS, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. *Stem Cells*. 2006; 24:1370-1380.
  74. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*. 2008; 3:85-98.
  75. Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol Ther*. 2013; 21:1424-1431.
  76. Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, et al. In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2013; 121:1255-1264.
  77. Sturgeon CM, Ditad A, Clarke RL, Keller G. Defining the path to hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2013; 31:416-418.
  78. Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol*. 2011; 29:1132-1144.
  79. Lu SJ, Feng Q, Park JS, et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood*. 2008; 112:4475-4484.
  80. Qiu C, Olivier N, Velho M, Bouhassira EE. Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. *Blood*. 2008; 111:2400-2408.
  81. Chang KH, Huang A, Hirata RK, Wang PR, Russell DW, Papayannopoulou T. Globin phenotype of erythroid cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2010; 115:2553-2554.
  82. Chang KH, Bonig H, Papayannopoulou T. Generation and characterization of erythroid cells from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells: an overview. *Stem Cells Int*. 2011:791604.
  83. Hirose S, Takayama N, Nakamura S, et al. Immortalization of erythroblasts by c-MYC and BCL-XL enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2013; 1:499-508.

## Γονιδιακή στόχευση και γονιδιακή επιδιόρθωση

Ελένη Παπανικολάου<sup>1,2</sup>, Νικόλαος Π. Ανάγνου<sup>1,2</sup>

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ:** Την τελευταία δεκαετία, η αποκωδικοποίηση σημαντικών ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδιώματος καθώς και οι συνεχείς βελτιώσεις των τεχνικών της μοριακής βιολογίας έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη στρατηγικών για την οριστική θεραπεία διαφόρων μονογονιδιακών ασθενειών. Η τεχνολογία αιχμής της ανάπτυξης των επαγόμενων ολοδύναμων κυττάρων καθώς και η δημιουργία τεχνητών νουκλεασών οι οποίες έχουν την ικανότητα να δρουν σε στοχευμένες περιοχές του γονιδιώματος, έχουν απογειώσει τις θεραπευτικές στρατηγικές εκτοπίζοντας ακόμα και την πολύ σημαντική προσέγγιση της γονιδιακής θεραπείας. Η γονιδιακή εκδοτική επεξεργασία (gene editing), αποτελεί μια διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται τροποποίηση του γονιδιώματος σε συγκεκριμένη και, από πριν καθορισμένη θέση, γεγονός που καθιστά τις νέες προσεγγίσεις αποτελεσματικότερες, και ενδεχομένως ασφαλέστερες της γονιδιακής προσθήκης μέσω ρετροϊκών φορέων, δεδομένου ότι παρά τις εκτεταμένες γνώσεις μας γύρω από τη βιολογία τους, δεν έχει καταστεί δυνατή μέχρι σήμερα, η στοχευμένη ενσωμάτωση τους στο γονιδίωμα. Στο συγκεκριμένο άρθρο συζητούμε για τη δομή, τον τρόπο λειτουργίας και τις κλινικές και μελλοντικές εφαρμογές των νουκλεασών μέσω της θεραπευτικής προσέγγισης της γονιδιακής στόχευσης και επιδιόρθωσης.

Haema 2016; 7(1): 111-119 Copyright EAE

### Εισαγωγή

Για περισσότερα από 40 χρόνια, η γονιδιακή θεραπεία εμφανίστηκε ως μία αποτελεσματική προσέγγιση για την αντιμετώπιση μονογονιδιακών ασθενειών<sup>1</sup>. Ως εκ τούτου, τα πρωτόκολλα γονιδιακής θεραπείας περιελάμβαναν προσθήκη του φυσιολογικού αλληλομόρφου γονιδίου στο γονιδίωμα του ασθενούς με τη χρήση τροποποιημένων ρετροϊκών φορέων. Καίτοι η γονιδιακή προσθήκη ήταν επιτυχής στην αντιμετώπιση συγκεκριμένων κληρονομικών ασθενειών, όπως διαφόρων τύπων ανοσοανεπαρκειών<sup>2</sup>, εντούτοις η εμφάνιση λευχαιμίας στην κλινική μελέτη γονιδιακής θεραπείας της φυλοσύνδετης βαρειάς συνδυσμένης ανοσοανεπάρκειας

(X-SCID), λόγω της ενεργοποίησης του πρωτο-ογκογονιδίου LMO2 συνεπεία της ενσωμάτωσης του φορέα στο δεύτερο ιντρόνιο του ανωτέρω γονιδίου<sup>3</sup>, μετρίασαν σημαντικά τόσο την αρχική επιτυχία, όσο και τις προσδοκίες για μελλοντική ασφαλή εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας. Παρά το γεγονός ότι το πεδίο της γονιδιακής θεραπείας ανταποκρίθηκε άμεσα, εισάγοντας ασφαλέστερους λεντιϊκούς φορείς<sup>4</sup> και ενώ οι γνώσεις μας γύρω από τη βιολογία των ρετροϊών, αλλά και των ρετροϊκών φορέων είναι εκτεταμένες, εντούτοις μέχρι σήμερα δεν έχει καταστεί δυνατή η ελεγχόμενη ενσωμάτωση του φορέα σε συγκεκριμένες και στοχευμένες θέσεις στο γονιδίωμα.

Η γονιδιακή στόχευση συνιστά μια έννοια σχεδόν ταυτόσημη της θεραπείας, καθώς αποτελεί μια προσέγγιση κατά την οποία το λειτουργικό γονίδιο είτε προστίθεται είτε διορθώνεται σε συγκεκριμένη και ελεγχόμενη θέση στο γονιδίωμα, εξασφαλίζοντας ταυτόχρονα και τις ιδανικές συνθήκες ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, δεδομένου ότι η διόρθωση λαμβάνει χώρα στον υπό θεραπεία γονιδιακό τόπο, σε αντίθεση με τη γονιδιακή προσθήκη μέσω ρετροϊκών φορέων, όπου το θεραπευτικό γονίδιο δύναται να ενσωματωθεί σε τυχαία έκτοπη θέση. Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή γονιδιακή στόχευση συνιστούν τα ρήγματα στη δίκλωνη έλικα του DNA

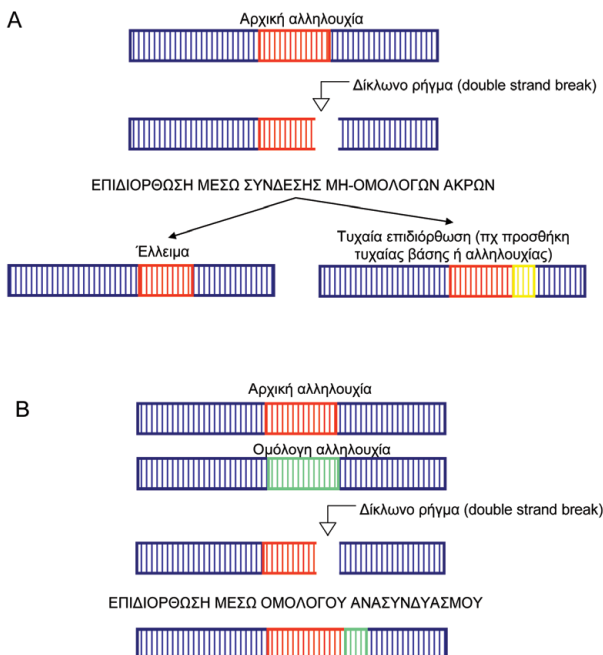
<sup>1</sup> Εργαστήριο Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας, Κέντρο Βασικής Έρευνας II, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (I.I.B.E.A.A.), Αθήνα

<sup>2</sup> Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα  
Στοιχεία Επικοινωνίας: Νικόλαος Π. Ανάγνου, MD, PhD, Καθηγητής Βιολογίας και Διευθυντής Εργαστηρίου Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Μικράς Ασίας 75, Αθήνα 115 27 και Επιστημονικός Υπεύθυνος του Εργαστηρίου Κυτταρικής και Γονιδιακής Θεραπείας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (I.I.B.E.A.A.), Σωρανού Εφεσίου 4, Αθήνα 115 27, Τηλ.: +30 210 746-2356, 210 746-2341, 310 6597-013, Fax: +30 210 746-2412, E-mail: anagnou@med.uoa.gr

(double strand breaks) τα οποία μπορούν να πραγματοποιηθούν με χρήση ειδικών νουκλεασών οι οποίες δρουν σε συγκεκριμένες, στοχευμένες και προκαθορισμένες θέσεις στο γονιδίωμα<sup>5</sup>. Τέτοιες νουκλεάσες είναι:

- Οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs, Zinc Finger Nucleases)
- Οι νουκλεάσες τύπου TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)
- Οι νουκλεάσες του συστήματος CRISPR/Cas9

Ο τρόπος δράσης των ανωτέρω νουκλεασών βασίζεται στην πρόκληση ρηγμάτων στο δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες και στοχευμένες θέσεις, τα οποία εν συνεχεία επισκευάζονται είτε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HR, homologous recombination), είτε με σύνδεση μη-ομόλογων άκρων (NHEJ, non-homologous end-joining). Μέσω των μηχανισμών αυτών, η επιδιόρθωση των ρηγμάτων δύναται να οδηγήσει σε διάσπαση, αποκοπή και ανασύσταση της αρχικής αλληλουχίας (Σχήμα 1). Στην περίπτωση της επιδιόρθωσης μέσω σύνδεσης μη-ομόλογων άκρων, τότε συνήθως δημιουργούνται είτε προσθήκες (insertions) ή ελλείμματα (deletions), γνωστά και ως indels. Αντιθέτως, η υψηλής πιστότητας επιδιόρθωση μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού, πραγματοποιείται κατά τη φάση S/G<sub>2</sub> του κυτταρικού κύκλου, δεδομένης της παρουσίας εξωγενούς αλληλουχίας DNA τα άκρα



**Σχήμα 1.** Η δημιουργία ρηγμάτων στο δίκλωνο DNA επιδιορθώνεται είτε μέσω σύνδεσης μη-ομόλογων άκρων (Α), είτε μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Β). Για τον ομόλογο ανασυνδυασμό κρίνεται απαραίτητη η ταυτόχρονη ύπαρξη της ομόλογης αλληλουχίας (πράσινο χρώμα).

της οποίας εμφανίζουν ομολογία με τη στοχευμένη θέση της δράσης της νουκλεάσης. Βάσει αυτού, γίνεται κατανοητό, ότι η πλειονότητα των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, τα οποία ευρίσκονται στη φάση G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> του κυτταρικού κύκλου, αναμένεται να εμφανίζουν ιδιαίτερος χαμηλά ποσοστά επιδιόρθωσης μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός συνιστά μια σαφή στρατηγική γονιδιακής στόχευσης σε ασφαλείς θέσεις του γονιδιώματος όπως για παράδειγμα στους λεγόμενους ασφαλείς λιμένες (safe harbors)<sup>6</sup>, ή στη θέση AAVS1, ενώ επιπλέον αποτελεί στρατηγική διόρθωσης των μεταλλάξεων των υπεύθυνων για την ασθένεια, εισάγοντας το λειτουργικό αντίγραφο του μεταλλαγμένου γονιδίου στην κανονική απόσταση από τον φυσικό του υποκινητή, αποκαθιστώντας πλήρως τη γονιδιακή έκφραση και συνεπώς και τη λειτουργία<sup>7</sup>.

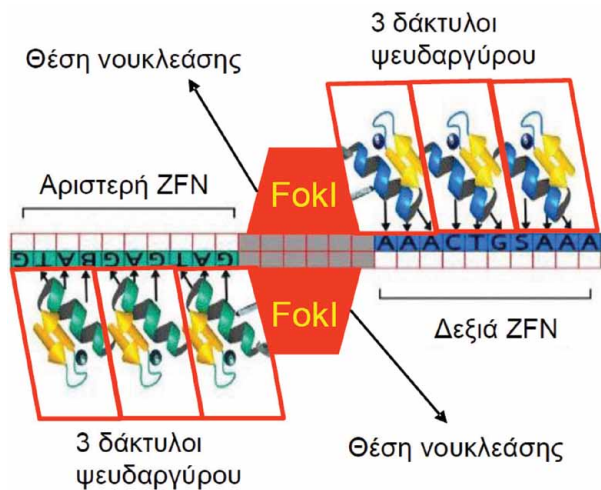
### Οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs, Zinc Finger Nucleases)

Τόσο στα προκαρυωτικά κύτταρα (βακτήρια) όσο και στα ευκαρυωτικά κύτταρα, είναι απαραίτητη η σύνδεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών στους υποκινητές ή στους ενισχυτές των γονιδίων, προκειμένου να ρυθμισθεί η μεταγραφή. Αυτές οι πρωτεΐνες καλούνται παράγοντες μεταγραφής (ή μεταγραφικοί παράγοντες) και η σύνδεση τους στο DNA είναι ειδική, δηλαδή κάθε ξεχωριστός παράγοντας μεταγραφής αναγνωρίζει και διαφορετική αλληλουχία DNA. Τέτοιοι κοινοί παράγοντες μεταγραφής είναι η TBP (TATA box Binding Protein) που συνδέεται στην αλληλουχία TATAA των υποκινητών, η πρωτεΐνη SP1 (Specific Protein 1) που συνδέεται στην αλληλουχία GGGCGG, και άλλοι. Οι περισσότεροι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν δύο διακριτές περιοχές, μία για την πρόσδεσή τους στο DNA και μία δεύτερη για τη ρύθμιση της μεταγραφής. Η περιοχή ρύθμισης αλληλεπιδρά με τις RNA πολυμεράσες του κυττάρου ή με βοηθητικούς παράγοντες έναρξης της μεταγραφής ή με σύμπλοκα ακετυλίωσης και αναδιοργάνωσης της χρωματίνης. Η περιοχή σύνδεσης στο DNA από δομική άποψη, ταξινομεί τους μεταγραφικούς παράγοντες σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) παράγοντες μεταγραφής με δομή έλικα-στροφής-έλικα, β) παράγοντες μεταγραφής με δομή τύπου φερμουάρ λευκίνης (leucine zipper) και γ) παράγοντες μεταγραφής με δομή τύπου δακτύλων ψευδαργύρου (zinc fingers).

Οι δάκτυλοι ψευδαργύρου είναι πρωτεϊνικές υποπεριοχές στις οποίες το άτομο ψευδαργύρου (Zn) διαδραματίζει δομικό ρόλο, συνεισφέροντας στη σταθεροποίηση της συγκεκριμένης περιοχής. Σε κάθε δάκτυλο ψευδαργύρου, τέσσερα συνολικά μόρια κυστεΐνης και ιστιδίνης συνδέονται τετραεδρικά με ένα ιόν ψευδαργύρου. Οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου είναι πρωτεΐνες οι οποίες συντίθενται τεχνητά και υιοθετούν τη δομή δα-

κτύλων ψευδαργύρου προκειμένου να συνδεθούν στο DNA από τους αντίστοιχους παράγοντες μεταγραφής, ενώ χρησιμοποιούν τη νουκλεάση FokI για τη δημιουργία του δίκλωνου ρήγματος. Η σύλληψη της δημιουργίας τους ανήκει στον Chandrasegaran<sup>7</sup>, ο οποίος παρατήρησε ότι στην περιοριστική ενδονουκλεάση FokI, η περιοχή σύνδεσης στο DNA και η περιοχή με δράση νουκλεάσης είναι ξεχωριστές και φυσικά διακριτές. Η περιοχή με δράση νουκλεάσης δεν ενεφάνιζε ιδιαίτερη εξειδίκευση και ο Chandrasegaran έδειξε ότι η θέση της πένης μπορούσε να ανακατευθυνθεί με κατάλληλους χειρισμούς στην περιοχή σύνδεσης στο DNA<sup>8,9</sup>. Οι περιοχές με τη μεγαλύτερη χρησιμότητα αποδείχθηκαν οι δάκτυλοι ψευδαργύρου με τη γνωστή συνύπαρξη των τεσσάρων κυστεϊνών και ιστιδινών. Σε κάθε δάκτυλο υπάρχουν 30 αμινοξέα που συνδέονται μέσω της κυστεϊνης-ιστιδίνης με ένα ιόν ψευδαργύρου και έχουν τη χαρακτηριστική δομή αββ, δηλαδή α-έλικα—β-πτυχωτό φύλλο—β-πτυχωτό φύλλο. Ανάλυση της κρυσταλλικής τους δομής έδειξε ότι κάθε δάκτυλος συνδέεται απ' ευθείας με 3 βάσεις του DNA<sup>10</sup> και επομένως μεταβάλλοντας τη δομή των αμινοξέων -διατηρώντας ωστόσο τις θέσεις κυστεϊνης-ιστιδίνης—είναι δυνατόν να προβλεφθεί η αλληλουχία-στόχος του γονιδιώματος και να κατασκευασθούν νέες νουκλεάσες με θέσεις σύνδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στόχους. Αυτή η προσέγγιση άνοιξε τον δρόμο για την κατασκευή πολλών και διαφορετικών νουκλεασών δακτύλων ψευδαργύρου με ξεχωριστές ειδικότητες σύνδεσης σε διακριτές αλληλουχίες-στόχους. Περαιτέρω, επειδή η θέση δράσης της νουκλεάσης FokI λειτουργεί μόνο μετά από διμερισμό<sup>11</sup>, η στρατηγική στόχευσης περιλαμβάνει την κατασκευή ζεύγους νουκλεασών τύπου δακτύλων ψευδαργύρου, όπου κάθε δάκτυλος ψευδαργύρου μήκους 30 αμινοξέων, συνδέεται με 3 βάσεις, και το ζεύγος διατάσσεται εκατέρωθεν της θέσης της νουκλεάσης FokI, εξασφαλίζοντας τον διμερισμό της FokI στη θέση δημιουργίας του δίκλωνου ρήγματος (Σχήμα 2).

Κάθε ZFN συνδέεται ειδικά με αλληλουχίες-στόχους μήκους 18-36 ζευγών βάσεων<sup>12</sup>. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι για να στοχευθούν 9 βάσεις στο γονιδίωμα, θα πρέπει να κατασκευαστεί για κάθε νουκλεάση διαφορετική αλληλουχία μήκους 90 αμινοξέων, δηλαδή 270 ζευγών βάσεων. Για μεγαλύτερη αλληλουχία-στόχο, προφανώς πρέπει να κατασκευαστεί και μεγαλύτερη νουκλεάση. Για τον λόγο αυτό, η κατασκευή των ZFN αποτελεί μείζον μειονέκτημα για την ευρεία χρήση τους, καθώς για κάθε διαφορετική αλληλουχία-στόχο πρέπει να προσαρμόζεται και η αντίστοιχη αλληλουχία που κωδικοποιεί τη νουκλεάση, γεγονός το οποίο είναι χρονοβόρο και αρκετές φορές οικονομικά ασύμφορο. Περαιτέρω, κάθε νέο ζεύγος πρέπει να εξεταστεί ως προς τη δραστηριότητα του, αυξάνοντας ακόμα περισσότερο τον χρόνο παραγωγής και τον κόστος. Επομένως, βασικά μειονεκτήματα των νου-



**Σχήμα 2.** Οι νουκλεάσες τύπου δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger nucleases; ZFN) λειτουργούν ανά ζεύγη (αριστερή ZFN-δεξιά ZFN). Κάθε δάκτυλος ψευδαργύρου (σε κόκκινο πλαίσιο) αποτελείται από 30 αμινοξέα εκ των οποίων 2 ιστιδίνες και 2 κυστεϊνες ευρίσκονται σε συντηρημένες θέσεις και είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση της πεπτιδικής αλυσίδας με ένα ιόν ψευδαργύρου (πράσινη ή μπλε σφαίρα). Κάθε δάκτυλος ψευδαργύρου διαθέτει συγκεκριμένη αλληλουχία και συνδέεται ειδικά με 3 βάσεις στο DNA. Το ζεύγος διατάσσεται εκατέρωθεν της θέσης της νουκλεάσης FokI, εξασφαλίζοντας τον διμερισμό της FokI στη θέση δημιουργίας του δίκλωνου ρήγματος.

κλεασών τύπου δακτύλων ψευδαργύρου αποτελούν: α) η δυσκολία στον σχεδιασμό τους, β) η τροποποίηση και η βελτιστοποίηση τους για κάθε νέα αλληλουχία-στόχο, γ) η αδυναμία στόχευσης οιαδήποτε αλληλουχίας, δεδομένου ότι δεν έχουν ανιχνευθεί όλοι οι δάκτυλοι που συνδέονται με όλες τις τριπλέτες βάσεων, δ) η χαμηλή συχνότητα<sup>12</sup> δημιουργίας των δίκλωνων ρηγμάτων (~24%) και τέλος ε) η δημιουργία δίκλωνων ρηγμάτων σε έκτοπη θέση<sup>12</sup> (off-target effect).

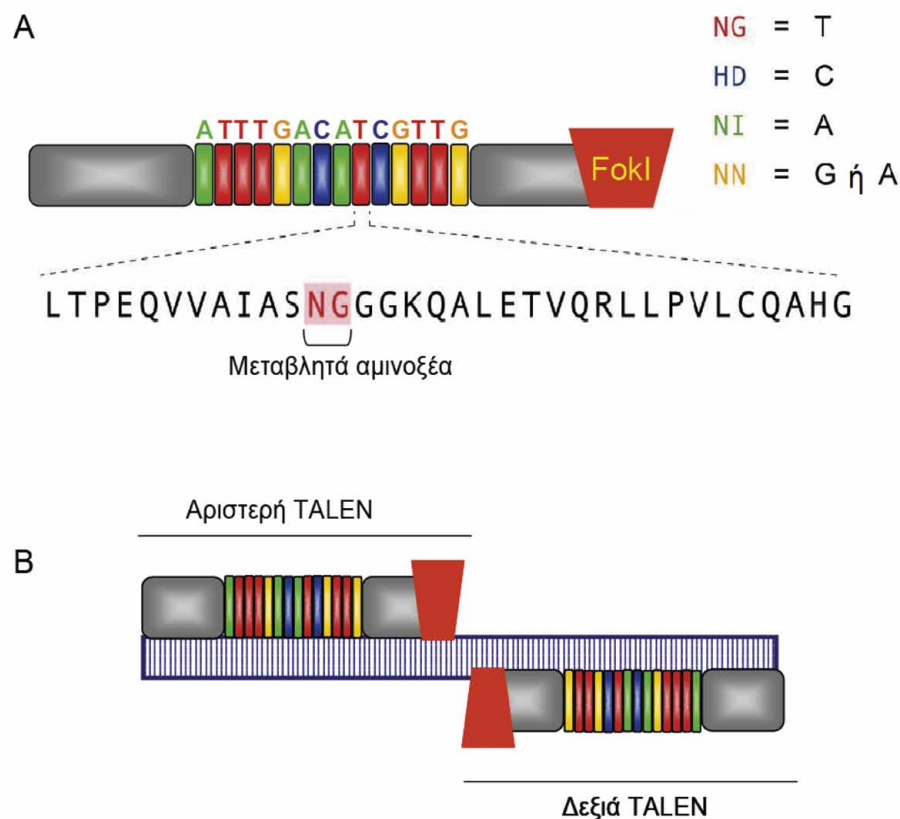
Οι νουκλεάσες τύπου δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger nucleases; ZFN), αποτελούν αναμφισβήτητο σημαντικό εργαλείο γονιδιακής στόχευσης. Η Sangamo Biosciences έχει επενδύσει σημαντικά στην εφαρμογή των ZFN για διάφορες ασθένειες και έχει προχωρήσει και σε κλινικές μελέτες σε ορισμένες περιπτώσεις. Επί παραδείγματι, η χρήση των ZFN για τη δημιουργία ελλειμμάτων στην περιοχή του συν-υποδοχέα CCR5 του HIV, θεωρείται βαρύνουσας σημασίας για την ίαση των ασθενών που πάσχουν από AIDS (βλ. κατωτέρω).

## Οι νουκλεάσες τύπου TALEN

Η δομή των νουκλεασών τύπου TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) ομοιάζει με αυτή των

ZFN. Συγκεκριμένα, όπως και στην περίπτωση των ZFN, και οι TALENs δρουν σε διμερή μορφή και αποτελούνται από πρωτεΐνες-χίμαιρες με τη νουκλεάση FokI<sup>12</sup> συζευγμένη με πρωτεϊνικές υποπεριοχές από τους παράγοντες έναρξης της μεταγραφής (Transcription Activator-Like Effectors, TALE) οι οποίοι εξυπηρετούν τη θέση σύνδεσής τους στο DNA και έχουν απομονωθεί από είδη του βακτηρίου του γένους *Xanthomonas spp.* Η κατασκευή τους είναι επίσης δύσκολη και χρονοβόρα. Κάθε TALE αποτελείται από διαδοχικές υπομονάδες μήκους 33-35 αμινοξέων. Σε κάθε υπομονάδα υπάρχει μία συντηρημένη αλληλουχία αμινοξέων (Σχήμα 3) όπου τα πρώτα 11 αμινοξέα παραμένουν ίδια σε κάθε υπομονάδα, ακολουθούν δύο μεταβλητά αμινοξέα στις θέσεις 12-13 τα οποία προσδίδουν και την εξειδίκευση της σύνδεσης της υπομονάδας στη συγκεκριμένη αζωτούχο βάση, και εν συνεχεία διατάσσονται τα υπόλοιπα αμινοξέα της υπομονάδας μήκους 20-23 αμινοξέων, τα οποία είναι επίσης συντηρημένα. Τα αμινοξέα στις θέσεις 12-13 καλούνται επαναλαμβανόμενα μεταβλητά αμινοξέα (repeat variable diresidues, RVDs). Έχουν περιγραφεί 4 διαφορετικοί τύποι επαναλαμβανόμενων μεταβλητών αμινοξέων, ήτοι, οι συνδυασμοί Asn-Gly, His-Asp, Asn-Ile, και Asn-Asn [όπου Asn = Ασπαραγίνη, Asp = Ασπαρτικό οξύ, Ile = Ισο-

λευκίνη, His = Ιστιδίνη, και Gly = Γλυκίνη] και οι οποίοι αναγνωρίζουν τις αζωτούχες βάσεις του DNA θυμίνη (T), κυτοσίνη (C), αδενίνη (A), και γουανίνη (G) ή αδενίνη (A), αντίστοιχα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3. Επομένως, αν η αλληλουχία-στόχος αποτελείται από 30-40 βάσεις, τότε η κάθε TALEN θα αποτελείται αντιστοίχως από 30-40 υπομονάδες όπου η κάθε υπομονάδα συνδέεται μέσω των μεταβλητών αμινοξέων στην αλληλουχία-στόχο<sup>12</sup>. Υπολογίζοντας ότι η κάθε υπομονάδα αποτελείται από 33-35 αμινοξέα, γίνεται κατανοητό ότι για την κατασκευή κάθε TALEN απαιτούνται 990-1400 αμινοξέα, γεγονός που σημαίνει ότι η κωδικοποιητική περιοχή κάθε TALEN εκτιμάται τουλάχιστον στα 3000 ζεύγη βάσεων. Συνεπώς, τα μειονεκτήματα σε ό,τι αφορά την κατασκευή τους είναι παρόμοια με αυτά των ZFN αν και στην περίπτωση των TALENs επειδή έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως τα ζεύγη των μεταβλητών αμινοξέων που συνδέονται με τις 4 αζωτούχες βάσεις (Σχήμα 3), είναι εφικτή η κατασκευή οιασδήποτε TALEN για οιαδήποτε αλληλουχία-στόχο. Εντούτοις, σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί η μη απόλυτη σύνδεση κάθε ζεύγους μεταβλητών αμινοξέων με τις 4 αζωτούχες βάσεις, γεγονός το οποίο αυξάνει την πιθανότητα δημιουργίας δίκλωνου ρήγματος σε έκτοπη θέση.



**Σχήμα 3.** Οι νουκλεάσες τύπου TALEN. Η δομή κάθε TALEN (A) και ο τρόπος δράσης τους (B). Επεξήγηση συμβόλων αμινοξέων: N = ασπαραγίνη, G = γλυκίνη, H = ιστιδίνη, D = ασπαρτικό οξύ, I = ισολευκίνη.

## Το σύστημα CRISPR/Cas9

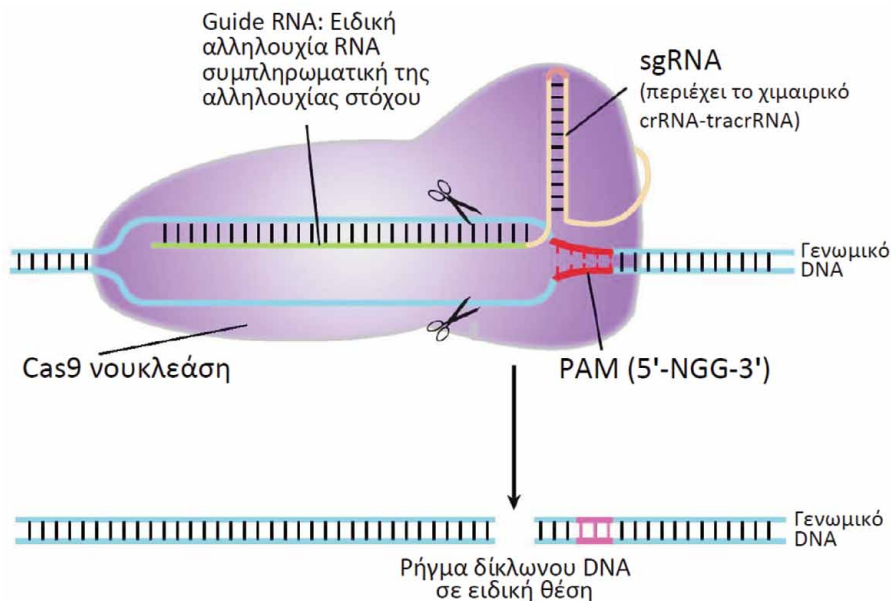
Σε αντίθεση με τις δύο προηγούμενες κατηγορίες όπου οι νουκλεάσες διαθέτουν ειδική δομή προκειμένου να συνδεθούν στο DNA, οι νουκλεάσες του συστήματος CRISPR/Cas9 χρησιμοποιούν μικρά μόρια RNA συμπληρωματικά ως προς την αλληλουχία-στόχο, για να δεσμευθούν στο DNA.

Το βακτηριακό σύμπλεγμα τύπου II συστάδων βραχέων παλινδρομικών επαναληπτικών αλληλουχιών διατεταγμένων ανά τακτά διαστήματα (**C**lustered, **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats, CRISPR) αποτελείται από 3 επί μέρους στοιχεία: α) τη σχετιζόμενη νουκλεάση Cas9 (CRISPR-associated nuclease), β) το CRISPR RNA το οποίο καθορίζει την ειδικότητα της δομής (crRNA), και γ) το βοηθητικό trans-activating crRNA (tracrRNA). Για τη σύνδεση της Cas9 στο DNA, προηγείται υβριδοποίηση των crRNA και tracrRNA και ακολουθεί η σύνδεση της Cas9 πρώτα στο υβρίδιο crRNA-tracrRNA και εν συνεχεία στο DNA μέσω της ειδικής αλληλουχίας-οδηγού gRNA (guide RNA) μήκους 20 βάσεων. Η αλληλουχία gRNA αποτελεί τμήμα του crRNA, και είναι συμπληρωματική ως προς την αλληλουχία-στόχο και πρέπει υποχρεωτικά να ευρίσκεται πριν από την τριπλέτα νουκλεοτιδίων NGG στην αλληλουχία-στόχο<sup>13</sup>. Ειδικότερα, η αλληλουχία-στόχος πρέπει να διαθέτει 20 βάσεις συμπληρωματικές ως προς το gRNA και εν συνεχεία να ακολουθεί το μοτίβο NGG (όπου N μπορεί να είναι οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο). Η τριπλέτα NGG κα-

λείται πρωτο-διαστηματικό γειτονικό μοτίβο (Protospacer Adjacent Motif, PAM) και αναγνωρίζεται από την ίδια την Cas9. Το σύστημα μπορεί να απλοποιηθεί με τη σύντηξη των αλληλουχιών του crRNA και του tracrRNA, σχηματίζοντας το μοναδικό-οδηγό RNA (single-guided RNA, sgRNA), το οποίο μιμείται τη δράση των υβριδίων crRNA/tracrRNA και μπορεί εξ ίσου αποτελεσματικά να κατευθύνει τη νουκλεάση Cas9 στο DNA<sup>14</sup>. Το σύστημα της νουκλεάσης του συστήματος CRISPR/Cas9 απεικονίζεται στο Σχήμα 4.

Η ευελιξία του συστήματος CRISPR/Cas9 οφείλεται ακριβώς στο γεγονός ότι χρειάζεται να κατασκευαστεί μόνο ένα μόριο RNA μήκους 20 βάσεων προκειμένου να κατευθυνθεί η νουκλεάση στην αλληλουχία-στόχο, παρέχοντας ταυτόχρονα τα υπόλοιπα συστατικά του συστήματος τα οποία παραμένουν αμετάβλητα, δηλαδή τη νουκλεάση και το tracrRNA. Είναι προφανές ότι από όλες τις προσεγγίσεις το σύστημα CRISPR/Cas9 εμφανίζει τεράστιο πλεονέκτημα καθώς η κατασκευή οιασδήποτε αλληλουχίας με τη μορφή εκκινητών (primers) είναι μια στρατηγική η οποία πραγματοποιείται ευρέως σε όλα τα εργαστήρια μοριακής ιατρικής και αποτελεί εύκολη και χαμηλού κόστους προσέγγιση.

Ωστόσο, παρά την ευελιξία του, το πολύ σοβαρό μειονέκτημα του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι η δημιουργία δίκλωνων ρηγμάτων σε έκτοπη θέση καθώς η ειδικότητα του βασίζεται στην υβριδοποίηση μόλις 20 ζευγών βάσεων μεταξύ του gRNA και της αλληλουχίας-



**Σχήμα 4.** Το σύστημα νουκλεάσης CRISPR/Cas9. Απεικονίζεται η νουκλεάση Cas9 με μωβ χρώμα, η ειδική αλληλουχία-οδηγός gRNA (guide RNA) με πράσινο χρώμα καθώς και το μοναδικό-οδηγό μόριο RNA (single-guided RNA, sgRNA) με κίτρινο χρώμα, το οποίο περιέχει το χιμαϊρικό τμήμα crRNA-tracrRNA) και χρησιμοποιείται για να κατευθύνει τη νουκλεάση Cas9 στην αλληλουχία-στόχο.

στόχου. Εν τούτοις, είναι σημαντικό το γεγονός ότι ακριβώς για τον ίδιο λόγο, είναι εφικτό να προβλεφθούν οι πιθανές θέσεις δημιουργίας έκτοπων ρηγμάτων εφ' όσον είναι γνωστές οι θέσεις αναντιστοιχίας (mismatches) που σχηματίζονται. Στη μελέτη των Hsu και συν.<sup>15</sup> έγινε μεγάλη κλίμακας ανίχνευση και χαρακτηρισμός όλων των δίκλωνων ρηγμάτων που προέκυψαν με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9, όπου επιβεβαιώθηκε η δημιουργία δίκλωνων ρηγμάτων σε έκτοπη θέση, αλλά ταυτοχρόνως ταυτοποιήθηκε πλήρως ποιές εναλλακτικές αλληλουχίες της αλληλουχίας-στόχου μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πρότυπα για τη δημιουργία των έκτοπων ρηγμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι θέσεις αναντιστοιχίας βρίσκονται κυρίως στο 5' άκρο του sgRNA, δηλαδή απομακρυσμένα σε σχέση με τη θέση PAM, ότι υπάρχει η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του sgRNA προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η έκτοπη δημιουργία ρηγμάτων αλλά και ότι μπορεί να προβλεφθεί η θέση δημιουργίας έκτοπων ρηγμάτων με χρήση αλγορίθμων. Πράγματι, οι συγγραφείς προχώρησαν στη δημιουργία του ιστότοπου <http://www.genome-engineering.org/>, όπου είναι εφικτό να ανιχνευθούν οι πιθανές θέσεις έκτοπων ρηγμάτων ανάλογα με την επιθυμητή αλληλουχία gRNA. Ο ιστότοπος παρέχει πληροφορίες για τη γονιδιακή θέση του πιθανού έκτοπου ρήγματος, εάν επί παραδείγματι. ευρίσκεται σε ιντρόνιο ή σε κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου και επιλέγει το βέλτιστο gRNA, δηλαδή την αλληλουχία με τη μικρότερη πιθανότητα δημιουργίας έκτοπου ρήγματος. Σε κάθε περίπτωση, οι πιθανές θέσεις έκτοπων ρηγμάτων είναι από πριν γνωστές, ώστε να είναι ανιχνεύσιμες μετά τη γονιδιακή επεξεργασία. Αντίστοιχος ιστότοπος έχει περιγραφεί και για τις ZFN (<http://ccg.vital-it.ch/tagger/targetsearch.html>) αν και εξαιρετικό ενδιαφέρον εμφανίζει η μελέτη των Gabriel και συν.<sup>16</sup> η οποία αναφέρει ότι για τις ZFN είναι αδύνατη η πρόβλεψη *in silico* των θέσεων δημιουργίας έκτοπων ρηγμάτων. Σχετικά πολύτιμα δεδομένα για τις νουκλεάσες τύπου TALEN δημοσιεύθηκαν πολύ πρόσφατα<sup>17</sup> στο διαδίκτυο (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/> και <http://baolab.bme.gatech.edu/Research/BioinformaticTools/prognos.html>), θέτοντας έτσι στη διάθεση των ερευνητών περισσότερα εργαλεία που μπορούν να βοηθήσουν στον σχεδιασμό ασφαλέστερων στρατηγικών. Σαφώς το πεδίο των μοριακών θεραπειών των μονογονιδιακών ασθενειών κινείται προς την κατεύθυνση αυτή και λαμβάνοντας υπ' όψιν το σημαντικό πλεονέκτημα της πρόβλεψης των έκτοπων ρηγμάτων, φαίνεται ότι υπάρχει στον ορίζοντα η πιθανότητα γονιδιακής επεξεργασίας και στόχευσης συνδυάζοντας το καλύτερο αποτέλεσμα με τη μέγιστη δυνατή ασφάλεια. Τέλος, μια επιπλέον στρατηγική για την ελαχιστοποίηση της δημιουργίας ρηγμάτων σε έκτοπη θέση αποτελεί η προσέγγιση των Tsai και συν.<sup>18</sup> οι οποίοι συνδύασαν τη νουκλεάση FokI με το σύστημα CRISPR/Cas9, επιτυγχάνοντας υψη-

λό βαθμό εξειδίκευσης και χαμηλό ποσοστό ανεπιθύμητων μεταλλάξεων.

## Γονιδιακή στόχευση και θεραπεία

### Ανοσοανεπάρκειες

Επί του παρόντος, οι μόνες κλινικές μελέτες φάσης I ή II που βασίζονται στη γονιδιακή στόχευση πραγματοποιούνται στις ΗΠΑ με χρήση νουκλεασών τύπου δακτύλων ψευδαργύρου και αφορούν στη δημιουργία ελλειμμάτων στο γονίδιο του συν-υποδοχέα CCR5 του HIV στα T-λεμφοκύτταρα για τη θεραπεία των ασθενών με AIDS<sup>19</sup>. Σημειωτέον ότι στην κλινική μελέτη συμμετέχουν ασθενείς οι οποίοι είναι ετεροζυγώτες για το γονίδιο CCR5 και επομένως διαθέτουν μόνο ένα λειτουργικό αλληλόμορφο. Η μελέτη ξεκίνησε το 2009 και αναμένεται να ολοκληρωθεί εντός του 2014. Μέχρι στιγμής έχουν συμμετάσχει 7 ασθενείς με AIDS στους οποίους πραγματοποιείται κυτταραφαίρεση και ακολουθεί επεξεργασία των T-λεμφοκυττάρων με το ζεύγος των κατάλληλων ZFN. Εν συνεχεία, 5-30 δισεκατομμύρια γενετικά επεξεργασμένα T-λεμφοκύτταρα επανεγχέονται στους ασθενείς. Τα αρχικά αποτελέσματα της μελέτης δημοσιοποιήθηκαν στο τελευταίο συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρείας Γονιδιακής και Κυτταρικής Θεραπείας (ASGCT) τον Μάιο του 2014 και έδειξαν ότι οι 3 από τους 7 ασθενείς επέτυχαν 10-πλάσια μείωση του ιικού φορτίου στο περιφερικό αίμα, ενώ σε 2 δεν ανιχνεύθηκε καθόλου η παρουσία του HIV στο περιφερικό αίμα<sup>20</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ανάλογα με εκείνα των κυκλοφορούντων γονιδιακά επεξεργασμένων T-λεμφοκυττάρων τα οποία στερούνται της παρουσίας του CCR5.

Είναι προφανές ότι η συγκεκριμένη μελέτη είναι πολλά υποσχόμενη, ωστόσο δεν υπάρχουν πληροφορίες για τις θέσεις και το ποσοστό δημιουργίας έκτοπων ρηγμάτων, ούτε για το πως πραγματοποιείται η ανίχνευση τους. Υπάρχει τουλάχιστον μία προηγούμενη σχετική μελέτη<sup>21</sup>, στην οποία αναφέρεται ότι οι νουκλεάσες τύπου δακτύλων ψευδαργύρου καίτοι επέτυχαν τη δημιουργία ελλειμμάτων στο γονίδιο του CCR5, εντούτοις ενεφάνισαν 10-πλάσια χαμηλότερη προτίμηση δημιουργίας ελλειμμάτων στο γονίδιο CCR2, του οποίου παρατηρείται μεγάλη ομολογία συγκριτικά με την αλληλουχία του CCR5. Η δημιουργία έκτοπων ρηγμάτων σε άλλες θέσεις εκτός των CCR5 και CCR2, ενεφάνισε συχνότητα 1:20000 και εντοπίστηκε σχετικά αυξημένη στο ιντρόνιο του γονιδίου ABLIM2 (Actin Binding LIM Protein Family, Member 2) το οποίο εμπλέκεται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Τα ανωτέρω δεδομένα υποδηλώνουν ότι αφ' ενός μεν πρέπει να αντιμετωπισθούν τα θέματα ασφαλείας της δυναμικής εισχωρητικής μεταλλαξογένεσης, και αφ' ετέρου



ότι υπάρχουν περιθώρια βελτίωσης για το ποσοστό της γονιδιακής διόρθωσης, καθώς φαίνεται ότι δι-αλληλικά ελλείμματα είναι μάλλον δύσκολο να δημιουργηθούν, δεδομένου ότι στην προηγούμενη κλινική μελέτη μετείχαν μόνον ετεροζυγώτες. Σε αυτό ενδεχομένως εμπλέκεται η φάση του κυτταρικού κύκλου του υπό επεξεργασία κυττάρου, καθώς όπως αναφέρθηκε στην αρχή, η επιδιόρθωση του DNA πραγματοποιείται μόνο στη φάση S/G<sub>2</sub> του κυτταρικού κύκλου. Προς το σκοπό αυτό, σημαντική είναι η στρατηγική των Genovese και συν.<sup>5</sup>, όπου στόχευσαν στη διόρθωση του γονιδίου IL2RG, οι μεταλλάξεις του οποίου προκαλούν βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια. Στην εν λόγω μελέτη, έγινε ταυτόχρονη εισαγωγή των mRNA των ZFN σε CD34<sup>+</sup> κύτταρα ομφάλιου αίματος, καθώς και μιας ομόλογης αλληλουχίας, με απώτερο σκοπό τη διόρθωση του IL2RG μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Απεδείχθη όντως ότι τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εμφανίζονται ιδιαίτερος ανθεκτικά σε οιασδήποτε φύσεως γονιδιακή εξεργασία λόγω της παραμονής τους στη φάση G<sub>0</sub>. Η σημαντικότητα της μελέτης ωστόσο, έγκειται στο γεγονός ότι με την κατάλληλη επεξεργασία της παρεχόμενης ομόλογης αλληλουχίας και τους κατάλληλους *in vitro* χειρισμούς των κυττάρων, κατέστη δυνατή η ηυξημένη συχνότητα του ομόλογου ανασυνδυασμού απ' ευθείας στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, και όχι σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ES) ή σε επαγόμενα ολοδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPS) όπως είχε παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες. Είναι λοιπόν προφανές, ότι ο δρόμος προς την επιτυχή διόρθωση των ενήλικων αρχέγονων βλαστικών κυττάρων μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού έχει αρχίσει να διαγράφεται με σαφήνεια.

### Θαλασαιμίες και Αιμοσφαιρινοπάθειες

Υπάρχουν αρκετές μελέτες *in vitro* και *in vivo* σε ζωικά μοντέλα που αναφέρονται στη διόρθωση του θαλασσαιμικού φαινότυπου μέσω γονιδιακής στόχευσης και ειδικότερα μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Η πρώτη μελέτη<sup>22</sup> αφορούσε στη θεραπεία της α-θαλασσαιμίας σε επαγόμενα ολοδύναμα αρχέγονα κύτταρα στα οποία έγινε εισαγωγή του γονιδίου της α-σφαιρίνης μέσω ZFN και ομόλογου ανασυνδυασμού στον γονιδιακό τόπο AAVS1 στο χρωμόσωμα 19, και ακριβέστερα στη θέση 19q13.42, ο οποίος αποτελεί γνωστό ασφαλή λιμένα<sup>6</sup>. Ακολούθησαν και άλλες αντίστοιχες εργασίες όπου με χρήση TALENs επετεύχθη διόρθωση της β-θαλασσαιμίας σε επαγόμενα ολοδύναμα αρχέγονα κύτταρα<sup>23</sup> ή σε κυτταρικές σειρές<sup>24</sup>. Υπενθυμίζεται ότι στις αρχικές δημοσιεύσεις περιγραφής της δημιουργίας των επαγόμενων ολοδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων σε ζωικά μοντέλα ποντικού<sup>25</sup>, η φαινοτυπική διόρθωση αφορούσε στη δρεπανοκυτταρική νόσο και είχε επιτευχθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό,

ενώ τα κύτταρα διατηρούν τον εμβρυϊκό χαρακτήρα τους χωρίς τη βοηθητική χρήση των νουκλεασών. Παρά το ότι η φαινοτυπική διόρθωση ήταν επιτυχής, εν τούτοις η συχνότητα του ανασυνδυασμού ήταν χαμηλή ακόμα και στα iPS, γεγονός που ώθησε την ερευνητική κοινότητα προς εξεύρεση εναλλακτικών τρόπων γονιδιακής στόχευσης ή/και ομόλογου ανασυνδυασμού.

Η αξιοποίηση των διαφόρων τύπων νουκλεασών δεν φαίνεται να μένει ανεκμετάλλευτη στα θαλασσαιμικά σύνδρομα. Ειδικά για τις β-θαλασσαιμίες, είναι γνωστό ότι η έκφραση της γ-σφαιρίνης βελτιώνει σημαντικά την κλινική εικόνα των ασθενών<sup>26,27</sup>, ενώ η γ-σφαιρίνη εμφανίζει επιπλέον το πλεονέκτημα της αποφυγής δημιουργίας δυνητικών αντισωμάτων, αποτελώντας ιδανική στρατηγική θεραπείας ιδιαίτερα για τους ασθενείς με β<sup>0</sup> θαλασσαιμία, οι οποίοι είναι ενδεχόμενο ότι με τη γονιδιακή θεραπεία με χρήση φορέων β-σφαιρίνης, πιθανόν να αναπτύξουν αντισώματα έναντι της β-σφαιρίνης. Η πρόσφατη ανακάλυψη του ερυθροειδικού ενισχυτή στο δεύτερο ιντρόνιο του γονιδίου BCL11A<sup>28</sup> κατευθύνει τις μοριακές θεραπείες για τη β-θαλασσαιμία προς την οδό της γονιδιακής επεξεργασίας. Ο συγκεκριμένος ενισχυτής είναι υπεύθυνος για την έκφραση του BCL11A μόνο στην ερυθροποιητική σειρά. Το BCL11A αποτελεί γνωστό καταστολέα της έκφρασης των γ-γονιδίων και επομένως δημιουργία ελλείμματος μόνο στην περιοχή του ερυθροειδικού ενισχυτή επηρεάζει την έκφραση του BCL11A μόνο στα ερυθροποιητικά κύτταρα, ενώ δεν επηρεάζει την έκφραση του στις υπόλοιπες αιμοποιητικές σειρές. Σε μια νέα προσέγγιση, η Sangamo Biosciences σε συνεργασία με την ομάδα του Γ. Σταματογιαννόπουλου στο Πανεπιστήμιο της Washington των ΗΠΑ, προχώρησε σε αφαίρεση όλου του γονιδιακού τόπου του BCL11A -και όχι αποκλειστικά του ερυθροειδικού ενισχυτή- στα CD34<sup>+</sup> αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα θαλασσαιμικών ασθενών μέσω ZFN. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης<sup>29</sup> ανακοινώθηκαν τον Δεκέμβριο του 2013 στο Συνέδριο της Αμερικανικής Εταιρείας Αιματολογίας (ASH) και εμφανίζονται ιδιαίτερος ελπιδοφόρα. Εν τούτοις, όπως και στην περίπτωση της κλινικής μελέτης για τη δημιουργία ελλειμμάτων στο γονιδιακό τόπο του CCR5, και στην περίπτωση της θαλασσαιμίας η μελέτη χρήζει βελτίωσης καθώς δεν είναι γνωστή ούτε η συχνότητα ούτε οι θέσεις δημιουργίας έκτοπων ριγημάτων, ενώ επιπλέον, η αφαίρεση όλου του γονιδιακού τόπου του BCL11A είναι δεδομένο ότι δύναται να επηρεάσει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση όλων των αιμοποιητικών κυτταρικών σειρών. Ως εκ τούτου, θεωρείται πιθανό ότι η ερευνητική κοινότητα θα εστιασθεί σε στοχευμένη αφαίρεση μόνο του ερυθροειδικού ενισχυτή με απώτερο σκοπό την αποτελεσματική ενεργοποίηση των ενδογενών γονιδίων της γ-σφαιρίνης, η οποία ελπίζεται ότι θα οδηγήσει σε θεραπευτικές προοπτικές της β-θαλασσαιμίας.

Συμπερασματικά, καθίσταται σαφές ότι οι νέες εξε-

λίξεις στο πεδίο της βασικής έρευνας, καθώς επίσης και των τεχνολογιών των επαγόμενων ολοδύναμων βλαστικών κυττάρων αλλά και της ανάδειξης νέων ρυθμιστικών στοιχείων του γονιδιώματος, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της σύγχρονης τεχνογνωσίας στο πεδίο της γονι-

διακής στόχευσης και επιδιόρθωσης, υπόσχονται μία νέα εποχή για τη ριζική θεραπεία πολλών σημαντικών μονογονιδιακών διαταραχών με στοχευμένες και ασφαλέστερες προσεγγίσεις<sup>30</sup>.

## Gene targeting and gene repair

by Eleni Papanicolaou<sup>1,2</sup>, Nicholas P. Anagnou<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cell and Gene Therapy, Center for Basic Research II, Biomedical Research Foundation of the Academy of Athens (I.B.E.A.A), Athens, Greece, <sup>2</sup>Laboratory of Biology, University of Athens School of Medicine, Athens, Greece

**ABSTRACT:** Over the last decade, the discovery of important novel regulatory elements of the human genome combined with the continuous developments of novel technologies in the field of molecular biology and biotechnology, have conferred important conceptual insights for the implementation of new molecular approaches for the treatment of monogenic disorders. The advent of induced pluripotent stem cells and the design of novel nucleases that target specific areas in the genome, have rendered gene editing approaches as pivotal players in the field of therapy of inherited diseases. Gene targeting is anticipated to outperform the classical approach of gene therapy via gene addition utilizing retroviral vectors, mainly due to the inability, so far, of this approach, to establish a targeted integration of the vector into the host genome. This review presents the current status of gene editing and gene repair, reviews the recent results and discusses how this knowledge can be used to eventually develop a safe and effective molecular approach for the treatment of monogenic diseases and particularly of hemopoietic disorders.

## Βιβλιογραφία

- Friedmann T, Roblin R. Gene therapy for human genetic disease? *Science*. 1972;175:949–955.
- Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, et al. Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 1. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:580–584.
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 2003;302:415–419.
- May C, Rivella S, Chadburn A, et al. Successful treatment of murine  $\beta$ -thalassemia intermedia by transfer of the human  $\beta$ -globin gene. *Blood*. 2002;99:1902–1908.
- Genovese P, Schirotti G, Escobar G, et al. Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;510:235–240.
- Sadelain M, Papapetrou EP, Bushman FD. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer*. 2011;12:51–58.
- Li L, Wu LP, Chandrasegaran S. Functional domains in FokI restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:4275–4279.
- Kim YG, Chandrasegaran S. Chimeric restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;91:883–887.
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:1156–1160.
- Pavletich NP, Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å resolution. *Science*. 1991;252:809–817.
- Smith J, Bibikova M, Whitby FG, et al. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28: 3361–3369.
- Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*. 2014;15:321–334.
- Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*. 2013;31:233–239.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337:816–821.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013;9:827–832.
- Gabriel R, Lombardo A, Arens A, et al. An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*. 2011;29:816–823.
- Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:W401–W407.
- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome

- editing. *Nat Biotechnol.* 2014;32:569-576.
19. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01044654?term=hiv+and+sangamo&rank=1>.
  20. [http://www.abstracts2view.com/asgct/view.php?nu=ASGCT14L1\\_283](http://www.abstracts2view.com/asgct/view.php?nu=ASGCT14L1_283).
  21. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11:636-646.
  22. Chang CJ, Bouhassira EE. Zinc-finger nuclease-mediated correction of  $\alpha$ -thalassemia in iPS cells. *Blood.* 2012;120:3906-3914.
  23. Ma N, Liao B, Zhang H, et al. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated gene correction in integration-free  $\beta$ -thalassemia induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem.* 2013;288:34671-34679.
  24. Voit RA, Hendel A, Pruett-Miller SM, et al. Nuclease-mediated gene editing by homologous recombination of the human globin locus. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:1365-13678.
  25. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science.* 2007;318:1920-1923.
  26. Papanicolaou E, Georgomanoli M, Stamateris E, et al. The new SIN-lentiviral vector for thalassemia gene therapy combining two HPFH activating elements corrects human thalassemic hematopoietic stem cells. *Hum Gene Ther.* 2012;23:15-31.
  27. Drakopoulou E, Papanikolaou E, Georgomanoli M, Anagnou NP. Towards more successful gene therapy clinical trials for  $\beta$ -thalassemia. *Curr Mol Med.* 2013;13:1314-1330.
  28. Bauer DE, Kamran SC, Lessard S, et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science.* 2013;342:253-257.
  29. Reik A, Chang KH, Stehling-Sun S, et al. Targeted gene modification in hematopoietic stem cells: a potential treatment for thalassemia and sickle cell anemia. *Blood.* 2013;122 (Suppl. 1):434A.
  30. Fischer A. Gene therapy: Repair and replace. *Nature* 2014;510:226-227.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

Το φάρμακο αυτό τελεί υπό συμπληρωματική παρακολούθηση. Αυτό θα επιτρέψει τον ταχύ προσδιορισμό νέων πληροφοριών ασφάλειας. Ζητείται από τους επαγγελματίες του τομέα της υγειονομικής περίθαλψης να αναφέρουν οποιοδήποτε πιθανολογούμενες ανεπιθύμητες ενέργειες. Βλ. παράγραφο Ανεπιθύμητες ενέργειες για τον τρόπο αναφοράς ανεπιθύμητων ενεργειών.

**ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ:** IMBRUVICA 140 mg σκληρά καψάκια. **ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ:** Κάθε σκληρό καψάκιο περιέχει 140 mg ibrutinib. **ΦΑΡΜΑΚΟΤΕΧΝΙΚΗ ΜΟΡΦΗ:** Σκληρό καψάκιο (καψάκιο). Λευκό αδιαφανές, σκληρό καψάκιο 22 mm σε μήκος, το οποίο φέρει την ένδειξη «ibr 140 mg» με μαύρο μελάνι. **ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ: Θεραπευτικές ενδείξεις:** Το IMBRUVICA ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα (ΑΚΜ). Το IMBRUVICA ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), οι οποίοι έχουν λάβει τουλάχιστον μία προηγούμενη θεραπεία, ή ως πρώτης γραμμής θεραπεία επί παρουσίας εξέλιξης του 17p ή μετάλλαξη στο TP53 σε ασθενείς οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για χημειο-ανοσοθεραπεία. Το IMBRUVICA ενδείκνυται για τη θεραπεία ενηλίκων ασθενών με μακροσφαιριναιμία του Waldenström (WM), οι οποίοι έχουν λάβει τουλάχιστον μία προηγούμενη θεραπεία, ή ως πρώτης γραμμής θεραπεία για ασθενείς οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για χημειο-ανοσοθεραπεία. **Αντενδείξεις:** Υπερευαίσθηση στη δραστική ουσία ή σε κάποιο από τα έκδοχα. Η χρήση σκευασμάτων που περιέχουν υπερικό/βαλσαμόχορτο (St. John's Wort), αντενδείκνυται σε ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με IMBRUVICA. **Ειδικές προειδοποιήσεις και προφυλάξεις κατά τη χρήση: Σχετιζόμενα με αιμορραγία συμβάντα:** Έχουν υπάρξει αναφορές αιμορραγικών συμβάντων σε ασθενείς που έχουν ακολουθήσει θεραπεία με IMBRUVICA, τόσο με όσο και χωρίς θρομβοπενία. Σε αυτές περιλαμβάνονται τα ήσασα αιμορραγικά συμβάντα, όπως είναι ο μώλωπας, η επιστοάζη και οι πετέχειες, και τα μέγιστα αιμορραγικά συμβάντα, μερικά βακτηριόφθορα, συμπεριλαμβανομένης γανταμετρικής αιμορραγίας, της ενδοκρανιακής αιμορραγίας και της αιματοουρίας. Οι ασθενείς αποκλείονται από τη συμμετοχή στις μελέτες φάσης 2 και 3 του IMBRUVICA, εάν έπρεπε να πάρουν βαρφαρίνη ή άλλους ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ. Η βαρφαρίνη ή οι άλλοι ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ δεν θα πρέπει να χορηγούνται ταυτόχρονα με το IMBRUVICA. Τα συμπληρώματα, όπως είναι τα σκευασμάτα ηθυλαίου και βιταμίνης Ε, θα πρέπει να αποφεύγονται. Η χρήση του IMBRUVICA σε ασθενείς που χρήζουν άλλων αντιπηκτικών ή φαρμακευτικών προϊόντων, τα οποία αναστέλλουν την αιμοπεταλίων ενδέχεται να αυξήσει τον κίνδυνο αιμορραγίας, και θα πρέπει να λαμβάνεται ειδική φροντίδα εάν χρησιμοποιείται αντιπηκτική αγωγή. Οι ασθενείς με συγγενή αιμορραγική διάθεση δεν έχουν μελετηθεί. Το IMBRUVICA θα πρέπει να διακοπεί τουλάχιστον 3 έως 7 ημέρες πριν και μετά από χειρουργική επέμβαση ανάλογα με το είδος της χειρουργικής επέμβασης και τον κίνδυνο αιμορραγίας. **Λευκόσταση:** Έχουν αναφερθεί περιστατικά λευκόστασης σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IMBRUVICA. Ο υψηλός αριθμός λεμφοκυττάρων στην κυκλοφορία (> 400.000/mcL) ενδέχεται να συνεπάγεται αυξημένο κίνδυνο. Εξετάστε το ενδεχόμενο προσωρινής αναστολής του IMBRUVICA. Οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά. Χορηγήστε υποστηρικτική αγωγή, συμπεριλαμβανομένης της ενυδάτωσης και/ή της κυτταρομειωτικής αγωγής, ανάλογα με τις ενδείξεις. **Λοιμώξεις:** Παρατηρήθηκαν λοιμώξεις (συμπεριλαμβανομένης της σφαιμίας, της ουδετεροπενικής σφαιμίας, των βακτηριακών, ιογενών ή μυκητιασικών λοιμώξεων) στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IMBRUVICA. Ορισμένες από αυτές τις λοιμώξεις έχουν συσχετιστεί με νοσηλεία και θάνατο. Οι περισσότεροι ασθενείς με θανατηφόρες λοιμώξεις είχαν, επίσης, ουδετεροπενία. Οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται για πυρετό, ουδετεροπενία και λοιμώξεις και θα πρέπει να τους χορηγηθεί κατάλληλη αντιβιοτική θεραπεία, ανάλογα με τις ενδείξεις. **Κυτταροπενίες:** Οφειλόμενες στη θεραπεία κυτταροπενίες 3<sup>ου</sup> ή 4<sup>ου</sup> βαθμού (ουδετεροπενία, θρομβοπενία και αναιμία) αναφέρθηκαν στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IMBRUVICA. Παρακολουθείτε το πλήρες αιμοδιάγραμμα σε μηνιαία βάση. **Κολπική μαρμαρυγή/πτερυγιασμός:** Κολπική μαρμαρυγή και κολπικός πτερυγιασμός έχουν αναφερθεί σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IMBRUVICA, ειδικά σε ασθενείς με καρδιακούς παράγοντες κινδύνου, οξείες λοιμώξεις και προηγούμενο ιστορικό κολπικής μαρμαρυγής. Παρακολουθείτε κατά διαστήματα κλινικά όλοι τους ασθενείς για κολπική μαρμαρυγή. Οι ασθενείς που εμφανίστηκαν αρρυθμίες ή νέα εμφάνιση θλιβώνια θα πρέπει να αξιολογούνται κλινικά και, εάν ενδείκνυται, να υποβάλλονται σε ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ). Σε ασθενείς με προϋπάρχουσα κολπική μαρμαρυγή, η οποία χρήζει αντιπηκτικής θεραπείας, θα πρέπει να εξεταστούν οι εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές στο IMBRUVICA. Στους ασθενείς που αναπτύσσουν κολπική μαρμαρυγή υπό θεραπεία με IMBRUVICA, θα πρέπει να πραγματοποιείται εκτίμηση του κινδύνου θρομβοεμβολικής νόσου. Στους ασθενείς που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο και όπου οι εναλλακτικές στο IMBRUVICA δεν είναι κατάλληλες, θα πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο αυστηρά ελεγχόμενης θεραπείας με αντιπηκτικά. **Σύνδρομο λύσης όγκου:** Σύνδρομο λύσης όγκου έχει αναφερθεί με θεραπεία με IMBRUVICA. Οι ασθενείς σε κίνδυνο για σύνδρομο λύσης όγκου είναι εκείνοι με υψηλό φορτίο όγκου πριν τη θεραπεία. Παρακολουθήστε στενά τους ασθενείς και λάβετε τις κατάλληλες προφυλάξεις. **Επιδόσεις στο διάστημα QT:** Σε μία μελέτη φάσης 2, οι αξιολογήσεις του ΗΚΓ έδειξαν ότι το IMBRUVICA οδήγησε σε ήπια μείωση του διαστήματος QTc (μέσος όρος 7,5 ms). Παρόλο που ο υποκειμενός μηχανισμός και η συσχέτιση ασφάλειας αυτού του ευρήματος δεν είναι γνωστά, οι ιατροί θα πρέπει να χρησιμοποιούν την κλινική τους κρίση κατά την εκτίμησή τους εάν θα συνταγογραφούν ibrutinib στους ασθενείς σε κίνδυνο από την περαιτέρω βράχυνση της διάρκειας του διαστήματος QT (π.χ. συγγενές σύνδρομο βραχέος QT ή ασθενείς με οικογενικό ιστορικό τέτοιου συνδρόμου). **Άλληλεπιδράσεις φαρμάκου-φαρμάκου:** Η συγχρόνηση ισχυρών ή μέτριων αναστολέων του CYP3A4 με IMBRUVICA ενδέχεται να οδηγήσει σε αυξημένη έκθεση σε ibrutinib και συνεπώς σε μεγαλύτερο κίνδυνο τοξικότητας. Αντίθετα, η συγχρόνηση επαγωγέων του CYP3A4 ενδέχεται να οδηγήσει σε μειωμένη έκθεση στο IMBRUVICA και, κατά συνέπεια, σε κίνδυνο έλλειψης αποτελεσματικότητας. Επομένως, η ταυτόχρονη χρήση του IMBRUVICA με ισχυρούς ή μέτριους αναστολέα/επαγωγείς του CYP3A4 θα πρέπει να αποφεύγεται, όταν είναι δυνατό, και η συγχρόνηση θα πρέπει να εξετάζεται μόνο όταν το πιθανό όφελος υπερκαλύπτει ασφάλως τους δυνητικούς κινδύνους. Οι ασθενείς θα πρέπει να παρακολουθούνται στενά για σημεία τοξικότητας από το IMBRUVICA, εάν πρέπει να χρησιμοποιηθεί αναστολέας του CYP3A4. Εάν πρέπει να χρησιμοποιηθεί επαγωγείς του CYP3A4, παρακολουθήστε στενά τους ασθενείς για σημεία έλλειψης αποτελεσματικότητας στο IMBRUVICA. **Γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία:** Οι γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία πρέπει να χρησιμοποιούν ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδο αντισύλληψης κατά τη διάρκεια της λήψης του IMBRUVICA. **Ανεπιθύμητες ενέργειες: Περίληψη του προφίλ ασφάλειας:** Το προφίλ ασφάλειας βασίζεται σε συγκεντρωτικά δεδομένα από 420 ασθενείς, οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με IMBRUVICA σε τρεις κλινικές μελέτες φάσης 2 και σε μία τυχαioποιημένη μελέτη φάσης 3 και από την εμπειρία μετά την κυκλοφορία του προϊόντος. Οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία για ΑΚΜ στις κλινικές μελέτες έλαβαν IMBRUVICA στα 560 mg άμαξ ημερησίως και οι ασθενείς που έλαβαν θεραπεία για ΧΛΛ ή WM στις κλινικές μελέτες έλαβαν IMBRUVICA στα 420 mg άμαξ ημερησίως. Όλοι οι ασθενείς στις κλινικές μελέτες έλαβαν IMBRUVICA μέχρι να εμφανιστεί εξέλιξη της νόσου ή να μην γίνεται πλέον καλά ανεκτό. Οι συχνότερα εμφανιζόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες (≥ 20 %) ήταν η ουδετεροπενία, η αναιμία, και η διάρροια, το μυοσκελετικό άλγος, η λοιμώξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, ο μώλωπας, το εξάνθημα, η ναυτία και η θρομβοπενία. **Κατάλογος ανεπιθύμητων ενεργειών ως μορφή πίνακα:** Οι οφειλόμενες στη θεραπεία ανεπιθύμητες ενέργειες για το ΑΚΜ, τη ΧΛΛ ή τη WM και οι ανεπιθύμητες ενέργειες μετά την κυκλοφορία του προϊόντος αναφέρονται στη συνέχεια ανά κατηγορία/οργανικό σύστημα και ομάδα συχνότητας. Οι συχνότητες ορίζονται ως εξής: πολύ συχνές (≥ 1/10), συχνές (≥ 1/100 έως < 1/10), όχι συχνές (≥ 1/1.000 έως < 1/100), μη γνωστές (δεν μπορούν να εκτιμηθούν με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα). Στην κάθε ομάδα συχνότητας, οι ανεπιθύμητες επιδόσεις παρουσιάζονται κατά φθίνουσα σειρά σοβαρότητας.

Κατηγορία/οργανικό σύστημα	Συχνότητα (Όλοι οι βαθμοί)	Ανεπιθύμητες ενέργειες
Λοιμώξεις και παρασιτώσεις	Πολύ συχνές	Πνευμονία* Λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος Ουρολοιμώξη Παραρρινοκολπίτιδα* Δερματική λοίμωξη*
	Συχνές	Σηψαιμία*
Διαταραχές του αιμοποιητικού και του λεμφικού συστήματος	Πολύ συχνές	Ουδετεροπενία Θρομβοπενία Αναιμία
	Συχνές	Εμπύρετη ουδετεροπενία Λευκοκυττάρωση Λεμφοκυττάρωση
	Όχι συχνές	Λευκόσταση
Διαταραχές του μεταβολικού και της θρέψης	Συχνές	Αφυδάτωση Υπερουριχαιμία
	Όχι συχνές	Σύνδρομο λύσης όγκου
Διαταραχές του νευρικού συστήματος	Πολύ συχνές	Ζάλη Κεφαλαλγία
Οφθαλμικές διαταραχές	Συχνές	Θαμπή όραση
Καρδιακές διαταραχές	Συχνές	Κολπική μαρμαρυγή
Αγγειακές διαταραχές	Πολύ συχνές	Αιμορραγία* Επίστοζη Μώλωπες* Πετέχειες
	Συχνές	Υποσκληρίδιο αιμάτωμα
Διαταραχές του γαστρεντερικού	Πολύ συχνές	Διάρροια Έμετος Στοματίτιδα* Ναυτία Δυσκοιλότητα
	Συχνές	Ξηροστομία
Διαταραχές του δέρματος και του υποδόριου ιστού	Πολύ συχνές	Εξάνθημα*
Διαταραχές του μυοσκελετικού συστήματος και του συνδετικού ιστού	Πολύ συχνές	Αρθραλγία Μυοσκελετικό άλγος*
	Όχι συχνές	Αγγειοοίδημα Κνίδωση
	Μη γνωστές	Ερυθρίμα
Γενικές διαταραχές και καταστάσεις της οδού χορήγησης	Πολύ συχνές	Πυρεξία Περιφερικό οίδημα

\* Περιλαμβάνει πολλούς όρους ανεπιθύμητων ενεργειών.

**Διακοπή και μείωση της δόσης λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών:** Από τους 420 ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IMBRUVICA για τη ΧΛΛ, το ΑΚΜ ή τη WM, το 4 % διέκοψε τη θεραπεία πρώιμα λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών. Σε αυτά περιλαμβάνονται οι λοιμώξεις και το υποσκληρίδιο αιμάτωμα. Ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες οδήγησαν σε μείωση της δόσης παρατηρήθηκαν στο 7 % περίπου των ασθενών. **Ηλικιακός:** Από τους 420 ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με IMBRUVICA, το 59 % είχε ηλικία άνω των 65 ετών. Ανεπιθύμητες ενέργειες ≥ 3<sup>ου</sup> βαθμού εμφανίστηκαν συχνότερα μεταξύ των ηλικιακών ασθενών υπό θεραπεία με IMBRUVICA (53 % των ασθενών ηλικίας ≥ 65 ετών έναντι 42 % των νεότερων ασθενών). Οι ανεπιθύμητες ενέργειες ≥ 3<sup>ου</sup> βαθμού που εμφανίστηκαν συχνότερα μεταξύ των ηλικιακών ασθενών ήταν πνευμονία, κολπική μαρμαρυγή και ουρολοιμώξη. **Αναφορά πιθανολογούμενων ανεπιθύμητων ενεργειών:** Η αναφορά πιθανολογούμενων ανεπιθύμητων ενεργειών μετά από τη χορήγηση άδειας κυκλοφορίας του φαρμακευτικού προϊόντος είναι σημαντική. Επιτρέπεται η συνεχή παρακολούθηση της σχέσης οφέλους-κινδύνου του φαρμακευτικού προϊόντος. Ζητείται από τους επαγγελματίες του τομέα της υγειονομικής περίθαλψης να αναφέρουν οποιοδήποτε πιθανολογούμενες ανεπιθύμητες ενέργειες μέσω του εθνικού συστήματος αναφοράς που αναγράφεται στο **Παράρτημα V, ΚΑΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ:** Janssen-Cilag International NV, Turnhoutseweg 30, B-2340 Beerse, Βέλγιο. **ΑΡΙΘΜΟΣ(ΟΙ) ΑΔΕΙΑΣ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΑΣ:** EU/1/14/945/001 (90 σκληρά καψάκια). EU/1/14/945/002 (120 σκληρά καψάκια). **ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΝΑΘΕΩΡΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΙΜΕΝΟΥ:** 22 Οκτωβρίου 2015. Λεπτομερή πληροφοριακά στοιχεία για το παρόν φαρμακευτικό προϊόν είναι διαθέσιμα στον δικτυακό τόπο του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων: <http://www.ema.europa.eu>.

**ΤΡΟΠΟΣ ΔΙΑΘΕΣΗΣ:** Περιορισμένη ιατρική συνταγή από ειδικό ιατρό και παρακολούθηση κατά τη διάρκεια της αγωγής.

## ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΕΣ / ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΕΣ ΤΙΜΕΣ ΕΚΤΑΚΤΗΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ

Περιεκτικότητα	Μέγεθος συσκευασίας	Νοσοκομειακή τιμή
CAPS 140 MG/CAP	BT x 1 (HDPE) BOTTLE x 90	5.167,87€
	BT x 1 (HDPE) BOTTLE x 120	6.890,50€

Η κυκλοφορία του προϊόντος στην Ελληνική αγορά αναμένεται αμέσως μετά την ολοκλήρωση των διαδικασιών έγκρισης τιμής από το Υπουργείο Υγείας και αποζημίωσης από τα ασφαλιστικά ταμεία.

















**Revlimid<sup>®</sup>**  
(lenalidomide)



REV/MM/HEMA/KTY/07.2014



Περαιτέρω πληροφορίες διατίθενται από τη Γένεσις Φάρμα



Λ. Κηφισίας 274, 152 32 Χαλάνδρι Τηλ.: 210 8771500, Fax: 210 6896619  
e-mail: [info@genesishpharma.com](mailto:info@genesishpharma.com), [www.genesishpharma.com](http://www.genesishpharma.com)