

## Beta thalassemia gene therapy using lentiviral vectors

Mohammad Ali Khosravi<sup>1</sup>, Maryam Abbasalipour<sup>1</sup>, Sirous Zeinali<sup>2</sup>, Morteza Karimipoor<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PhD of Medical Biotechnology, Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Molecular Medicine, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Tehran, Iran

### Abstract

Recent years, allogeneic bone marrow transplantation (BMT) has proved to be the successful cure for patients with thalassemia major, however this is restricted due to limited matched-related donor. Its complications include chronic graft-versus-host disease in 5-8% of patients. So, a molecular approach, such as gene therapy for direct normal beta globin gene transmission, seems quite promising to cure thalassemia. The goal of beta thalassemia gene therapy is to restore normal RBC production capacity in patients by suitable vector and correct inherited anemia. Virus therapy has recently been recognized as a promising new therapeutic approach in medical research. In this regard, the use of viruses as non-replicating gene therapy vectors or as replication viruses (oncolytic viruses) has provided attractive opportunities for viral therapy applications. Currently viral vectors have been used in nearly 70% of the clinical trials. In recent years, many researchers have designed erythroid-specific lentiviral vectors carrying the beta-globin gene that have obtained significant results. Their findings are presented in this study.

**Keywords:** *Beta- thalassemia, Gene therapy, Lentiviral vector.*

**Cited as:** Khosravi MA, Abbasalipour M, Zeinali S, Karimipoor M. Beta thalassemia gene therapy using lentiviral vectors. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2020; 30(4): **341-351**.

**Correspondence to:** Morteza Karimipoor

**Tel:** +98 02166402751

**E-mail:** mortezakarimi@yahoo.com

**ORCID ID:** 0000-0002-2406-5963

**Received:** 1 Sep 2019; **Accepted:** 27 Jun 2020

## ژن درمانی بتاتالاسمی توسط وکتورهای لنتی ویروسی

محمدعلی خسروی<sup>۱</sup>، مریم عباسعلی پور<sup>۱</sup>، سیروس زینلی<sup>۲</sup>، مرتضی کریمی پور<sup>۳</sup><sup>۱</sup> دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، گروه پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور تهران، ایران<sup>۲</sup> استاد، گروه پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور تهران، ایران<sup>۳</sup> دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور تهران، ایران

## چکیده

در حال حاضر تنها درمان موثر بیماری بتاتالاسمی، پیوند مغزاستخوان آلوژنیک در افراد بیمار است. بزرگ‌ترین محدودیت انجام این روش کمبود دهنده پیوند با آنتی ژن سازگار بافتی مشابه در اکثر موارد است. از عوارض شایع آن می‌توان به بیماری مزمن پیوند علیه میزبان در ۸-۵٪ از بیماران اشاره داشت. در روش درمانی متداول برای درمان بیماری‌های ارثی، انتقال یک یا چند ژن برای جبران عملکرد ژن معیوب به کار می‌رود. بنابراین کلید اصلی در ژن درمانی موفق در استفاده از تکنیک انتقال مناسب ژن به سلول‌های هدف در بافت‌های انسانی است؛ در نتیجه هدف ژن درمانی در درمان بیمار بتاتالاسمی بازگرداندن توانایی و ظرفیت تولید گلبول قرمز حاوی هموگلوبین نرمال و سالم در افراد بیماری است که تولید اریتروسیت ناکارآمد را کاهش داده و بیماری کم خونی ارثی را درمان می‌کند. امروزه استفاده از ویروس‌ها به عنوان ابزار درمانی وارد مرحله جدیدی شده است. در این راستا استفاده از ویروس‌ها، به صورت ویروس‌های غیرهمانند سازی کننده به عنوان وکتورهای ژن درمانی و یا به صورت ویروس‌های همانندسازی کننده (ویروس‌های انکولیتیک)، زمینه جالب توجهی تحت عنوان ویروس درمانی را به وجود آورده است. در حال حاضر، تقریباً ۷۰٪ کارآزمایی‌های بالینی ژن‌درمانی از وکتورهای ویروسی استفاده کرده‌اند. در چند سال اخیر محققان زیادی، وکتورهای لنتی ویروسی مختص رده اریتروئیدی، حامل ژن بتاگلوبین طراحی کرده‌اند که نتایج درمانی رضایت‌بخشی از تزریق سلول‌های بنیادی خون‌ساز به صورت *ex vivo* و *in vitro* به دست آورده‌اند که در این مطالعه نتایج این تحقیقات ارائه می‌شود.

واژگان کلیدی: بتاتالاسمی، ژن درمانی، وکتورهای لنتی ویروسی.

## مقدمه

سازهای اریتروئیدی را مختل می‌کنند و منجر به آسیب غشا سلولی می‌شوند؛ بنابراین به مرگ این سلول‌ها می‌انجامد و این به نوبه خود گلبول‌های قرمز ناکارآمد تولید می‌کند. تولید گلبول‌های قرمز ناکارآمد منجر به مشکلات ثانویه‌ای در استخوان‌ها و دیگر اعضای بدن می‌شود. در واقع شدت و بروز علائم بالینی این بیماری به میزان عدم تعادل بین زنجیره‌های آلفا و بتا بستگی دارد (۲). از بین ۲۷۰ میلیون نفر که ناقل اختلالات هموگلوبین هستند، ۸۰ میلیون آنها ناقلین بیماری بتا تالاسمی هستند (۳، ۴). در کل برآورد شده که حدود ۴/۵٪ از جمعیت جهان حامل موتاسیون‌های بتا تالاسمی هستند (۵) و بیشترین شیوع آن در منطقه مدیترانه، آسیای مرکزی، خاورمیانه و شبه قاره هند است. علت شیوع بیماری‌های اختلال هموگلوبین نسبت به

بتا تالاسمی یکی از بیماری‌های ارثی خونی است که بیش از ۳۰۰ موتاسیون در ژن بتا گلوبین در ایجاد آن دخیل است (۱). بتا تالاسمی به علت کاهش یا فقدان سنتز زنجیره‌های بتاگلوبین ایجاد می‌شود. در این بیماری، تولید ناکافی مولکول‌های بتاگلوبین منجر به بالا رفتن میزان زنجیره‌های آلفا گلوبین جفت نشده می‌شود. این زنجیره‌ها در پیش سازهای اریتروئید رسوب کرده و این رسوبات بلوغ پیش

آدرس نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه پزشکی مولکولی، انستیتوپاستور تهران،

مرتضی کریمی پور (email: mortezakarimi@yahoo.com)

ORCID ID: 0000-0002-2406-5963

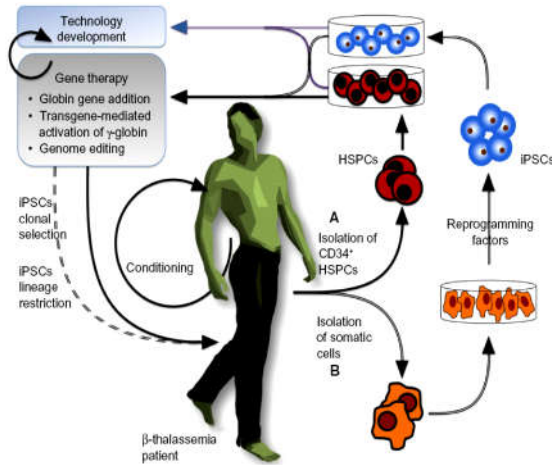
تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۶/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۸/۱۱/۷

دیده شده است. تحقیقات بسیاری نشان داده است که بالا رفتن تولید هموگلوبین جنینی (HbF) به دلیل ایجاد توازن بین زنجیره آلفا و غیر آلفا و جلوگیری از رسوب زنجیره آلفا، قادر به بهبود قابل توجهی در شدت این بیماری‌ها و بروز فنوتیپ ملایم‌تر از بیماری می‌شود (۱۶).

### ژن درمانی

ژن درمانی تکنیکی است که با استفاده از ابزارهای مهندسی ژنتیک، ژنوم فرد بیمار به منظور درمان دستخوش دستکاری قرار می‌گیرد. در ژن درمانی ممکن است سه حالت رخ دهد: ژن معیوب با ژن سالم جایگزین گردد، ژن معیوب خاموش گردد و یا اینکه به منظور درمان، ژن جدیدی به بدن فرد وارد شود. دیدگاه کلی در ژن درمانی بتا تالاسمی به این صورت است که سلول‌های بنیادی خونساز با مارکر سطحی CD34 به طور مستقیم به روش ژن درمانی تصحیح می‌شوند. روش دیگر اینکه سلول‌های سوماتیک جدا می‌شوند و به حالت چند توانه دوباره برنامه‌ریزی reprogrammed می‌شوند. ژن درمانی روی سلول‌های iPS تولید شده انجام و دوباره به دودمان اختصاصی متمایز می‌شود. در هر دو حالت سلول‌ها به بدن بیمار برگردانده می‌شوند (شکل ۱).



شکل ۱. دیدگاه کلی در ژن درمانی بتا تالاسمی. سلول‌های بنیادی و پیش ساز (HSPCs) یا سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده (iPSCs) می‌توانند هدف روش‌های ژن درمانی باشند (A). معمولاً از سلول‌های CD34+ فرد بیمار جهت ژن‌درمانی استفاده می‌شود. این سلول‌ها به طور مستقیم دستخوش دستکاری ژنتیکی قرار گرفته و به بدن فرد برگردانده می‌شوند (B).

ممکن است از سلول‌های سوماتیک بدن فرد بیمار استفاده شود و در ابتدا reprogramming در مورد این سلول‌ها صورت

سایر بیماری‌های مونوزنیک به دلیل انتخاب طبیعی ناشی از مقاومت نسبی ناقلین این بیماری‌ها به مالاریا (پلاسمودیوم فالسیپاروم) و درصد بالای ازدواج‌های فامیلی است (۴، ۸-۶). در منطقه مدیترانه شرقی، ایران با جمعیتی بیش از ۲۳ هزار بیمار بتا تالاسمی یکی از مراکز شایع این بیماری است (۹).

### روش‌های درمان

#### تزریق خون

یکی از درمان‌های اصلی برای بیماران کم خونی بتا تالاسمی، تزریق خون هر ۲ تا ۵ هفته است. سطح هموگلوبین بین ۹ تا ۱۰ g/dl برای ممانعت از خون‌سازی توسط سلول‌های خون‌ساز بیمار و رشد و نمو طبیعی بیمار کافی است. افزایش سطح هموگلوبین به بالاتر از این حد منجر به بالا رفتن بیش از حد آهن در خون می‌شود که یکی از بزرگ‌ترین مشکلات درمان از طریق انتقال خون است (۴، ۱۰، ۱۱).

#### شلاسیون

از این ترکیبات برای حذف آهن حاصل از تزریق مکرر خون در بیماران تالاسمی استفاده می‌شود. یکی از شلاتورهای رایج دسفریوکسامین است که قابلیت زیادی در درمان تالاسمی، از بین بردن سمیت خون و افزایش طول عمر بیمار دارد (۱۱، ۱۲).

#### پیوند مغز استخوان

در حال حاضر بهترین و امیدوارکننده‌ترین روش درمان، پیوند مغز استخوان است، اما موانع موجود در این مسیر، شامل تهاجمی بودن آن، تطبیق آنتی ژن سازگار بافتی بین گیرنده و دهنده پیوند و نیاز به استفاده طولانی مدت از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی (Immunosuppressive Drug) برای جلوگیری یا درمان بیماری پیوند علیه میزبان (Graft versus host disease)، استفاده از این روش درمانی را محدود کرده است (۱۱).

#### القاء هموگلوبین جنینی

شواهدی طبیعی دال بر همبستگی بین کاهش علائم بیماری و سطح بالای HbF وجود دارد. کودکان مبتلا به بیماری کم خونی داسی در ابتدای تولد علائمی از بیماری نشان نمی‌دهند و علت آن بالا بودن هموگلوبین جنینی در بدو تولد است (۱۳). از طرف دیگر جمعیت‌های خاصی در عربستان سعودی و هند با بیماری کم خونی داسی هستند که شدت کم علائم بالینی دارند که پس از بررسی به سطح بالای HbF در آنها پی بردند (۱۴، ۱۵). مشاهدات مشابهی در بیماران با بتا تالاسمی

می‌گیرد و iPSCs حاصل شده برای ژن درمانی بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد.

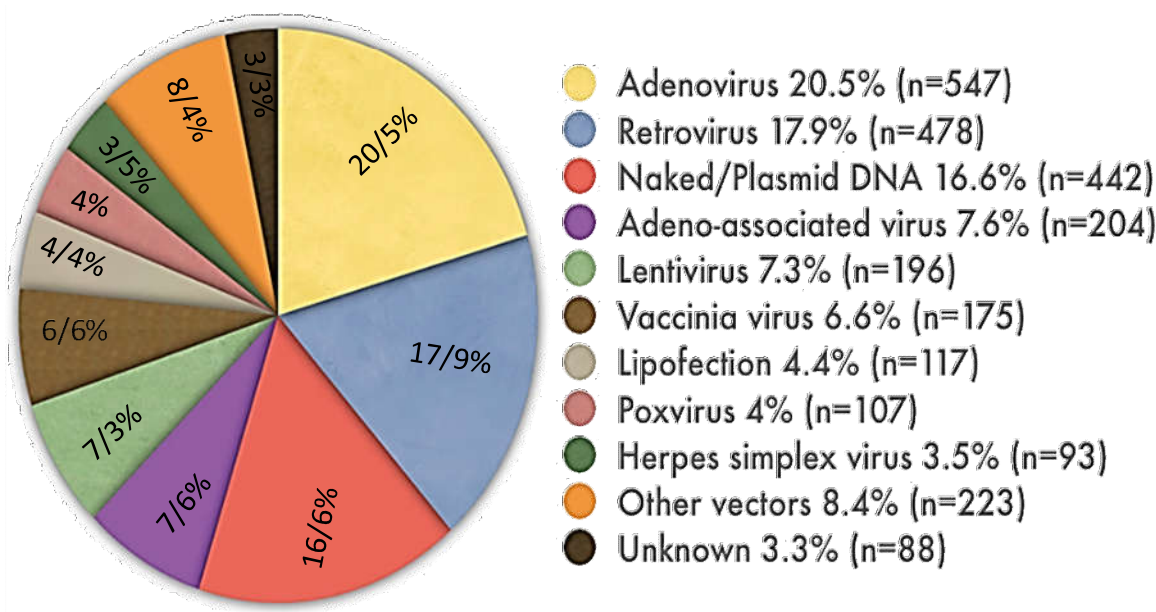
کاربرد iPSCs جهت درمان بیماران هنوز در حال بررسی است که با نقطه چین مشخص شده است (۱۷).

وکتورهای مختلفی (ویروسی و غیرویروسی) در ژن‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این وکتورها جهت رساندن ژن‌های درمانی باید واجد معیارهای معینی از جمله تولید و تجویز آسان، قابلیت رساندن ژن به سلول‌های مورد نظر، میزان بیان مناسب و غیر سمی بودن برای سلول‌های سالم و فرد گیرنده، باشند (۱۸، ۱۹). بهترین وکتورهای ژن‌درمانی از نظر داشتن ترکیب مشخص و تکرارپذیری تولید و هزینه‌های مرتبط، ذرات سنتتیک هستند که می‌توان به لیپوزوم‌ها یا پلیمرها اشاره کرد. با این وجود، این روش‌ها هنوز کارآیی بالایی در ورود به سلول‌ها و بیان مداوم ژن در شرایط *in vivo* را ندارند (۲۰)؛ در مقابل، ویروس‌ها به گونه‌ای تکامل یافته‌اند تا با کارآیی بالا سلول‌های هدف را آلوده کرده و ماده ژنتیکی خود را به سلول منتقل کنند (۲۱). امروزه استفاده از ویروس‌ها به عنوان ابزار درمانی وارد مرحله جدیدی شده است. در این راستا استفاده از ویروس‌ها، به صورت ویروس‌های غیرهمانند سازی‌کننده به عنوان وکتورهای ژن‌درمانی و یا به صورت ویروس‌های همانندسازی‌کننده (ویروس‌های انکولیتیک)، زمینه جالب توجهی تحت عنوان ویروس درمانی را به وجود

آورده است (۲۲). در حال حاضر تقریباً ۷۰٪ کارآزمایی‌های بالینی ژن‌درمانی از وکتورهای ویروسی مانند وکتورهای آدنوویروسی، رتروویروسی، وکتورهای همراه آدنو (AAV)، واکسینیا و سایر پاکس‌ویروس‌ها، لنتی ویروسی و ویروس هرپس و سایر ویروس‌ها، بهره برده‌اند (شکل ۲) (۲۳). در این کارآزمایی‌ها، یا تزریق مستقیم وکتور ویروسی به بافت‌های هدف انجام می‌شود و یا سلول‌ها را در خارج از بدن با ویروس‌ها تغییر داده، سپس به دنبال تکثیر، سلول‌ها را به بدن تزریق می‌کنند (*ex vivo*) (۱۹، ۲۰).

انتخاب وکتور ویروسی به سلول هدف و نیاز به بیان موقت و یا طولانی مدت، روش تجویز و ایمنی‌زایی وکتور ویروسی بستگی دارد (۲۴). با این وجود، اغلب کارآزمایی‌های بالینی ژن‌درمانی که مزایای بالینی از خود نشان داده‌اند با استفاده از وکتورهای همراه آدنو (AAV) و یا وکتورهای لنتی ویروسی و اغلب به صورت *ex vivo* انجام شده‌اند (۲۵).

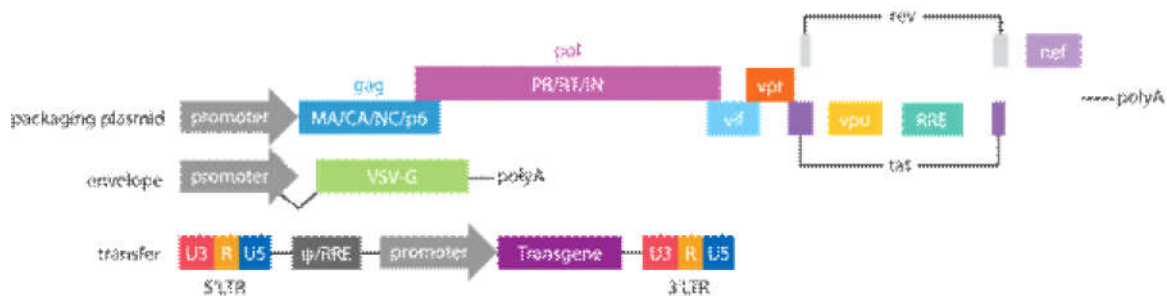
پیش بینی می‌شود که در ۲۵ سال آینده، بهبودهای زیادی در زمینه‌های مرتبط با ایمنی، کارایی و تولید وکتورهای ویروسی مورد استفاده در ژن‌درمانی صورت گیرد؛ به گونه‌ای که شاید حتی انتقال ژن به صورت یک روش مقرون به صرفه جهت رساندن داروهای زیستی به بدن تبدیل شود (۲۰).



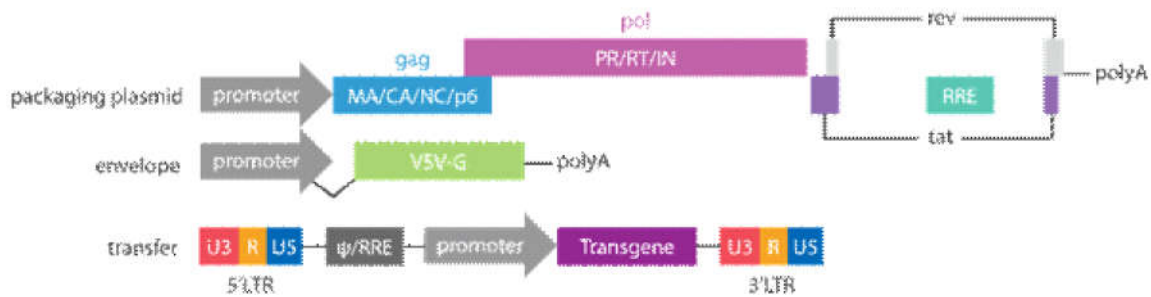
## تولید وکتورهای لنتی ویروسی

وکتورهای لنتی ویروس از طریق ترانسفکشن رده سلولی کلیه جنین انسانی HEK293T به طور همزمان توسط پلاسمیدهای بسته بندی، پلاسمید ترانسفر و پلاسمید کد کننده پوشش گلیکوپروتئینی ویروس تولید می‌شوند (۲۶). ژنوم ویروس، ژن-های ساختاری (gag, pol, rev) و ژن‌های تنظیمی (env و tat) را کد می‌کند که این ژن‌ها به وسیله بازوهای LTR (Long Terminal Repeat) احاطه شده‌اند. پروتئین Gag به پروتئین‌های ماتریکس MA، کپسید CA، نوکلئوکپسید و p6 شکسته می‌شود. پروتئین Pol، سه آنزیم ضروری پروتاز PR، نسخه بردار معکوس RT و اینتگراز IN را می‌سازد. در پلاسمید ترانسفر سیستم

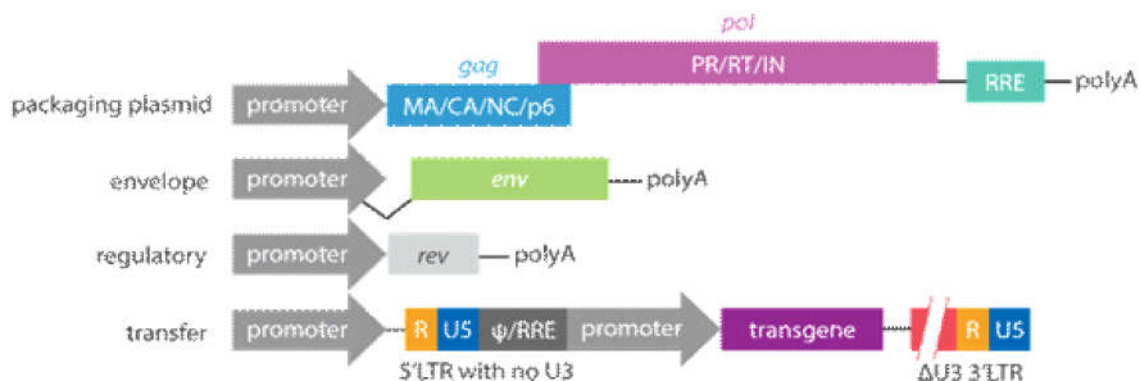
وکتورهای لنتی ویروسی فاقد قدرت تکثیر، تمامی ژن‌های اصلی و فرعی بین دو LTR با پروموتور و سازه ژنی مورد نظر جایگزین شده‌اند. به جزء توالی سیگنال بسته بندی، LTR و توالی‌های مورد نیاز جهت رونویسی معکوس و الحاق در ژنوم، سایر توالی‌ها در سیستم‌های لنتی ویروسی حذف شده است. از نگرانی‌های اصلی که در مورد وکتورهای لنتی ویروسی وجود دارد، احتمال تولید ویروس دارای قدرت تکثیر توسط نوترکیبی با ویروس‌های وحشی درون سلول هدف است. این نگرانی منجر به تولید وکتورهای ترانسفر Self-Inactivating Vectors (SIN) شد. در این وکتورها نواحی پروموتوری و شتاب دهنده رونویسی از ناحیه U3' LTR حذف شده است. بنابراین هرگونه رونویسی توسط نواحی LTR ویروسی در این



شکل ۳. نسل اول وکتورهای لنتی ویروسی. در نسل اول ژن بیان کننده پروتئین انولوپ gp160 حذف شد (۲۷).



شکل ۴. نسل دوم وکتورهای لنتی ویروسی. در نسل دوم ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کمکی vif, vpr, vpu, nef نیز حذف شدند (۲۷).



شکل ۵. نسل سوم وکتورهای لنتی ویروسی. در نسل سوم اجزای پلاسمید بسته‌بندی در دو پلاسمید مجزا قرار گرفتند که یکی Gag و Pol را کد می‌کند و پلاسمید دیگر Rev را کد می‌نماید و از سوی دیگر ژن tat نیز حذف شد (۲۷).

وکتورها حذف شده و بیان ژن مورد نظر فقط توسط پروموتور داخلی تنظیم می‌شود (۲۶).

وکتورهای لنتی ویروسی با توجه به پلاسمید بسته بندی مورد استفاده جهت تولید ذرات ویروسی به سه نسل طبقه بندی می‌شوند. در اولین نسل این وکتورها، پلاسمید بسته بندی حاوی ژن‌های کد کننده gag و pol مورد نیاز جهت ساخت و الحاق ژنوم ویروس در ژنوم میزبان، به علاوه ژن‌های تنظیم کننده ویروسی tat و rev و همچنین ژن‌های کمکی vif، vpr، vpu و nef است (شکل ۳) (۲۶).

در نسل دوم وکتورهای لنتی ویروسی ژن‌های ضروری جهت بیماری‌زایی (vif، vpr، vpu و nef) از پلاسمید بسته بندی حذف شدند؛ به این ترتیب با افزایش safety پلاسمید مذکور اختلالی در تولید ذرات لنتی ویروسی از لحاظ میزان تیترا ویروس و کارایی آلوده کردن انواع رده های سلولی وارد نشد (شکل ۴) (۲۶).

در نسل سوم وکتورهای لنتی ویروسی، safety سیستم بسته بندی توسط جدا کردن ژن rev و بیان آن توسط یک پلاسمید جداگانه افزایش یافت. همچنین ژن tat از وکتور بسته بندی حذف شد و به جای آن یک پروموتور داخلی در ناحیه 5'LTR پلاسمید ترانسفر جایگزین شد. به این ترتیب احتمال نوترکیبی و تولید نوع وحشی لنتی ویروس به دلیل شباهت بسیار کم وکتورها به طور قابل توجهی کاهش یافت (شکل ۵) (۲۶).

### ژن درمانی بتا تالاسمی با وکتورهای لنتی ویروسی

کاربرد ژن درمانی بعد از توسعه وکتورهای ویروسی در سال ۱۹۸۰ به واقعیت تبدیل شد و در اولین کارآزمایی بالینی در سال ۱۹۹۰، با استفاده از رتروویروس، با موفقیت ژن را انتقال دادند. در نتیجه هدف ژن درمانی در درمان بیماری بتا تالاسمی بازگرداندن توانایی و ظرفیت تولید گلبول قرمز حاوی هموگلوبین نرمال و سالم در افراد بیمار است که تولید اریتروسیت ناکارآمد را کاهش داده و بیماری کم خونی ارثی را درمان می‌کند. سلول‌های بنیادی مغزاستخوان که خاصیت نوسازی و تولید رده های مختلف خونساز از قبیل رده اریتروئیدی را دارند، سلول‌های هدف برای انتقال ژن گلوبین به صورت ex vivo هستند (۲۸).

در مطالعات اولیه برای ژن درمانی تالاسمی از وکتورهای رتروویروسی جهت انتقال ژن به سلول‌ها استفاده شد. اما وارد کردن توالی بلند ناحیه تنظیمی جهت به دست آوردن بیان بالا از ژن بتا گلوبین در ساختار وکتور باعث ناپایداری وکتور، بازآرایی ژنومی (Genomic rearrangement)، بیان پایین و

متغیر و تیترا پایین ویروس شد. به دلیل مشکلات ایجاد شده، محققین مجبور به استفاده از وکتورهای جایگزین مانند گاما رتروویروس، آلفا ویروس و AAV شدند، اما نتایج رضایت بخشی از این مطالعات نیز حاصل نشد (۲۹، ۳۰).

از آنجایی که ظرفیت انتقال ژن توسط لنتی ویرال وکتورها حدود ۸ کیلوباز است، امروزه وکتورهای لنتی ویروسی به صورت موفقیت آمیز قادر هستند که ژن بتا گلوبین با توالی کامل را همراه با توالی ناحیه تنظیمی به صورت کارآمد و پایدار به داخل سلول‌های بنیادی انتقال دهند و از این رو در درمان بیماران مبتلا به بتا تالاسمی مفید واقع شوند (۳۱). از مزایای دیگر لنتی ویروس‌ها که مزیت بسیار مهمی محسوب می‌شود، ارایه موثر ژن‌ها به هر دو نوع سلول هدف در حال تقسیم و آن‌هایی که تقسیم نمی‌شوند (به دلیل توانایی نفوذ Preintegration complex آنها از غشا سالم هسته) و عدم ایجاد پاسخ ایمنی ناخواسته است (۳۲).

### مطالعات پیش بالینی

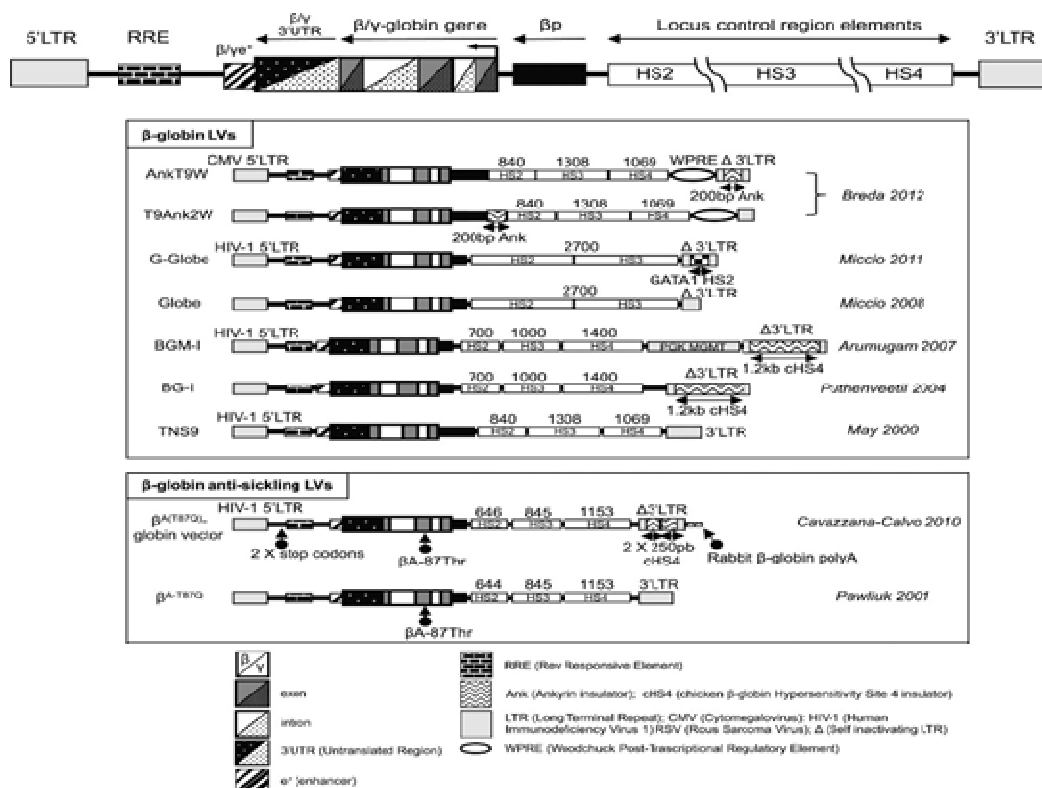
در چند سال اخیر محققان زیادی، وکتورهای لنتی ویروسی مختص رده اریتروئیدی، حامل ژن بتا گلوبین طراحی کرده‌اند که نتایج درمانی رضایت بخشی از تزریق سلول‌های بنیادی خون ساز به صورت ex vivo به مدل‌های موشی به دست آمده است.

در مطالعه‌ای که توسط گروه May و همکارانش در سال ۲۰۰۰ انجام شد وکتور TNS9 طراحی شد که در آن منطقه پلی آدنیلایسیون مخفی در اینترون ۲ حذف شده و ژن بتا گلوبین با پروموتور و beta globin 3' enhancer و ناحیه تنظیمی (H2, H3, H4) در ساختار وکتور وارد شد. بیان ژن بتا گلوبین از وکتور TNS9 مختص رده اریتروئیدی بود و در مدل موشی  $Hbb^{th3+}$  باعث افزایش سطح هموگلوبین پلاسما تا  $7/4 \text{ mmol/l}$  با  $Vector \text{ Copy Number (VCN)}$   $0/8$  در مقایسه با موش درمان نشده که سطح هموگلوبین آن  $5 \text{ mmol/l}$  بود، شد. با توجه به این نتایج و این نکته که بعد از ۴۰ هفته این وکتور پایدار بود و همچنین سائز طحال و سطح آهن در کبد مدل موشی  $Hbb^{th3+}$  کاهش یافته بود به این نتیجه رسیدند که می‌توان از این وکتور در درمان استفاده کرد (۳۳، ۳۴).

Liowski و همکارانش تغییرات دیگری بر روی این وکتور انجام دادند و توالی HSI را نیز به این وکتور اضافه کردند که باعث افزایش سطح بیان بتا گلوبین به میزان  $5/9 \text{ mmol/l}$  شد (۳۵).

جدول ۱. خلاصه ای از نتایج مطالعات پیش بالینی مختلف که از وکتور لنتی ویروسی در ژن درمانی بتاتالاسمی استفاده کردند.

Reference	Globin gene	LCR-elements	Mouse model	Serum Hb increase	VCN
May et al.	$\beta$ -globin	HS2,3,4	Hbb <sup>th3+</sup>	2.4mmol/L	0.8
Lisowski et al.	$\beta$ -globin	HS1,2,3,4	Hbb <sup>th3/+</sup>	2.5mmol/L	0.4
Imren et al.	$\beta$ -globin	HS2,3,4	THAL/Hbb <sup>th1</sup>	2.4mmol/L	3
Micco et al.	$\beta$ -globin	HS2,3	Th3/th3 FLCs	4.1 mmol/L	4
Puthenveetil et al.	$\beta$ -globin	Chicken HS4	$\beta$ 2m <sup>null</sup> NOD-SCID	N/A	N/A



شکل ۶. طرح وکتورهای لنتی ویروسی مختلف که توسط گروه‌های بحث شده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این وکتورها به دو گروه تقسیم شده‌اند؛ یک گروه وکتورهای بیان کننده ژن بتاگلوبین و گروه دیگر بیان کننده ژن بتاگلوبین که خاصیت آنتی سایکلیکینگ دارند.

مغزاستخوان نشان داد که ۴ کپی از هر وکتور در سلول‌ها وجود دارد (۳۶).

Putenveetil و همکارانش در طی مطالعاتی که در سال ۲۰۰۳ داشتند وکتوری طراحی کردند که در قسمت LTR آن 4 Chicken hypersensitive site 4 (cHS4) وارد شده بود. این وکتور به سلول‌های CD34<sup>+</sup> که از افراد مبتلا به بتاتالاسمی جدا شده بود منتقل شد و توانستند در شرایط *in vivo* فنوتیپ تالاسمی ماژور را به تالاسمی اینترمدیا تبدیل کنند (جدول ۱) (شکل ۶) (۳۷).

وکتورهای مشابه دیگری ساختاری همانند TNS9 دارند و ژن HBB یا HBG را کد می‌کنند (شکل ۷)، مانند  $\beta$ -globin-<sup>A-87Q</sup> lentiviral vector یا B87 و B<sup>AS3</sup> که به ترتیب ژن گلوبینی را سنتز می‌کنند که در کدون شماره ۸۷ در B87 و

Imren و همکارانش نیز ژن بتاگلوبین را در ساختار وکتوری که برای درمان کم خونی داسی شکل طراحی شده بود، وارد کردند. در موش های THAL/Hbb<sup>th1</sup> سطح هموگلوبین تولید شده از این وکتور ۷/۴ mmol/l بود و به مدت ۷ ماه پایدار بود، اما این نتایج با VCN=۳ به دست آمده بودند (۳۱).  
Micco و همکارانش در سال ۲۰۰۸ وکتور متفاوت دیگری به نام GLOBE vector ارائه دادند. در آن از ۲/۷ kb توالی تنظیمی (HS<sub>3</sub>, HS<sub>2</sub>)، ژن بتاگلوبین همراه با ۲۶۵ bp از انتهای ۵' و ۳۰۰ bp از انتهای ۳' ژن بتاگلوبین در وکتور لنتی ویروسی قرار داده شد. از طرفی این وکتور دستخوش حذفی ۴۰۰ bp در منطقه LTR به منظور افزایش ایمنی قرار گرفته بود. این وکتور باعث افزایش سطح بیان هموگلوبین تا ۶/۳۳ mmol/l در مدل موشی th3/+ شد. همچنین بررسی



کارآزمایی بالینی

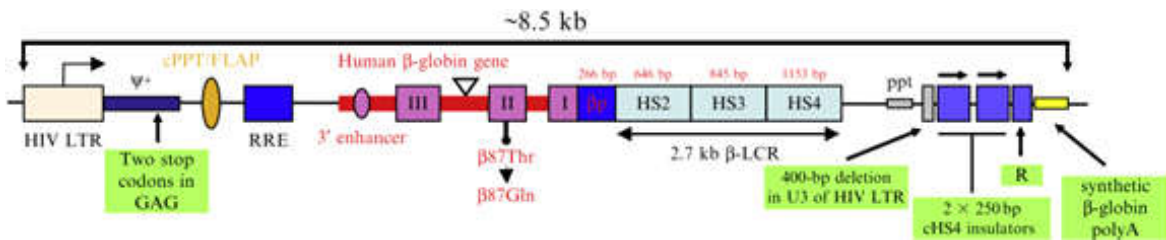
اولین تلاش برای استفاده از وکتور لنتی ویروسی  $\beta^A-T87Q$  (HPV569) در انتقال ژن HBB به سلول‌های بنیادی بیماران در سال ۲۰۰۶ انجام شد. این کارآزمایی بالینی LG001 نام‌گذاری شد. لنتی ویروس مورد استفاده حاوی قطعه بزرگی از منطقه کنترل ژن بتاگلوبین (LCR) به همراه ۲۵۰bp از هسته chicken HS4 به عنوان عایق در LTR خود بود (شکل ۷) (۷، ۴۰).

در سال ۲۰۱۰ Philipp Leboulch و Marina Cavazzana-Calvo اعلام داشتند که با استفاده از وکتور لنتی ویروسی خود تحت عنوان  $\beta^A-T87Q$  که دارای خاصیت anti-sickling است (که در مورد آن بحث شد) توانستند نوجوان ۱۸ ساله مبتلا به بیماری بتاتالاسمی از نوع  $\beta^0\beta^0$ -thalassemia را بعد از گذشت ۳ سال و هم اکنون پس از گذشت ۱۱ سال درمان کنند. فرم  $\beta^0\beta^0$  نوعی از تالاسمی است که یک آلل دچار موتاسیون است ( $\beta^0$ ) و آلل دیگر کاملاً از کار افتاده است ( $\beta^0$ )؛ لذا تنها راه بهبود علائم این بیمار تزریق مداوم خون است. سطح هموگلوبین فرد به سطح ثابت  $9 \text{ g dL}^{-1}$  رسید و مهم‌تر اینکه این فرد بعد از اتمام دوره ی درمانی خود دیگر نیازی به تزریق خون مداوم نداشت. این گروه برای اولین بار فردی مبتلا به نوع شدید بتاتالاسمی را با روش ژن درمانی و آن هم

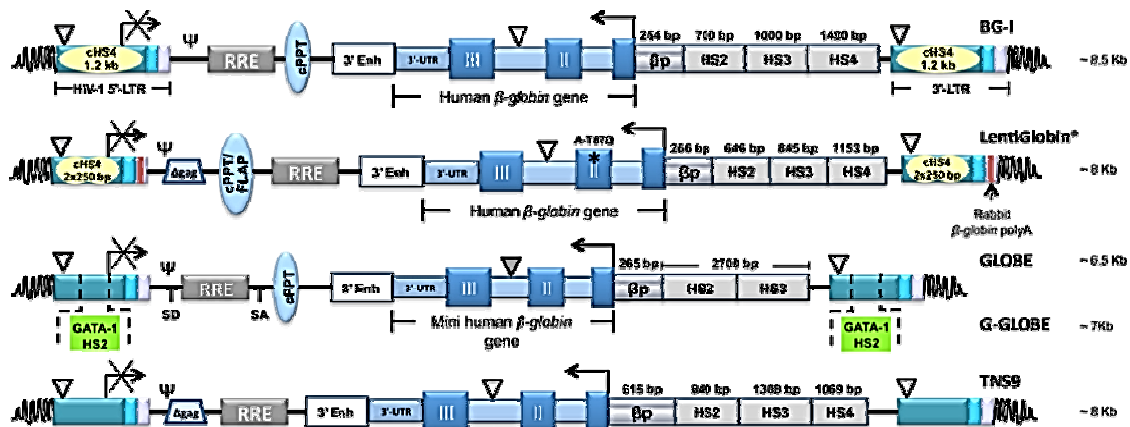
کدون‌های ۸۷،۲۲ و ۱۶ در  $B^{AS3}$  جهشی صورت گرفته و گلوبینی را سنتز می‌کنند که خاصیت anti-sickling دارند. یعنی از پلی مریزاسیون هموگلوبین S جلوگیری می‌کنند. بنابراین می‌توانند هم در بتا تالاسمی و هم در کم خونی داسی شکل مفید باشند (۳۸).

Breda و همکارانش در سال ۲۰۱۱ وکتور Ankt9W را طراحی کردند. این وکتور با تغییراتی که بر روی وکتور T9W اعمال گردید، طراحی شد. در منطقه LTR از پروموتور ژن انکرین به عنوان عایق، در منطقه LTR جایگزین شد. این جایگزینی نه تنها باعث افزایش میزان بیان ژن بتاگلوبین سالم در ساختار وکتور شد، بلکه باعث القاء بیان ژن در مراحل اولیه تمایز سلول‌های اریترئوئیدی شد که یکی از شاخص‌های لازم و ضروری برای کارایی بالای ژن درمانی است (۳۹).

در تمامی این مطالعات، توالی ژن بتا گلوبین و توالی‌های تنظیمی آن از قبیل نواحی HS، از اجزاء ثابت در تمامی وکتورهای ویروسی هستند؛ بنابراین اندک تفاوتی در وکتورهای طراحی شده توسط گروه‌های مختلف به چشم می‌خورد. از این موارد اختلاف و تنها مواردی که منجر به افزایش کارایی هر کدام از آنها می‌شود، طول هر ناحیه تنظیمی و insulator های به کار رفته است.



شکل ۷. طرحی از وکتور HPV569 لنتی ویروسی مورد استفاده توسط Cavazzana و همکاران (۴۴)



شکل ۸. شکل شماتیک از توالی وکتورهای مورد استفاده در کارآزمایی بالینی (۴۹)



## نتیجه گیری

ژن درمانی با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی می‌تواند گزینه امیدوار کننده درمانی باشد. اولین ژن درمانی لنتی ویروسی با نام تجاری (CTL019, Kymriah) Tisagenlecleucel در ایالات متحده برای درمان کودکان و بزرگسالان مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستیک در سال ۲۰۱۷ مورد تایید قرار گرفت. اخیرا نیز چندین پروژه دیگر سلول درمانی لنتی ویروسی در حال توسعه و مطالعه هستند (۵۰).

وکتورهای نسل سوم لنتی ویروس که SIN نامیده می‌شوند در مطالعاتی برای انتقال ژن به سلول‌های بنیادی و سلول‌های T استفاده شدند. نتایج آنها حاکی از ایمنی به کارگیری این وکتورها جهت ژن درمانی است. اگرچه از لحاظ تئوری پتانسیل ایجاد سرطان برای وکتورهای لنتی ویروسی همچنان وجود دارد، اما تاکنون از مطالعات ژن درمانی با لنتی ویروس و حتی HIV، هیچ موردی از سرطان گزارش نشده است.

در مجموع، با پیشرفت‌هایی که با استفاده از تکنیک‌های ژن درمانی به دست آمده است، اگر ایمنی، اثربخشی و پایدار بودن نتایج این مداخلات تایید شود، محققان امیدوار هستند که نسبت به گذشته مداخلات جدیدی برای بیماران بتاتالاسمی داشته باشند و درمان‌های جدید می‌توانند تاثیر زیادی بر مدیریت شرایط بالینی این بیماران در آینده‌ای نزدیک داشته باشند.

روش‌های دیگری که برای ژن درمانی بتاتالاسمی در حال حاضر مورد بررسی هستند، شامل القا تولید گاماگلوبین با استفاده از داروها یا دستکاری‌های ژنتیکی از طریق ایجاد تداخل در مسیر BCL11A توسط فن آوری های CRISPR / Cas9 ، Zinc Finger Nuclease (ZFN) و یا Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) هستند (۴، ۵۱).

از طریق وکتورهای لنتی ویروسی به طور کامل و قطعی درمان کردند (۴۳-۴۱).

از آنجایی که در وکتور HPV569 از دو توالی ۲۵۰bp CHS4 به عنوان Insulator استفاده شده بود و این دو توالی باعث ناپایداری ژنوم ویروس و از طرفی باعث کاهش تیترا ویروس شده بود، در وکتور جدید این توالی را از ساختار وکتور حذف کردند و در مرحله بعد جهت افزایش تیترا لنتی ویروس و افزایش کارایی ترانسداکشن در قسمت 3'LTR از پروموتور ژن (Cytomegalovirus) CMV استفاده شد. وکتور جدید BB305 نامگذاری شد. در سال ۲۰۱۳ ثبت نام در کار آزمایشی بالینی این وکتور در کشورهایی مانند آمریکا، تایلند، استرالیا و فرانسه شروع شد. کارآزمایی بالینی این وکتور، HGB-204، HGB-205، HGB-206 نامگذاری شد. تا به امروز ۲۶ نفر در این کارآزمایی بالینی ثبت نام کرده‌اند و تنها ۲۲ نفر از آنها وارد ژن درمانی شده‌اند. ۱۵ نفر از ۲۲ بیمار مبتلا به بتاتالاسمی بعد از دریافت درمان به طور کلی از تزریق خون بی‌نیاز شدند و ۷ نفر دیگر نیز که اغلب مبتلا به انواع خیلی شدید بیماری بودند، توانستند که دفعات تزریق را کمتر کنند. در طول ۳ و نیم سال اثرات درمان در بیماران کم‌رنگ نشده بود و بدون دریافت خون به زندگی خود ادامه می‌دادند. در سال ۲۰۱۹ این ژن درمانی توسط شرکت بلوبرد تحت نام Zynteglo، موفق به دریافت تاییدیه آژانس دارویی اروپا (EMA) شد و انتظار می‌رود در سال ۲۰۲۰ تاییدیه FDA را بگیرد (۴۷-۴۵).

کار آزمایشی بالینی دیگری با وکتور TNS9.3.55 در سال ۲۰۱۲ در آمریکا شروع شده است و ۴ نفر در این کارآزمایی ثبت نام کرده‌اند. کارآزمایی بالینی دیگری در کشور ایتالیا با وکتور GLOB در سال ۲۰۱۵ شروع شده که ۷ نفر در این کارآزمایی ثبت نام کرده‌اند (شکل ۸) (۴۸-۴۵).

## REFERENCES

1. Finotti A, Breda L, Lederer CW, Bianchi N, Zuccato C, Kleanthous M, et al. Recent trends in the gene therapy of beta-thalassemia. *J Blood Med* 2015; 6:69-85.
2. Sankaran VG. Targeted therapeutic strategies for fetal hemoglobin induction. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011:459-65.
3. Rezaee AR, Banoei MM, Khalili E, Houshmand M. Beta-Thalassemia in Iran: new insight into the role of genetic admixture and migration. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:635183.
4. Origa R.  $\beta$ -Thalassemia. *Genet Med* 2017; 19:609.
5. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nature Rev* 2001;2:245-55.
6. Cao A, Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med* 2010; 12:61-76.

7. Ferrari G, Cavazzana M, Mavilio F. Gene therapy approaches to hemoglobinopathies. *Hematol Oncol Clin* 2017; 31:835-52.
8. Fibach E, Rachmilewitz EA. Pathophysiology and treatment of patients with beta-thalassemia—an update. *F1000Res*. 2017;6.
9. Azami M, Parizad N, Sayehmiri K. Prevalence of hypothyroidism, hypoparathyroidism and the frequency of regular chelation therapy in patients with thalassemia major in Iran: A systematic review and meta-analysis study. *Iran J Ped Hematol Oncol* 2016; 6:261-76.
10. Farrell CM, Grinberg A, Huang SP, Chen D, Pichel JG, Westphal H, et al. A large upstream region is not necessary for gene expression or hypersensitive site formation at the mouse  $\beta$ -globin locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14554-9.
11. Origa R. Beta-thalassemia. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Editors. *Molecular Genetics: Lora JH Bean and Karen Stephens. Anne Amemiya, Genetic Counseling. GeneReviews®*[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2018.
12. Taher AT, Viprakasit V, Musallam KM, Cappellini MD. Treating iron overload in patients with non-transfusion-dependent thalassemia. *Am J Hematol* 2013;88:409-15.
13. Weatherall DJ, Clegg JB, Editors. *The thalassaemia syndromes*. 4<sup>th</sup> ed. Malden, MA: Blackwell Science; 2001.
14. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. *The Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood* 1994; 84:643-9.
15. Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; 330:1639-44.
16. Sankaran VG, Nathan DG. Thalassemia: an overview of 50 years of clinical research. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010; 24:1005-20.
17. Finotti A, Breda L, Lederer CW, Bianchi N, Zuccato C, Kleanthous M, et al. Recent trends in the gene therapy of  $\beta$ -thalassemia. *J Blood Med* 2015; 6:69.
18. Pariante N, Mao SH, Morizono K, Chen IS. Efficient targeted transduction of primary human endothelial cells with dual-targeted lentiviral vectors. *J Gene Med* 2008; 10:242-8.
19. Annan AC, Fisher PB, Dent P, Siegal GP, Curiel DT. Gene therapy in the treatment of human cancer. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. *The molecular basis of human cancer*. New York: SpringerLink; 2017. P.811-41.
20. Collins M, Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. *Proc Biol Sci* 2015; 1821:282.
21. Hatefi A, Canine BF. Perspectives in vector development for systemic cancer gene therapy. *Gene Ther Mol Biol* 2009; 13:15-9.
22. Kane JR, Miska J, Young JS, Kanojia D, Kim JW, Lesniak MS. Sui generis: gene therapy and delivery systems for the treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol* 2015; 17:ii24-36.
23. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med* 2018;20:e3015.
24. Young LS, Searle PF, Onion D, Mautner V. Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application. *J Pathol* 2006; 208:299-318.
25. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 2015; 526:351-60.
26. Breckpot K, Aerts J, Thielemans K. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Ther* 2007; 14:847-62.
27. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* 2012; 443:603-1.
28. Sadelain M, Riviere I, Wang X, Boulad F, Prockop S, Giardina P, et al. Strategy for a multicenter phase I clinical trial to evaluate globin gene transfer in beta thalassemia. *Ann Ny Acad Sci* 2010; 1202:52-8.
29. Nienhuis AW, Persons DA. Development of gene therapy for thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: 011833.
30. Quek L, Thein SL. Molecular therapies in  $\beta$ -thalassaemia. *Br J Haematol* 2007; 136:353-65.
31. Imren S, Payen E, Westerman KA, Pawliuk R, Fabry ME, Eaves CJ, et al. Permanent and panerythroid correction of murine  $\beta$  thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:14380-5.

32. Naldini L, Bloemer U, Gally P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; 272:263-7.
33. May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, et al. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature* 2000; 406:82-6.
34. May C, Rivella S, Chadburn A, Sadelain M. Successful treatment of murine beta-thalassemia intermedia by transfer of the human beta-globin gene. *Blood* 2002; 99:1902-8.
35. Lisowski L, Sadelain M. Locus control region elements HS1 and HS4 enhance the therapeutic efficacy of globin gene transfer in beta-thalassemic mice. *Blood* 2007; 110:4175-8.
36. Miccio A, Cesari R, Lotti F, Rossi C, Sanvito F, Ponzoni M, et al. In vivo selection of genetically modified erythroblastic progenitors leads to long-term correction of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:10547-52.
37. Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, Qureshi N, Xia P, Zeng L, et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood* 2004; 104:3445-53.
38. Mansilla-Soto J, Riviere I, Boulad F, Sadelain M. Cell and gene therapy for the beta-thalassemias: advances and prospects. *Hum. Gene Ther* 2016; 27:295-304.
39. Breda L, Casu C, Gardenghi S, Bianchi N, Cartegni L, Narla M, et al. Therapeutic hemoglobin levels after gene transfer in beta-thalassemia mice and in hematopoietic cells of beta-thalassemia and sickle cells disease patients. *PLoS one* 2012; 7:32345.
40. Bank A, Dorazio R, Leboulch P. A phase I/II clinical trial of beta globin gene therapy for beta thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1054:308-16.
41. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, et al. Transfusion independence and hmga2 activation after gene therapy of human [bgr]-thalassaemia. *Nature* 2010; 467:318-22.
42. Riegman A, de Winger M. The current status of Lentiviral gene delivery in beta-Thalassemia Major. *Blood* 1988; 331:35-41.
43. Coquerelle S, Ghardallou M, Rais S, Taupin P, Touzot F, Boquet L, et al. Innovative curative treatment of beta-thalassemia: cost-efficacy analysis of gene therapy versus allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Hum Gene Ther* 2019; 30:753-761.
44. Payen CE, Negre O, Beuzard Y, Hehir K, Leboulch P. Lentivirus Vectors in beta -Thalassemia. *Method Enzymol* 2012; 507:109-24.
45. Negre O, Eggimann A-V, Beuzard Y, Ribeil J-A, Bourget P, Borwornpinyo S, et al. Gene therapy of the beta-hemoglobinopathies by lentiviral transfer of the betaA (T87Q)-globin gene. *Hum. Gene Ther* 2016; 27:148-65.
46. Cavazzana M, Antoniani C, Miccio A. Gene therapy for beta-hemoglobinopathies. *Mol Ther* 2017; 25:1142-54.
47. Thompson AA, Walters MC, Kwiatkowski J, Rasko JE, Ribeil J-A, Hongeng S, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent beta-thalassemia. *N Engl J Med* 2018; 378:1479.
48. Markt S, Cicalese MP, Giglio F, Scaramuzza S, Calbi V, Casiraghi M, et al. Gene therapy for Beta thalassemia: preliminary results from the PHASE I/II Tiget-Bthal trial of autologous hematopoietic stem cells genetically modified with GLOBE lentiviral vector. *Blood* 2017; 130:355. [Abstract]
49. Drakopoulou E, Papanikolaou E, Georgomanoli M, P Anagnou N. Towards more successful gene therapy clinical trials for beta-thalassemia. *Curr Mol Med* 2013; 13:1314-30.
50. Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 2018; 32:1529-41.
51. Khosravi MA, Abbasalipour M, Concordet J-P, Vom Berg J, Zeinali S, Arashkia A, et al. Targeted deletion of BCL11A gene by CRISPR-Cas9 system for fetal hemoglobin reactivation: A promising approach for gene therapy of beta thalassemia disease. *Eur J Pharmacol* 2019; 854:398-405.