

Gentherapie von Hämoglobinkrankheiten – aktuelle Konzepte und Herausforderungen

Gene Therapy for the Hemoglobin Disorders – Current Concepts and Challenges

Autoren

Andreas E. Kulozik, Joachim Kunz

Institut

Klinik für Pädiatrische Onkologie, Hämatologie und Immunologie, Hopp Kindertumorzentrum Heidelberg (KITZ), Universität Heidelberg

Schlüsselwörter

Gentherapie, Thalassämie, Sichelzellerkrankheit

Key words

gene therapy, thalassemia, sickle cell disease

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-0825-9666>

Transfusionsmedizin 2019; 9: 155–163 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York | ISSN 2191-8805

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Andreas Kulozik
Klinik für Pädiatrische Onkologie, Hämatologie und Immunologie, Hopp Kindertumorzentrum Heidelberg (KITZ), Universität Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 430, 69120 Heidelberg
andreas.kulozik@med.uni-heidelberg.de

ZUSAMMENFASSUNG

Die β -Thalassämien und die Sichelzellerkrankung sind weltweit die häufigsten Einzelgendefekte, die konventionell nur durch eine lebenslang erforderliche Supportivtherapie oder kurativ mittels allogener Stammzelltransplantation behandelbar sind. Aktuell werden Gentherapiestrategien entwickelt, die nach Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen durch lentivirale Vektoren zu einer Expression eines therapeutischen β -Globin-Gens oder zur therapeutischen Reexpression der fetalen Globinsynthese und damit des fetalen Hämoglobins (HbF) führen. Für die β -Thalassämie hat die Genadditionstherapie für eine ausgewählte Gruppe von Patientinnen und Patienten mit transfusionsbedürftiger Non- β^0 -Thalassae-

mia major nach konditionaler Zulassung durch die European Medicines Agency (EMA) im Juni 2019 einen ersten Grad klinischer Reife erreicht. In dieser Übersicht diskutieren wir darüber hinaus die Möglichkeiten und Herausforderungen von Genomeditierungsstrategien für die Hämoglobinkrankheiten, insbesondere durch Inaktivierung von BCL11A, des zentralen Inhibitors der postnatalen fetalen Hämoglobinsynthese. Insgesamt verspricht die Entwicklung der Gentherapie für die Hämoglobinkrankheiten eine relevante Chance für diese, auch in Deutschland zahlreicher werdenden Gruppe von Patientinnen und Patienten mit schweren, sowohl Lebensqualität als auch Lebenserwartung erheblich einschränkenden Erkrankungen.

ABSTRACT

The β -thalassemias and sickle cell disease represent the most frequent single gene disorders worldwide. The standard of care for both conditions is either life-long supportive therapy or allogeneic stem cell transplantation. Currently, strategies for gene therapy are being developed, which are based on the lentiviral transduction of hematopoietic stem cells aiming at either re-establishing normal β -globin chain synthesis or at re-activating fetal γ -globin chain and HbF (fetal haemoglobin) expression. For a selected group of patients with transfusion dependent non- β^0 thalassemia major the European Medicines Agency (EMA) conditionally licensed gene addition therapy in June 2019, which has thus reached the first step of clinical maturity. In this review, we also discuss the potential and the challenges of gene editing strategies for the hemoglobin diseases in particular by inactivating BCL11A, the central inhibitor of postnatal fetal hemoglobin synthesis. In sum, the development of gene therapy offers a relevant chance to this group of patients that has recently significantly increased in size also in Germany and who suffer from conditions that severely limit both, life expectancy and quality of life.

Die klinische Herausforderung und aktuelle Therapiestrategien der Hämoglobinkrankheiten

Weltweit gesehen sind die Hämoglobinopathien, insbesondere β -Thalassämie und Sichelzellerkrankung, die häufigsten Erbkrankheiten [1, 2]. Bedingt durch Migrationsbewegungen nimmt auch in Mitteleuropa die Häufigkeit dieser Erkrankungen zu [3, 4].

β -Thalassämie

Bei den β -Thalassämien verursachen Mutationen des β -Globin-Gens einen teilweisen bzw. weitgehenden (β^+) oder vollständigen (β^0) Expressionsverlust der β -Kette des Hämoglobins. Die daraus resultierende Imbalance zwischen α - und β -Globin-Ketten verhindert die Ausreifung der erythropoetischen Vorläufer und führt bei homozygot Betroffenen trotz einer maximal gesteigerten, jedoch ineffektiven Erythropoese zu einer schwerwiegenden Anämie [5]. Auch wenn zahlreiche, in verschiedenen ethnischen Gruppen unterschiedlich prävalente β -Thalassämie-Mutationen beschrieben sind, führen biallelisch vorliegende β -Thalassämie-Mutationen bei den meisten Patienten zu einer lebenslang transfusionsbedürftigen Thalassaemia major. Patienten mit β^+ -Thalassämie-Mutationen, die eine relevante (ca. 10–15% des Normalen) β -Globin-Expression zulassen, oder Patienten, die bedingt durch genetische Modifikatoren der γ -Globin-Synthese über die Säuglingszeit hinaus einen bedeutsamen Anteil fetalen Hämoglobins (HbF) exprimieren, können das Bild einer Thalassaemia intermedia mit später einsetzendem und geringer ausgeprägtem Transfusionsbedarf ausbilden. Die Therapie der transfusionsbedürftigen β -Thalassämien besteht aus regelmäßigen Erythrozytentransfusionen und einer begleitenden intensiven Eiseneliminationstherapie mit Chelatbildnern. Mit einer solchen Therapie erreichen die Patienten in der Regel das Erwachsenenalter. Dennoch sind die Lebensqualität und – durch die Komplikationen der transfusionsbedingten Siderose – auch die Lebenserwartung stark eingeschränkt. Deshalb wird eine kurative Therapie durch eine allogene Stammzelltransplantation im Kindes- und Jugendalter trotz der damit verbundenen Risiken als indiziert angesehen, wenn ein HLA-identischer Stammzellspender zur Verfügung steht [6, 7]. Insbesondere in Ländern mit hoher Thalassämieprävalenz sind die Belastungen durch die Transfusions- und Chelattherapie auch eine volkswirtschaftliche Bürde: Abgesehen von den Belastungen des Blutspendensystems verursacht allein die oral verabreichte Eisenchelatherapie eines durchschnittlichen erwachsenen Patienten mit Thalassaemia major Jahrestherapiekosten von mehr als 30 000 €.

Sichelzellerkrankung

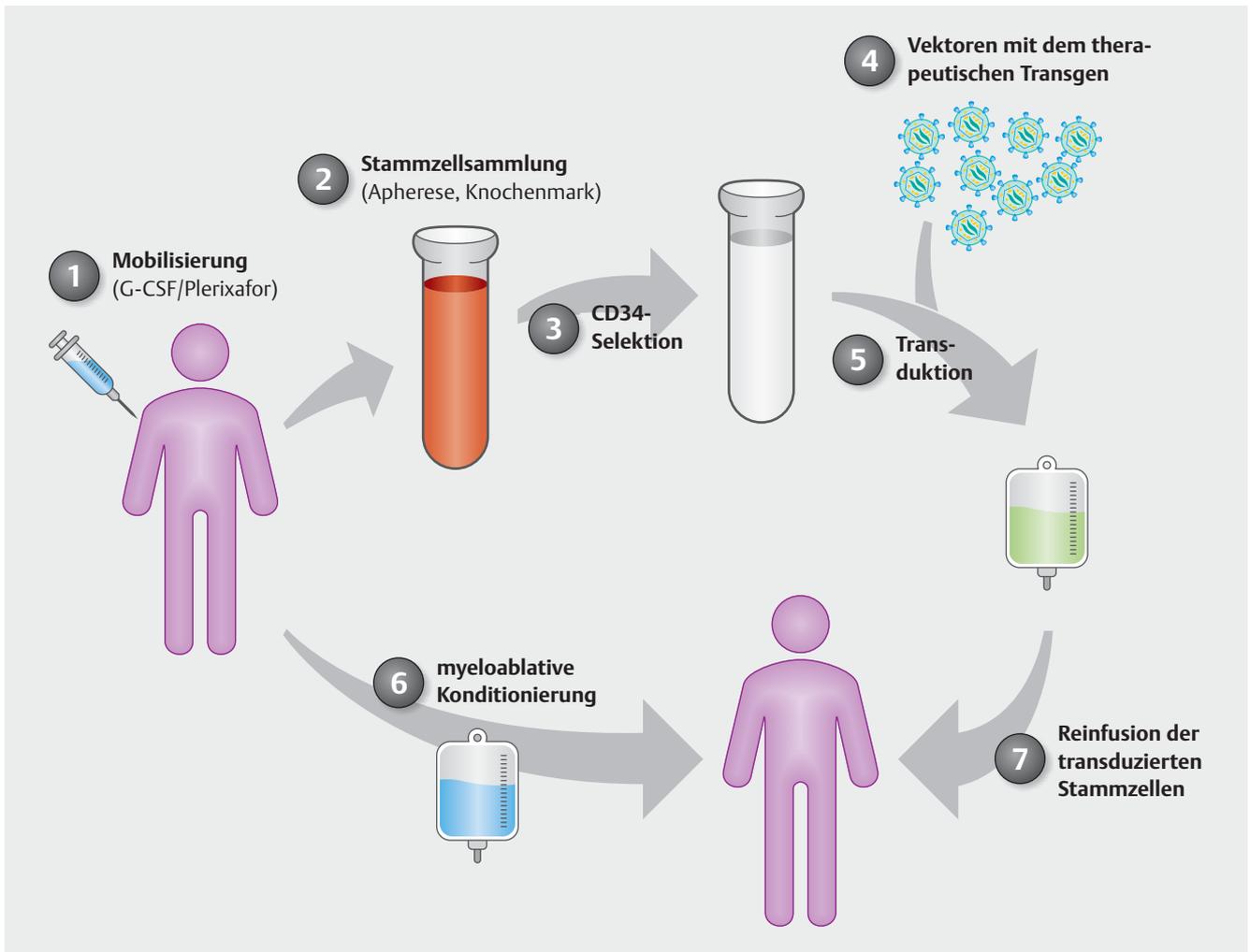
Bei der Sichelzellerkrankung liegt immer eine Punktmutation des β -Globin-Gens vor, die zu einer Aminosäuresubstitution (Glutaminsäure zu Valin) an Position 6 des β -Globins führt. Das resultierende Sichelzellerhämoglobin (HbS) kann im desoxygenierten Zustand Polymere bilden, die zu einer Verformung der Erythrozyten führen. Bei Patienten mit homozygoter HbS-Mutation oder bei gemischter Heterozygotie mit einer Thalassämie-Mutation wird jenseits des Neugeborenenalters ganz überwiegend HbS gebildet. Dann prägt sich die Sichelzellerkrankung mit chronischer Hämolyse, aku-

ten vaso-okklusiven Krisen und einer nahezu alle Organe, zunächst insbesondere die Milz betreffenden Vaskulopathie aus [8]. Wie auch bei der Thalassämie wird der Schweregrad der Sichelzellerkrankung durch die Expression von HbF moduliert. Im Extremfall exprimiert ein Allel des β -Globin-Locus das HbS, das andere Allel bedingt durch eine hereditäre Persistenz fetalen Hämoglobins (HFPFH) ausschließlich HbF [9]. Weil das HbF, im Gegensatz zu HbA, die Polymerbildung des HbS sehr effektiv stört, prägen solche Patienten keine oder nur sehr milde Symptome der Sichelzellerkrankung aus [10].

Im subsaharischen Afrika versterben Kinder mit Sichelzellerkrankung meist vor dem 5. Lebensjahr [11]. In westlichen Ländern konnte durch den Einsatz prophylaktischer Antibiotika, durch Impfungen, durch Elternschulung bezüglich der Akutkomplikationen der Sichelzellerkrankung, durch die Früherkennung von Patienten mit Schlaganfallrisiko, durch den gezielten Einsatz von Erythrozytentransfusionen und nicht zuletzt durch den Einsatz des HbF-Induktors Hydroxycarbamid erreicht werden, dass über 95% der Kinder mit Sichelzellerkrankung erwachsen werden [12]. Dennoch schränken insbesondere die Schmerzen im Rahmen vaso-okklusiver Krisen die Lebensqualität stark ein. Auch die Lebenserwartung von Patienten mit Sichelzellerkrankung bleibt selbst bei optimaler Versorgung im Vergleich zu gesunden Kontrollen um mehr als 2 Jahrzehnte verkürzt [13, 14]. In den letzten Jahren wurden mehrere medikamentöse Behandlungen der Sichelzellerkrankung entwickelt, die an unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen angreifen [15–19]. Für jede dieser Therapien konnte ein positiver Effekt demonstriert werden, grundsätzlich sind auch Kombinationen verschiedener Pharmaka sinnvoll. Dennoch haben alle bisher eingesetzten medikamentösen Therapien der Sichelzellerkrankung den Charakter einer auf Jahre angelegten Supportivtherapie. Bisher einzig verfügbare kurative Therapieoption ist die allogene Stammzelltransplantation. Steht ein HLA-identischer Spender zur Verfügung, gilt diese mittlerweile als „Standard of Care“ [7, 20, 21]. Die Stammzelltransplantation vom alternativen Spender, d. h. von einem nicht verwandten HLA-identischen Spender oder gar von einem haploidentischen Spender, ist mit einem Mortalitätsrisiko im Bereich von 10% verbunden und bleibt deshalb ausgewählten, schwer betroffenen Patienten vorbehalten [22, 23].

Prinzip der Gentherapie bei Hämoglobinkrankheiten

Sowohl für die Sichelzellerkrankung als auch für die β -Thalassämie bietet die Gentherapie für die Mehrzahl der Patienten, für die kein geeigneter Stammzellspender zur Verfügung steht, grundsätzlich eine kurative Option. Im Gegensatz zur Stammzelltransplantation schließt diese Therapie das Risiko einer „Graft-versus-Host“-Erkrankung aus. Als monogene Krankheit sind beide Hämoglobinopathien besonders für eine Gentherapie geeignet, auch weil der zugrunde liegende Gendefekt ausschließlich in der Erythropoese behoben werden muss. Darüber hinaus sind durch die jahrzehntelange Erfahrung in der Stammzelltransplantation zahlreiche Methoden etabliert, um hämatopoetische Stammzellen zu gewinnen, zu manipulieren und zu retransplantieren. Die bisher klinisch



► **Abb. 1** Ablauf der Gentherapie. Die Gentherapie der Hämoglobinkrankheiten erfolgt bislang ausschließlich ex vivo. In der Regel werden periphere Blutstammzellen nach Mobilisierung mit G-CSF und/oder Plerixafor (1) mittels Leukapherese (2) gewonnen. Alternativ kann Knochenmark gewonnen werden. Die Blutstammzellen werden durch CD34-Selektion angereichert (3) und mit unter GMP-Bedingungen hergestellten Vektoren (4) inkubiert (5). Nachdem die Qualität des Gentherapieprodukts sichergestellt wurde, wird der Patient einer myeloablativen Konditionierung (6) unterzogen und die genmanipulierten Stammzellen zurückgegeben (7), entweder durch Infusion oder intraossär.

eingesetzten Verfahren der Gentherapie für Hämoglobinopathien nutzen dieselben Techniken wie eine autologe Stammzelltransplantation, bei der allerdings die hämatopoetischen Stammzellen vor der Retransplantation mit dem therapeutischen Transgen in einem lentiviralen Vektor transduziert werden (► **Abb. 1**) [24, 25]. Um Hämoglobinopathien durch eine solche Ex-vivo-Gentherapie zu heilen, müssen folgende Bedingungen sichergestellt sein: Erstens müssen hämatopoetische Stammzellen in ausreichender Zahl gewonnen und transduziert werden, ohne dass sie dabei ihre Stammzeleigenschaften verlieren. Zweitens muss der Gendefekt in nahezu allen Stammzellen so korrigiert werden, dass Hämoglobin in physiologischer Menge synthetisiert wird. Drittens müssen die Stammzellen im Knochenmark eine Umgebung vorfinden, die ein dauerhaftes Anwachsen gestattet. Dies erfordert das Freimachen der Stammzellnische durch eine myeloablative Konditionierung. Insbesondere bei der Thalassämie wirkt es sich günstig aus, dass die durch Gentherapie korrigierten erythropoetischen Vor-

läufer gegenüber den nicht korrigierten Vorläufern einen Überlebensvorteil haben. Dieser Effekt wurde zuerst bei der allogenen Stammzelltransplantation für Hämoglobinopathien beobachtet, bei der ein Spenderanteil der kernhaltigen Knochenmarkzellen von etwa 20% genügt, damit die Erythrozyten nahezu vollständig Spendermerkmale tragen [26]. Allerdings ist dieser Selektionsvorteil der korrigierten Erythropoese wesentlich geringer ausgeprägt als beispielsweise der korrigierter T-Zellen bei schweren Immundefekten. Aus diesem Grund wurde die Gentherapie historisch gesehen zuerst am Beispiel der schweren Immundefekte entwickelt.

Die Entwicklung der Gentherapie

Das Aufkommen der rekombinanten DNA-Technologien vor ca. 50 Jahren und die Klonierung des β -Globin-Gens als erstes menschliches Gen Mitte der 1970er-Jahre [27] hat früh (und zunächst verfrüht) zu den ersten Versuchen einer Gentherapie der

Thalassämie geführt [28]. Zu den wesentlichen Hürden der frühen Versuche einer Gentherapie gehörten die Schwierigkeiten, therapeutische Gene mit ausreichender Effizienz, Stabilität und Sicherheit in hämatopoetische Stammzellen einzubringen. So blieb die Gentherapie für viele Jahre eher Science-Fiction als eine realistische Option für betroffene Patienten.

Die Entwicklung von retroviralen Vektoren war ein Durchbruch für das Feld der klinisch einsetzbaren Gentherapie. Dieser Typ von Vektoren nutzt die natürliche Fähigkeit von Retroviren, sich effizient in das Wirtsgenom zu integrieren und virale Gene stabil zu exprimieren. Die Verwendung dieses, von dem Subtyp der γ -Retroviren nach Elimination pathogener Abschnitte des viralen Genoms abgeleiteten Vektortypus ermöglicht somit die effiziente und stabile Transduktion (d. h. das Einbringen von DNA in eine Zelle mithilfe eines Virus) von hämatopoetischen Stammzellen und somit die Expression von rekombinanten therapeutischen Genen in diesen Zellen und den von ihnen ausgehenden reifen Blutzellen. Diese neue und revolutionäre Therapiestrategie wurde zunächst bei angeborenen Immundefekten eingesetzt [29–32]. Dies war unter anderem dadurch begründet, dass die therapeutischen Gene nur geringgradig exprimiert werden müssen, um einen Behandlungseffekt zu erzielen. Außerdem akquirieren erfolgreich modifizierte immundefiziente Zellen gegenüber Zellen, die das therapeutische Gen nicht aufgenommen haben, einen Selektionsvorteil und können daher expandieren. So konnte die Gentherapie für eine sehr seltene Form der Immundefizienz, den schweren kombinierten Immundefekt durch Mangel an Adenosindeaminase (ADA-SCID), 2016 als erste Gentherapie von der European Medicines Agency (EMA) zugelassen werden [33].

γ -retrovirale Vektoren

Parallel dazu wurden auch bei anderen Immundefekterkrankungen klinische Gentherapiestudien durchgeführt, die im Sinne der Korrektur der zugrunde liegenden Erkrankung durchaus erfolgreich gewesen sind [34]. Einen erheblichen Rückschlag erlebte das Feld jedoch durch das häufige Auftreten von Sekundärleukämien, die durch die Aktivierung von Onkogenen an den Stellen der Integration des therapeutischen Vektors entstand [35–37]. Diese Insertionsmutagenese wurde durch die präferenzielle Integration des Vektors an transkriptional aktiven oder regulativen Regionen des Wirtsgenoms verursacht, sodass es zu einer Selektion von modifizierten Zellen kam, bei denen proliferationsstimulierende (Onko-)Gene aktiviert worden waren [35, 38–40]. Für diese selektive Integration in „gefährlichen“ Abschnitten des Wirtsgenoms und für die Aktivierung proliferationsaktiver Gene zeigten sich die sogenannten Long terminal Repeats (LTR) der retroviralen Vektoren verantwortlich. Aus diesem Grunde werden γ -retrovirale Vektoren für die Entwicklung von Gentherapiestrategien nicht mehr eingesetzt.

Neue self-inactivating lentivirale Vektoren

Heute klinisch eingesetzte virale Vektoren beruhen auf einer Weiterentwicklung der γ -retroviralen Vektoren, bei denen die LTRs inaktiviert wurden und die Expression der therapeutischen Gene wesentlich auch auf den natürlichen regulativen Gensequenzen

beruht [41–43]. Diese sogenannten self-inactivating (SIN) γ -retroviralen oder lentiviralen Vektoren integrieren sich zufällig in das Wirtsgenom, nicht präferenziell in regulativen Bereichen. Außerdem ist das Risiko der Aktivierung von Genen in der Nachbarschaft der Integrationsstellen wegen der fehlenden bzw. beim Integrationsprozess inaktivierten LTRs begrenzt. Bei einer typischerweise erreichten Integration von ca. 2–3 viralen Vektoren in das Wirtsgenom ist das Risiko einer Onkogenaktivierung damit ausgesprochen gering – aber wahrscheinlich auch nicht null. So sind in einer zunehmenden Zahl von klinischen Studien mit lentiviralen Vektoren für die Behandlung unterschiedlicher genetischer Erkrankungen bislang noch keine durch die Integration der Viren verursachte Sekundärleukämien oder andere maligne Erkrankungen beobachtet worden [33, 44, 45]. Allerdings ist die Anzahl von behandelten Patienten noch klein (< 100) und die Dauer der Nachbeobachtung insgesamt noch kurz, sodass eine abschließende Bewertung des Risikopotenzials dieses Vektortypus heute noch nicht möglich ist.

Herausforderungen bei der Gentherapie der β -Hämoglobinkrankheiten

Auch nachdem mit den selbst inaktivierenden lentiviralen Vektoren eine effiziente und hoffentlich sichere Möglichkeit der Transduktion hämatopoetischer Stammzellen zur Verfügung steht, müssen die einzelnen, in ► **Abb. 1** skizzierten Schritte des Gentherapieprozesses jeweils optimiert werden.

Bei den Thalassämien werden für die Mobilisierung von Stammzellen ähnliche Protokolle eingesetzt wie bei der Stammzellmobilisierung aus anderer Indikation. Da allerdings die benötigten Zellzahlen deutlich höher sind als beispielsweise bei einer autologen Stammzellspende zum Rescue nach Hochdosischemotherapie, wird schon a priori die Kombination aus Granulozyten-koloniestimulierendem Faktor (engl. Granulocyte Colony Stimulating Factor, G-CSF) und Plerixafor eingesetzt. So mobilisierte Stammzellen können durch lentivirale Vektoren gut transduziert werden und produzieren mehr β -Globin pro Genkopie als mit anderen Mobilisierungsregimes gewonnene Stammzellen [46]. Bei der Sichelzellerkrankheit ist G-CSF wegen des Risikos vasoookklusiver Komplikationen bei Leukozytose kontraindiziert. Die aus Knochenmark gewinnbare Stammzellmenge und vor allem die Kapazität der daraus gewonnenen Stammzellen zur β -Globin-Synthese ist limitiert [47–49]. Aus diesem Grund wurde zuletzt alleinig Plerixafor zur Mobilisierung eingesetzt [50]. Die so gewonnenen Stammzellen zeigten nach Transduktion eine sehr gute Expression von β -Globin [47].

Um aus Knochenmark genügend Stammzellen für die Transduktion und Reinfusion zu erhalten, waren im Schnitt 2 aufeinanderfolgende Entnahmen notwendig [47]. Dies und vor allem das genannte geringe Transduktionspotenzial von aus Knochenmark gewonnenen Stammzellen gaben den Ausschlag dafür, dass sich die Apherese aus peripherem Blut als Stammzellquelle durchgesetzt hat. Dabei gilt es, die Sammelstrategie an die spezifischen Sedimentationseigenschaften von hämatopoetischen Stammzellen im Blut von Patientinnen und Patienten mit Thalassämie anzupassen und einen deutlich höheren Erythrozytenanteil im Apheresat als sonst üblich zu akzeptieren [50].

Die Transduktion muss bei der „Genaddition“ für die Behandlung der Thalassämie so effizient sein, dass die Mehrzahl der erythropoetischen Vorläufer so viel β -Globin produziert wie unter physiologischen Umständen beide Allele des β -Globin-Genlocus. Liegt ein β^+ -Genotyp mit Restsynthese von β -Globin vor, verringert sich die notwendige Syntheserate der vom Vektor abgeleiteten Genkopie um die der endogenen Allele. In den bisher erfolgreichen Studien zur Gentherapie der Thalassämien zeigte sich, dass die Vektorkopienzahl in den transduzierten Stammzellen direkt proportional zur Vektorkopienzahl im peripheren Blut 6 Monate nach Gentherapie ist [24, 51]. Lag nach Gentherapie weniger als eine Vektorkopie pro Zelle vor, war diese Zahl wiederum näherungsweise proportional zu dem vom Vektor exprimierten Hämoglobin. Eine Steigerung der Vektorkopienzahl auf mehr als eine pro Zelle im peripheren Blut ergab keine weitere Steigerung der Hämoglobinsynthese [24, 51]. Auch um das Risiko der Insertionsmutagenese nicht unnötig zu steigern, kann also eine Vektorkopienzahl im peripheren Blut von 1 pro Zelle als Optimum gelten. Um diese zu erreichen, muss die Transduktionsprozedur durch die Auswahl des geeigneten Hüllproteins, durch die Zugabe von Polykationen, wie beispielsweise Polybren, und durch die Wahl von Vektorzahl, Inkubationsdauer und -bedingungen optimiert werden. Vor dem Einsatz der genmanipulierten Blutstammzellen muss eine stringente Qualitätskontrolle die Viabilität und die erfolgreiche Integration des Vektors in das Wirtsgenom sicherstellen.

Anders als die Gentherapie von schweren Immundefekten wird die Gentherapie der Hämoglobinkrankheiten nicht (bei der Sichelzellerkrankheit) oder nur zu einem geringen Ausmaß (bei der β -Thalassämie) durch einen Selektionsvorteil der manipulierten Zellen begünstigt. Aus diesem Grund kommt der Vorbereitung des Empfängers durch eine Myeloablation eine große Bedeutung zu. Im Gegensatz zur allogenen Stammzelltransplantation kann auf eine Immunoablation durch beispielsweise Serotherapie oder lymphotrope Chemotherapie wie Fludarabin oder Cyclophosphamid vollständig verzichtet werden. In den klinisch erfolgreich eingesetzten Studien wurden entweder Busulfan [24] oder die Kombination aus Treosulfan und Thiotepa [51] in jeweils myeloablativer Dosis eingesetzt. Ein früherer Versuch mit submyeloablativer Busulfan-Dosis war nicht erfolgreich [52]. Die Akuttoxizität der Gentherapie wurde bisher im Wesentlichen durch die Konditionierung bestimmt [24]. Über lebensbedrohliche Akutkomplikationen wie Lebervenenverschlusserkrankungen hinaus kann die Chemokonditionierung auch Spätkomplikationen wie therapieinduzierte Malignome und eine Einschränkung der Fertilität verursachen. Aus diesen Gründen liegt es nahe, alternative toxizitätsreduzierte Konditionierungsregimes zu entwickeln. Präklinisch entwickelte Verfahren sind die Depletion von $CD45^+$ - bzw. $CD117^+$ -Zellen durch toxingekoppelte Immunkonjugate [53, 54]. Von diesem Verfahren kann man sich eine vollständige Myeloablation ohne wesentliche systemische Toxizität erhoffen.

Die bei den meisten Patienten mit Sichelzellerkrankheit vorliegende chronische Gefäßschädigung und das Risiko vaso-okklusiver Krisen erfordern, wie auch vor der allogenen Stammzelltransplantation, besondere Maßnahmen zur Minimierung der Akuttoxizität. Diese umfassen insbesondere eine Austauschtransfusion vor Beginn der Konditionierung, aber auch eine antikonvulsive Prophylaxe [55].

In Analogie zur Stammzelltransplantation werden die manipulierten Stammzellen meist intravenös appliziert [24]. Am Mausmodell ergaben sich Hinweise, dass die Gabe direkt in das Knochenmark zu einem verbesserten „Homing“ mit einem geringeren Verlust von Stammzellen außerhalb des Knochenmarks führt. Auch klinisch wurde diese Methode eingesetzt, möglicherweise mit dem Erfolg einer kürzeren Zeit bis zum Engraftment [51]. An die Reinfusion schließt sich, wie auch nach einer Stammzelltransplantation, eine mehrwöchige Phase der Aplasie mit den entsprechenden infektiösen Risiken ein. In dieser Phase bedürfen diese Patienten einer intensiven Supportivtherapie. Die maximale Expression des therapeutischen Gens ist nach 3–6 Monaten zu erwarten. Der Erfolg der Therapie lässt sich bei der β -Thalassämie zum einen klinisch durch den reduzierten und idealerweise ganz ausbleibenden Transfusionsbedarf messen [24, 51]. Zum anderen exprimieren die eingesetzten Vektoren eine durch Aminosäuresubstitutionen modifizierte β -Globin-Kette, wodurch der Anteil des vom Vektor codierten Hämoglobins im Verhältnis zu endogenem Hämoglobin chromatografisch quantifiziert werden kann. Außerdem verändern diese Mutationen die physikochemischen Eigenschaften der β -Globin-Kette, sodass bei Vorliegen von HbS dessen Polymerisierung inhibiert wird. Dadurch kann bei der Sichelzellerkrankung die Pathophysiologie dieser schweren Multiorganerkrankung günstig beeinflusst werden.

Ergebnisse der bisher klinisch eingesetzten Verfahren der Gentherapie der transfusionsbedürftigen β -Thalassämie und der Sichelzellerkrankheit

Ein erster Patient mit Thalassämie wurde im Jahr 2008 durch eine Gentherapie zwar transfusionsunabhängig, hatte jedoch durch Insertionsmutagenese eine über Jahre persistierende klonale Hämatopoese [56]. In der Folge wurde durch Modifikationen des Vektors das Risiko der Insertionsmutagenese verringert und in bisher 2 Studien ein Erfolg der Gentherapie bei Thalassämien ohne nachweisbare Klonalität der Hämatopoese belegt. Beide wendeten die oben beschriebene Genadditionsstrategie an, entweder durch den von der Firma bluebird bio entwickelten Vektor BB305 [24] oder den Vektor GLOBE [51]. Wesentlicher Prädiktor des Therapieerfolgs waren der Genotyp und das Alter der Patienten.

In der von der Firma bluebird bio initiierten Studie erreichten 12 von 13 Patienten mit einem Non- β^0/β^0 -Genotyp Transfusionsunabhängigkeit bei einem medianen Nachbeobachtungszeitraum von 26 Monaten [24]. Auf der Grundlage dieser Daten erfolgte im Juni 2019 die konditionale Zulassung dieser Therapie für die Non- β^0 -Thalassaemia major für Patientinnen und Patienten mit einem Alter > 12 Jahre, für die kein verwandter HLA-identischer Spender für die Standardtherapie einer allogenen Stammzelltransplantation zur Verfügung steht. Von den 9 Patienten mit β^0/β^0 -Genotyp erreichten nur 3 dieses Ziel, die übrigen aber immerhin eine Reduktion des Transfusionsbedarfs [24]. Allerdings blieb die Vektorkopienzahl pro Zelle in dieser Studie noch deutlich unterhalb der mit verbesserten Transduktionsmethoden erreichbaren Schwelle von 1 im peripheren Blut. Erste Ergebnisse einer Nachfolgestudie

► **Tab. 1** Aktuelle Gentherapiestudien der β -Hämoglobinkrankheiten (Daten nach <https://www.clinicaltrials.gov>).

Gentherapieprodukt/ Studiennummer	entwickelnde Firma	Indikation	Therapiestrategie
Zynteglo (LentiGlobin)/ NCT03207009 NCT02906202 NCT02151526	bluebird bio	β -Thalassämie, Sichelzellerkrankheit	Genaddition mit einem lentiviralen β -Globin-Genvektor
CTX-001/NCT03655678	CRISPR Therapeutics	β -Thalassämie, Sichelzellerkrankheit	Geneditierung mittels gRNA/Cas9 zur Reaktivierung der fetalen Globinexpression durch Inaktivierung von BCL11A
OTL-300/NCT03275051	Orchard Therapeutics	β -Thalassämie	Genaddition mit einem lentiviralen β -Globin-Genvektor
ST-400/NCT03432364	Sangamo Therapeutics	β -Thalassämie	Geneditierung durch Zinc-finger Nuclease (ZFN) zur Reaktivierung der fetalen Globinexpression durch Inaktivierung von BCL11A
BIVV003 (PRECI2N-1) NCT03653247	Bioerativ/Sanofi	Sichelzellerkrankheit	Geneditierung durch Zinc-finger Nuclease (ZFN) zur Reaktivierung der fetalen Globinexpression durch Inaktivierung von BCL11A
BCL11A shRNA NCT03282656	Boston Children's Hospital	Sichelzellerkrankheit	Transkriptomeditierung mittels Transduktion eines lentiviralen Vektors mit einer shRNA zur Reaktivierung der fetalen Globinexpression durch Inaktivierung der BCL11A-mRNA

legen nahe, dass mit einer optimierten Transduktionsmethode auch die Mehrzahl der Patienten mit β^0/β^0 -Genotyp Transfusionsunabhängigkeit erreicht [57].

In der Studie mit dem GLOBE-Vektor erreichten 3 von 4 behandelten Kindern, aber keiner der 3 behandelten Erwachsenen Transfusionsunabhängigkeit. Allerdings hatte lediglich einer der behandelten Patienten einen β^+ -Genotyp mit relevanter β -Globin-Restsynthese, dieser benötigte nach Gentherapie keine Transfusionen mehr. Den Unterschied zwischen Kindern und Erwachsenen im Behandlungserfolg führen die Autoren auf eine mögliche Schädigung der Stammzellnische mit dem Alter und durch die über Jahrzehnte bestehende Transfusionstherapie zurück [51].

Bei der Sichelzellerkrankheit wird der Erfolg der Gentherapie nicht an der Transfusionsbedürftigkeit gemessen, sondern an der Reduktion von Komplikationen, insbesondere vaso-okklusiver Schmerzkrisen und des akuten Thoraxsyndroms. In Analogie zu Patienten mit gemischter Heterozygotie für die HbS-Mutation und eine HPFH-Mutation ist Symptomfreiheit zu erwarten, wenn in allen Erythrozyten ein Anteil von mindestens 30% HbF oder eines ähnlich wirksam die HbS-Polymerbildung unterbindenden β -Globin-Derivats erreicht wird [10]. Dieses Ziel wurde bei dem ersten, analog zur Thalassämie durch Genaddition mittels des lentiviralen BB305-Vektors behandelten Patienten erreicht [25]. Bei weiteren Patienten blieb zunächst die Vektorkopienzahl und damit die Expression des „Anti-sickling“-Hämoglobins zu gering, um einen Erfolg zu demonstrieren [47]. Ähnlich wie bei den Versuchen zur Gentherapie bei Thalassämien wurde auch für die Gentherapie der Sichelzellerkrankheit das Protokoll an mehreren Stellen optimiert. Durch die Verwendung von durch Plerixafor mobilisierten Stammzellen aus dem peripheren Blut und durch eine verbesserte Transduktionseffizienz wurde bei der Gruppe der jüngst behandelten Patienten ein panzellulär verteilter Anteil von etwa 6 g/dl des vom Vektor exprimierten Hämoglobins erreicht. Korrespondierend dazu normalisierten sich die Hämolyseparameter und reduzierte sich die Häufigkeit vaso-okklusiver Komplikationen [47].

Noch nicht klinisch erprobte Methoden: Gentherapie durch Geneditierung

In der präklinischen und teils auch klinischen Erprobung befinden sich aktuell auch sogenannte Genomeditierungsstrategien, die darauf zielen, Gene des Wirtsgenoms gezielt zu modifizieren (► **Tab. 1**). Ergebnisse von so behandelten Patienten wurden bisher jedoch noch nicht publiziert.

Die direkte Korrektur von Mutationen im β -Globin ist wenig praktikabel, weil im β -Globin-Gen über 300 Thalassämie Mutationen beschrieben sind, für die jeweils eigene Korrekturmethode benötigt würden. Obendrein ist die Inaktivierung eines Gens technisch einfacher und effizienter als die gezielte Reparatur. Deshalb beziehen sich alle in Erprobung befindlichen Methoden auf die Reaktivierung der Synthese des fetalen Hämoglobins, des HbF. Die direkteste dieser Methoden ist die Einführung von Mutationen im γ -Globin-Promotor, die die Expression von γ -Globin reaktivieren [58]. Auch durch die Expression eines Fusionsproteins aus dem für die Interaktion der Locuskontrollregion (LCR) mit dem γ -Globin-Promotor notwendigen Ldb1 mit einem Zinkfinger-Protein kann die HbF-Synthese angeschaltet werden, indem die LCR in direkte Nachbarschaft des γ -Globin-Gens gezwungen wird [59].

Häufiger als der β -Globin-Locus selbst ist das BCL11A-Gen die Zielstruktur der Editierung. BCL11A codiert für einen Transkriptionsfaktor, der im Verlauf des perinatalen Hämoglobinschaltmechanismus das fetale γ -Globin-Gen und damit die HbF-Synthese inaktiviert [60]. Eine Inaktivierung des BCL11A-Gens in erythroiden Vorläuferzellen führt daher zu einer Steigerung der von den endogenen γ -Globin-Genen gesteuerten HbF-Synthese. Wie sich bei Patienten mit einer hereditären Persistenz der fetalen Hämoglobinsynthese (HPFH) zeigt, ist das fetale Hämoglobin auch im Erwachsenenalter nahezu vollständig funktional [9]. Diese indirekte Strategie zur therapeutischen Modifikation der Globinkettensynthese erscheint daher als vielversprechende Option

für diese Patientengruppe und könnte grundsätzlich sowohl die Thalassämie als auch Sichelzellerkrankheit heilen [61].

Für die Inaktivierung des BCL11A-Gens sind mehrere Strategien im Rennen. Eine dieser Strategien nutzt Komponenten eines bakteriellen, gewissermaßen adaptiven Immunsystems, mit dem Bakterien DNA-Sequenzen von Bakteriophagen (wieder-)erkennen und abbauen können [62]. Dieses auch als CRISPR/Cas9 bezeichnete System rekrutiert durch spezifizierte Guide RNA (gRNA) die Endonuklease Cas9 an bestimmbare Stellen des Genoms. Das Enzym Cas9 führt dann zu Doppelstrangbrüchen der DNA, die durch nicht homologe Endverknüpfung (engl. Nonhomologous End Joining, NHEJ) wieder repariert wird. Allerdings ist dieser Reparaturprozess nicht präzise und führt an dem Bruchpunkt kleine Insertionen oder kleine Deletionen der DNA ein. Durch diese kleinen Fehler kann das getroffene Gen gezielt inaktiviert werden [63, 64]. Wird auf diese Art BCL11A in hämatopoetischen Stammzellen inaktiviert, resultiert in den daraus abgeleiteten erythropoetischen Vorläufern eine starke Induktion von HbF [65, 66].

Eine alternative Technik zur gezielten Einführung eines gezielten Doppelstrangbruchs in die DNA kann durch Nukleasen erfolgen, die sich direkt und ohne Vermittlung einer spezifischen RNA:DNA-Basenpaarung (wie oben für das gRNA/Cas9-System beschrieben) an spezifische Positionen der DNA binden können. Die Doppelstrangbrüche, die aus der Aktivität solcher Transcription-Activator-like-Effector-Nukleasen (TALEN) genannten Enzyme resultieren, werden dann ähnlich wie beim CRISPR/Cas9-System durch NHEJ unpräzise und mit Hinterlassung von kleinen inaktivierenden Deletionen oder Insertionen repariert. BCL11A kann gezielt in erythroiden Zellen ausgeschaltet werden, indem solche Nukleasen gegen einen linienspezifischen Enhancer gerichtet werden [67].

Ein alternativer und sich in klinischer Erprobung befindlicher Ansatz besteht in der Expression von sogenannten Short Hairpin RNAs (shRNA), die nach lentiviralem Transfer spezifisch in erythroiden Stammzellen exprimiert werden. Diese shRNAs führen über spezifische Basenpaarung zu einem Abbau von Target-Transkripten und somit zu einer gezielten Verminderung der Expression definierter Gene. Diese Strategie wird aktuell für die Behandlung der Sichelzellerkrankung erprobt, bei der CD34⁺-Zellen mit Lentiviren transduziert werden, die shRNAs gegen das BCL11A-Gen enthalten. Dadurch wird die Verfügbarkeit der BCL11A-RNA limitiert, die Proteinbiosynthese dieses Inhibitors der γ -Globin-Genexpression herunterreguliert und damit die HbF-Synthese gesteigert [68]. Auch wenn es sich bei dieser Methode streng genommen um eine „Transkriptomeditierung“, nicht um eine „Genomeditierung“, handelt, sollte der Effekt derselbe sein.

Grundsätzlich kann über Homologe-Reparatur (engl. Homology-directed Repair, HDR) auch ein definiertes DNA-Fragment, z. B. ein therapeutisches Genfragment, an einer definierten Stelle eingefügt werden, sodass Mutationen prinzipiell auch im engeren Sinne des Wortes repariert werden können. Während diese Strategie aktuell z. B. bei Immundefekten und zum Engineering von T-Zellen-Rezeptoren für die Behandlung von Leukämien entwickelt wird, ist sie wegen der geringen Effizienz des HDR in hämatopoetischen Stammzellen für die Hämoglobinkerkrankheiten aktuell noch nicht in der klinischen Entwicklung.

Auch eine Kombination mehrerer Strategien – beispielsweise Addition des β -Globin-Gens durch lentivirale Vektoren plus shRNA-medierte Repression von BCL11A durch denselben Vektor – ist denkbar. Dadurch könnte die Effizienz der Gentherapie so weit gesteigert werden, dass die Erfolgsrate zuverlässig höher als bei der allogenen Stammzelltransplantation liegt.

Ausblick

Aktuell wird als Therapiestandard für die transfusionsbedürftige β -Thalassämie und die Sichelzellerkrankheit eine krankheitsmodifizierende Therapie mittels Erythrozytentransfusionen, pharmakologischer Beeinflussung der HbF-Synthese, Eisenelimination sowie eine Behandlung von Therapiekomplicationen eingesetzt. Die einzige kurative Option besteht aktuell in der Durchführung einer allogenen Stammzelltransplantation, die allerdings mit einer therapiebedingten Morbidität – insbesondere der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl. Graft-versus-Host Disease, GvHD) –, aber auch mit einer therapiebedingten Mortalität in der Größenordnung von bis etwa 10% einhergeht [22, 55, 69, 70]. Während diese Komplikationsrate für die Behandlung maligner Erkrankungen unter Umständen akzeptabel sein kann, stellt sie für die Behandlung einer akut nicht lebensbedrohlichen Erkrankung eine konzeptionelle Herausforderung dar. Aus diesen Gründen verspricht die Entwicklung der Gentherapie für die Hämoglobinkerkrankheiten eine relevante Chance für Patientinnen und Patienten mit diesen schweren und sowohl Lebensqualität als auch Lebenserwartung erheblich einschränkenden Erkrankungen.

Literatur

- [1] Piel FB, Tatem AJ, Huang Z et al. Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *Lancet Glob Health* 2014; 2: e80–e89. doi:10.1016/s2214-109x(13)70150-5
- [2] Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ* 2008; 86: 480–487
- [3] Piel FB, Hay SI, Gupta S et al. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010–2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *PLoS Med* 2013; 10: e1001484. doi:10.1371/journal.pmed.1001484
- [4] Kunz JB, Cario H, Grosse R et al. The epidemiology of sickle cell disease in Germany following recent large-scale immigration. *Pediatr Blood Cancer* 2017. doi:10.1002/pbc.26550
- [5] Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia. *Lancet* 2018; 391: 155–167. doi:10.1016/S0140-6736(17)31822-6
- [6] Baronciani D, Angelucci E, Potschger U et al. Hemopoietic stem cell transplantation in thalassemia: a report from the European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation Hemoglobinopathy Registry, 2000–2010. *Bone Marrow Transplant* 2016; 51: 536–541. doi:10.1038/bmt.2015.293
- [7] Angelucci E, Matthes-Martin S, Baronciani D et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. *Haematologica* 2014; 99: 811–820. doi:10.3324/haematol.2013.099747
- [8] Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010; 376: 2018–2031. doi:10.1016/S0140-6736(10)61029-X

- [9] Forget BG. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850: 38–44
- [10] Steinberg MH, Chui DH, Dover GJ et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: a glass half full? *Blood* 2014; 123: 481–485. doi:10.1182/blood-2013-09-528067
- [11] Serjeant GR. Mortality from sickle cell disease in Africa. *BMJ* 2005; 330: 432–433. doi:10.1136/bmj.330.7489.432
- [12] Quinn CT, Rogers ZR, McCavit TL et al. Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. *Blood* 2010; 115: 3447–3452. doi:10.1182/blood-2009-07-233700
- [13] Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; 330: 1639–1644. doi:10.1056/NEJM199406093302303
- [14] Ngo S, Bartolucci P, Lobo D et al. Causes of Death in Sickle Cell Disease Adult Patients: Old and New Trends. *Blood* 2014; 124: 2715–2715
- [15] Ataga KI, Kutlar A, Kanter J et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2017; 376: 429–439. doi:10.1056/NEJMoa1611770
- [16] Telen MJ, Wun T, McCavit TL et al. Randomized phase 2 study of GMI-1070 in SCD: reduction in time to resolution of vaso-occlusive events and decreased opioid use. *Blood* 2015; 125: 2656–2664. doi:10.1182/blood-2014-06-583351
- [17] Wang WC, Ware RE, Miller ST et al. Hydroxycarbamide in very young children with sickle-cell anaemia: a multicentre, randomised, controlled trial (BABY HUG). *Lancet* 2011; 377: 1663–1672. doi:10.1016/S0140-6736(11)60355-3
- [18] Howard J, Hemmaway CJ, Telfer P et al. A phase 1/2 ascending dose study and open-label extension study of voxelotor in patients with sickle cell disease. *Blood* 2019. doi:10.1182/blood-2018-08-868893; blood-2018-2008-868893. doi:10.1182/blood-2018-08-868893
- [19] Niihara Y, Miller ST, Kanter J et al. A Phase 3 Trial of L-Glutamine in Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2018; 379: 226–235. doi:10.1056/NEJMoa1715971
- [20] Cario H, Grosse R, Jarisch A, Kulozik AE, Kunz JB, Lobitz S. AWMF-Leitlinie 025/016 Sichelzellerkrankheit. 2014. Im Internet: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-016l_S2k_Sichelzellerkrankheit_2014-12_verlaengert.pdf; Stand: 04.07.2019
- [21] Cappelli B, Volt F, Tozatto-Maio K et al. Risk factors and outcomes according to age at transplantation with an HLA-identical sibling for sickle cell disease. *Haematologica* 2019. doi:10.3324/haematol.2019.216788. doi:10.3324/haematol.2019.216788
- [22] Foell J, Schulte JH, Pfistering B et al. Haploidentical CD3 or alpha/beta T-cell depleted HSCT in advanced stage sickle cell disease. *Bone Marrow Transplant* 2019. doi:10.1038/s41409-019-0550-0
- [23] Foell J, Pfistering B, Rehe K et al. Haploidentical stem cell transplantation with CD3(+)/CD19(-) depleted peripheral stem cells for patients with advanced stage sickle cell disease and no alternative donor: results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 2017; 52: 938–940. doi:10.1038/bmt.2017.49
- [24] Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J et al. Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent beta-Thalassemia. *N Engl J Med* 2018; 378: 1479–1493. doi:10.1056/NEJMoa1705342
- [25] Ribeil JA, Hacein-Bey-Abina S, Payen E et al. Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med* 2017; 376: 848–855. doi:10.1056/NEJMoa1609677
- [26] Andreani M, Testi M, Gaziev J et al. Quantitatively different red cell/nucleated cell chimerism in patients with long-term, persistent hematopoietic mixed chimerism after bone marrow transplantation for thalassemia major or sickle cell disease. *Haematologica* 2011; 96: 128–133. doi:10.3324/haematol.2010.031013
- [27] Maniatis T, Kee SG, Efstratiadis A et al. Amplification and characterization of a beta-globin gene synthesized in vitro. *Cell* 1976; 8: 163–182
- [28] Kolata GB, Wade N. Human gene treatment stirs new debate. *Science* 1980; 210: 407
- [29] 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
- [30] 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
- [31] Aiuti A, Slavin S, Aker M et al. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 2002; 296: 2410–2413. doi:10.1126/science.1070104
- [32] 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
- [33] Thrasher AJ, Williams DA. Evolving Gene Therapy in Primary Immunodeficiency. *Mol Ther* 2017; 25: 1132–1141. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.018
- [34] Boztug K, Schmidt M, Schwarzwaelder A et al. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* 2010; 363: 1918–1927. doi:10.1056/NEJMoa1003548
- [35] Braun CJ, Boztug K, Paruzynski A et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome—long-term efficacy and genotoxicity. *Sci Transl Med* 2014; 6: 227ra233. doi:10.1126/scitranslmed.3007280
- [36] Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S et al. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* 2010; 16: 198–204. doi:10.1038/nm.2088
- [37] 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. doi:10.1172/JCI35798
- [38] Deichmann A, Brugman MH, Bartholomae CC et al. Insertion sites in engrafted cells cluster within a limited repertoire of genomic areas after gammaretroviral vector gene therapy. *Mol Ther* 2011; 19: 2031–2039. doi:10.1038/mt.2011.178
- [39] Biasco L, Rothe M, Buning H et al. Analyzing the Genotoxicity of Retroviral Vectors in Hematopoietic Cell Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018; 8: 21–30. doi:10.1016/j.omtm.2017.10.002
- [40] Cavazza A, Moiani A, Mavilio F. Mechanisms of retroviral integration and mutagenesis. *Hum Gene Ther* 2013; 24: 119–131. doi:10.1089/hum.2012.203
- [41] Payen E, Colomb C, Negre O et al. Lentivirus vectors in beta-thalassemia. *Methods Enzymol* 2012; 507: 109–124. doi:10.1016/B978-0-12-386509-0.00006-5
- [42] Thornhill SI, Schambach A, Howe SJ et al. Self-inactivating gammaretroviral vectors for gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Mol Ther* 2008; 16: 590–598. doi:10.1038/sj.mt.6300393
- [43] Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 2018; 32: 1529–1541. doi:10.1038/s41375-018-0106-0
- [44] Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 2013; 341: 1233151. doi:10.1126/science.1233151
- [45] Lidonnici MR, Paleari Y, Tiboni F et al. Multiple Integrated Non-clinical Studies Predict the Safety of Lentivirus-Mediated Gene Therapy for beta-Thalassemia. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2018; 11: 9–28. doi:10.1016/j.omtm.2018.09.001
- [46] Karponi G, Psatha N, Lederer CW et al. Plerixafor+G-CSF-mobilized CD34+ cells represent an optimal graft source for thalassemia gene therapy. *Blood* 2015; 126: 616–619. doi:10.1182/blood-2015-03-629618
- [47] Kanter J, Walters MC, Hsieh M et al. Interim Results from a Phase 1/2 Clinical Study of Lentiglobin Gene Therapy for Severe Sickle Cell Disease. *Blood* 2017; 130: 527–527

- [48] Uchida N, Fujita A, Hsieh MM et al. Bone Marrow as a Hematopoietic Stem Cell Source for Gene Therapy in Sickle Cell Disease: Evidence from Rhesus and SCD Patients. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2017; 28: 136–144. doi:10.1089/humc.2017.029
- [49] Leonard A, Bonifacino A, Dominical VM et al. Bone marrow characterization in sickle cell disease: inflammation and stress erythropoiesis lead to suboptimal CD34 recovery. *Br J Haematol* 2019. doi:10.1111/bjh.15902
- [50] Esrick EB, Manis JP, Daley H et al. Successful hematopoietic stem cell mobilization and apheresis collection using plerixafor alone in sickle cell patients. *Blood Adv* 2018; 2: 2505–2512. doi:10.1182/bloodadvances.2018016725
- [51] Marktel S, Scaramuzza S, Cicalese MP et al. Intrabone hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent α -thalassaemia. *Nat Med* 2019; 25: 234–241. doi:10.1038/s41591-018-0301-6
- [52] Mansilla-Soto J, Riviere I, Boulad F et al. Cell and Gene Therapy for the Beta-Thalassaemias: Advances and Prospects. *Hum Gene Ther* 2016; 27: 295–304. doi:10.1089/hum.2016.037
- [53] Czechowicz A, Palchaudhuri R, Scheck A et al. Selective hematopoietic stem cell ablation using CD117-antibody-drug-conjugates enables safe and effective transplantation with immunity preservation. *Nat Commun* 2019; 10: 617. doi:10.1038/s41467-018-08201-x
- [54] Palchaudhuri R, Saez B, Hoggart J et al. Non-genotoxic conditioning for hematopoietic stem cell transplantation using a hematopoietic-cell-specific internalizing immunotoxin. *Nat Biotechnol* 2016; 34: 738–745. doi:10.1038/nbt.3584
- [55] Bernaudin F, Socie G, Kuentz M et al. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood* 2007; 110: 2749–2756. doi:10.1182/blood-2007-03-079665
- [56] Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O et al. Transfusion independence and HMG2A activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 2010; 467: 318–322. doi:10.1038/nature09328
- [57] Kulozik AE, Locatelli F, Yannaki E, Porter JB, Thuret I, Sauer MG, Lal A, Kwiatkowski JL, Elliot H, Tao G, Colvin RA, Thompson AA. Results from the Phase 3 Northstar-3 Study Evaluating Lentiglobin Gene Therapy in Patients with Transfusion-Dependent β -thalassaemia and a B0 or IVS-I-110 mutation at both alleles of the HBB Gene EHA. Oral presentation 2019. Im Internet: <https://library.ehaweb.org/eha/2019/24th/267341/andreas.e.kulozik.results.from.the.phase.3.northstar-3.study.evaluating.html?f=listing%3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2Asearch%3Dhgb-212; Stand: 04.07.2019>
- [58] Traxler EA, Yao Y, Wang YD et al. A genome-editing strategy to treat beta-hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. *Nat Med* 2016; 22: 987–990. doi:10.1038/nm.4170
- [59] Breda L, Motta I, Lourenco S et al. Forced chromatin looping raises fetal hemoglobin in adult sickle cells to higher levels than pharmacologic inducers. *Blood* 2016; 128: 1139–1143. doi:10.1182/blood-2016-01-691089
- [60] Orkin SH, Bauer DE. Emerging Genetic Therapy for Sickle Cell Disease. *Annu Rev Med* 2019; 70: 257–271. doi:10.1146/annurev-med-041817-125507
- [61] 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. doi:10.1126/science.1211053
- [62] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 2014; 346: 1258096. doi:10.1126/science.1258096
- [63] Gundry MC, Brunetti L, Lin A et al. Highly Efficient Genome Editing of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9. *Cell Rep* 2016; 17: 1453–1461. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.092
- [64] Vierstra J, Reik A, Chang KH et al. Functional footprinting of regulatory DNA. *Nat Methods* 2015; 12: 927–930. doi:10.1038/nmeth.3554
- [65] Canver MC, Smith EC, Sher F et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature* 2015; 527: 192–197. doi:10.1038/nature15521
- [66] 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. doi:10.1126/science.1242088
- [67] Chang KH, Smith SE, Sullivan T et al. Long-Term Engraftment and Fetal Globin Induction upon BCL11A Gene Editing in Bone-Marrow-Derived CD34(+) Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2017; 4: 137–148. doi:10.1016/j.omtm.2016.12.009
- [68] Brendel C, Guda S, Renella R et al. Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. *J Clin Invest* 2016; 126: 3868–3878. doi:10.1172/jci87885
- [69] Gluckman E, Cappelli B, Bernaudin F et al. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2017; 129: 1548–1556. doi:10.1182/blood-2016-10-745711
- [70] Locatelli F, Kabbara N, Ruggeri A et al. Outcome of patients with hemoglobinopathies given either cord blood or bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Blood* 2013; 122: 1072–1078. doi:10.1182/blood-2013-03-489112