

地中海贫血基因治疗进展和现状

陈辉^{1,2}, 贾玉艳³, 黄粤³, 刘德培³

(1. 国家卫生健康委地中海贫血防治重点实验室, 南宁 530021; 2. 广西医科大学再生医学与医用生物资源开发应用省部共建协同创新中心, 南宁 530021; 3. 中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 重大疾病共性机制研究全国重点实验室, 北京 100005)



刘德培, 中国医学科学院基础医学研究所教授、研究员、博士生导师。1986年毕业于中国协和医科大学生物化学与分子生物学专业, 获博士学位。1987至1990年在美国加州大学旧金山分校做博士后研究工作。中国工程院院士、中国医学科学院学部委员、中国中医科学院学部委员、美国医学科学院(NAM)院士、第三世界科学院(TWAS)院士、欧洲科学院(EAS)院士。现任重大疾病共性机制研究全国重点实验室主任、细胞生态海河实验室主任、国家人口健康科学数据中心主任。主要研究方向: 基因表达调控、基因治疗与心血管疾病发病机制研究。先后承担国家自然科学基金委重大、重点项目, 国家863重点项目等, 担任过国家自然科学基金委“优秀创新群体”学术带头人、心血管973项目首席科学家。在 *Nature Cell Biology*、*Circulation*、*European Heart Journal*、*Journal of Experimental Medicine*、*Circulation Research*、*PNAS*、*Blood* 等期刊发表SCI论文200多篇, 被引用9000余次。

摘要 地中海贫血(地贫)是由于 α -或 β -珠蛋白基因突变或者缺失使 α -或 β -珠蛋白链生成缺陷, 最终导致的遗传性溶血性疾病。同种异体造血干细胞移植是一种能够治愈输血依赖型地贫(TDT)的选择, 但由于匹配的供体来源的限制, 以及不匹配供体移植的风险, 只有不到10%的患者能受益于这种治疗。自体造血干细胞的基因治疗为TDT患者提供了一个新的、可治愈的选择。 β -地贫的基因治疗主要有两种策略: 一是通过慢病毒载体介导补充 β -珠蛋白的基因替代; 二是通过基因编辑技术重新激活胎儿期 γ -珠蛋白的表达。 α -地贫基因治疗的研究还未有报道。本文综述了 β -地贫基因治疗国际和国内的进展和现状, 还讨论了目前地贫基因治疗的问题和后续研发的可能方向。

关键词 地中海贫血; 基因治疗; 基因编辑; 造血干细胞; 移植

中图分类号: R556.61 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)01-0001-10

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.01.001

Progress and current status of gene therapy for thalassemia

CHEN Hui^{1,2}, JIA Yuyan³, HUANG Yue³, LIU Depei³. (1. NHC Key Laboratory of Thalassemia Medicine, Nanning 530021, China; 2. Collaborative Innovation Centre of Regenerative Medicine and Medical BioResource Development and Application Co-constructed by the Province and Ministry, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. State Key Laboratory of Common Mechanism Research for Major Diseases, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China)

Abstract Thalassemia is a hereditary hemolytic disease caused by the deficiency production of either the α - or β -globin chains, resulting from mutation or deletion of the α - or β -globin genes. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is a curative option available for transfusion dependent thalassemia (TDT) patients. However, due to the limitation of matching donor sources, as well as the risk of unmatched donor transplantation, only few-

[基金项目] 全国重点实验室专项经费(No. 2060204)

[通信作者] 刘德培, E-mail: liudp@pumc.edu.cn; 黄粤, E-mail: huangyue@pumc.edu.cn

[收稿日期] 2023-12-26

er than 10% of patients are actually able to avail of the treatment. Gene therapy of autologous hematopoietic stem cell transplantation offers a new curative option for patients with TDT. Currently, there are two main strategies for gene therapy of β -thalassemia, one is through lentiviral vector mediated replacement of β -globin gene, and the other is through gene editing to re-activate the expression of fetal γ -globin. There have been no reports about gene therapy for α -thalassemia until now. This article reviews the progress and status of gene therapy for β -thalassemia at home and abroad, and discusses the current problems and possible future directions of follow-up research of gene therapy for β -thalassemia.

Keywords thalassemia; gene therapy; gene editing; hematopoietic stem cell; transplantation

地中海贫血(thalassemia)简称地贫,是由于 α -或 β -珠蛋白基因发生突变或者缺失,使 α -或 β -珠蛋白链合成减少或完全不能合成,从而导致的遗传性溶血性疾病。地贫是世界范围内最常见的单基因隐性遗传病,临床上主要分为 α -地贫和 β -地贫,全世界约1.5%的人口携带 β -珠蛋白基因的变异^[1]和5%的人口携带 α -珠蛋白的变异^[2]。地贫主要发生在地中海地区、撒哈拉以南的非洲、中东、印度次大陆、东亚和东南亚地区^[3-4],而我国长江以南的大部分地区为该病的高发区,尤其以广东、广西和海南地区最为严重^[5]。《中国地中海贫血蓝皮书(2020)》数据显示,2015年中国地贫携带者约3 000万,中间型和重型患者共计30万人。随着全球移民的增加,地贫正成为一种全球性的健康负担^[4]。

地贫临床表现的严重程度与 α -或 β -珠蛋白链减少的程度直接相关,可分为:携带者/轻型、中间型和重型^[6],部分中间型 α -地贫和重型 β -地贫属于输血依赖型地贫(transfusion dependent thalassemia, TDT)。终身输血和铁螯合治疗能显著改善TDT患

者生活质量,延长寿命和提高生存率,但长期输血会引发多种并发症并给患者家庭带来极大经济负担^[7]。同种异体造血干细胞移植(allogenic hematopoietic stem cell transplantation, AHSCT)是一种能够彻底治愈地贫的治疗方法,通过人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)匹配的捐赠者的骨髓移植,TDT患者无病生存率高达80%^[8],然而受HLA匹配供体来源的限制,绝大多数TDT患者无法采用AHSCT的方式进行治疗^[9]。基于基因治疗的自体造血干细胞移植目前正成为“一站式”治愈地中海贫血的新选择^[10],其最大的优势在于不需要骨髓捐赠和异体移植,可取代异体骨髓移植的治疗方案,有望实现“一次治疗永久性治愈”。目前基因治疗药物的研发主要集中在 β -地贫上, α -地贫基因治疗的研究还未有报道。 β -地贫的基因治疗主要分为两大类:慢病毒载体介导补充 β -珠蛋白的基因替代和胎儿期 γ -珠蛋白的重新激活表达(图1)。本文将重点对 β -地贫基因治疗的进展和现状进行综述。

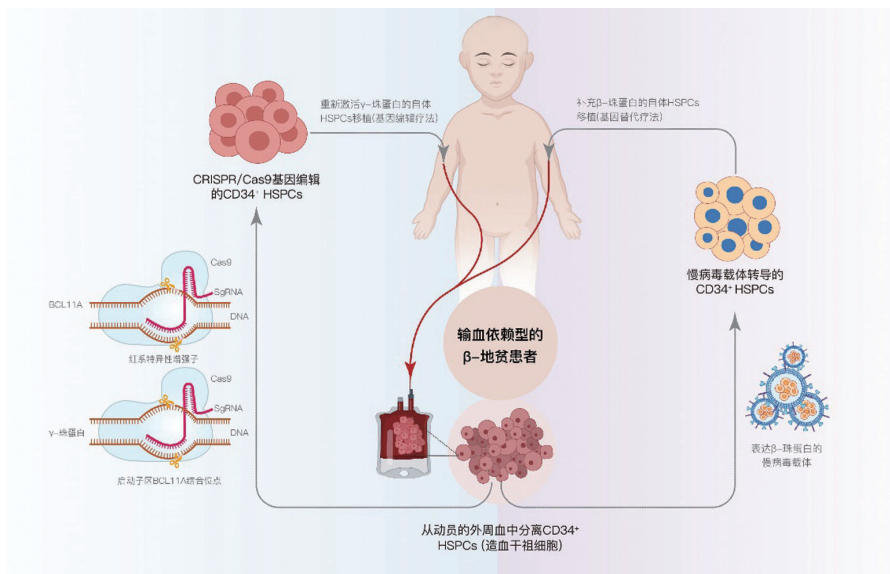


图1 β -地贫的基因治疗策略

1 慢病毒载体介导的 β -珠蛋白的补充疗法

影响 β -珠蛋白正常合成的基因突变多达400种(<https://www.ithanet.eu/db/ithagenes>), 突变导致 β -珠蛋白基因转录、前体mRNA剪接/加工或者mRNA的翻译障碍, 影响 β -珠蛋白的合成, 导致 α -和 β -珠蛋白链比例失衡。过量未结合的 α -珠蛋白在红系前体细胞中的积累是导致红细胞破坏、无效红细胞生成和严重贫血的主要原因^[11]。对于无法找到HLA匹配供体的患者, 慢病毒载体介导 β -珠蛋白的补充是一种有希望的治疗选择^[12]。这种治疗涉及造血干细胞(hematopoietic stem progenitor cells, HSPCs)的分离、慢病毒携带目的基因对HSPCs的转导、骨髓处理以及转导后的HSPCs的造血重建等复杂过程, 但无需担心由异体来源细胞移植引起的免疫排斥反应, 无需使用免疫抑制剂, 同时也无需考虑疾病基因的突变类型, 能够从根本上补充缺失的 β -珠蛋白, 降低 α -和 β -珠蛋白链的不平衡, 减少过剩 α -珠蛋白形成的四聚体对红系前体的破坏。

早在1978年, 加州大学洛杉矶分校的研究团队就提出了将 β -珠蛋白基因插入骨髓细胞来治疗 β -地贫的理念, 遗憾的是, 参与试验的 β^0/β^0 型患者体内并未检测到显著的 β -珠蛋白水平的提升^[13]。 β -珠蛋白表达调控元件优化、重新组合, 表达元件尺寸缩小以及采用慢病毒表达载体替换 γ 逆转录病毒载体等改变使 β -珠蛋白的稳定高产成为可能。慢病毒载体组装元件优化以及自失活元件的应用也大大

提高了慢病毒载体的安全性。Leboulch等^[14]优化了 β -珠蛋白基因表达载体, 同时引入T87Q突变以区别内源表达的 β -珠蛋白, 并命名为HPV569。2007年, 1例基因型为 β^E/β^0 的患者接受了HPV569转导的自体HSPCs的回输治疗, 患者1年后不再输血, 血红蛋白(hemoglobin, Hb)维持在9~10 g/dL, 检测发现患者体内1/3的Hb由载体药物提供, 并且在随后7年的观察中, 该患者基本摆脱输血治疗^[15]。这是 β -地贫基因治疗药物取得的重大进展(图2), 但Leboulch的研究团队认为, HPV569在患者体内表达的 β -珠蛋白量仍不够高, 于是在HPV569基础上进一步优化产生了BB305。BB305采用了更强的CMV启动子, 同时删除了不太影响药物安全性的2个绝缘子序列, 进一步缩小了载体尺寸^[16]。两项基于BB305的I/II期临床试验HGB-204(NCT01745120)和HGB-205(NCT02151526)共计招募了包括 β^E/β^0 、 β^0/β^0 、IVS1-110纯合突变基因型的25位TDT患者。在接受BB305转导的自体HSPCs移植后平均26个月的观察期内, 13例非 β^0/β^0 基因型患者中的12例患者停止进行红细胞输注, Hb平均增加6 g/dL, 中位总Hb水平达到11.2 g/dL; 9例 β^0/β^0 和 β^0/β^0 样基因型IVS1-110患者中, 6例患者输血频率平均降低了74%, 其余3例患者摆脱输血平均超过2年, 而这3例患者HbA^{T87Q}提高了6.6~8.2 g/dL, 较2007年通过HPV569慢病毒载体治疗的 β^E/β^0 患者有了较大提升, 没有发生与药物相关的严重不良事件^[18], 并且在上述 β^E/β^0 患者中观察到的HMGA2基因座的相对克隆优势也自发消退^[17-18]。

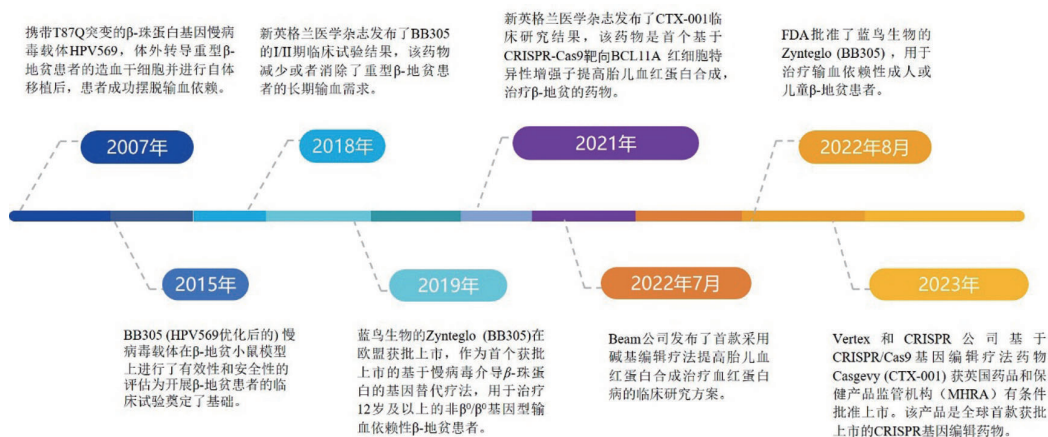


图2 β -地贫的基因治疗简史

在 HGB-204 和 HGB-205 临床研究中, Beti-cel (BB305 转导的造血干细胞药物) 中的载体拷贝数和慢病毒载体阳性细胞的百分比与 β -珠蛋白表达水平还显示出一定的相关性, 因此, 在 Beti-cel 的 3 期临床试验 (HGB-207, NCT02906202) 中, 研究人员采用了优化的 HSPCs 转导方案, 期望增加目的细胞中慢病毒载体阳性细胞百分比和提升 β -珠蛋白的表达水平。该研究招募了 23 例非 β^0/β^0 患者, 在可评估的 22 例患者中有 20 例 (91%) 摆脱输血, 其中包括 7 例年龄小于 12 岁的患者中的 6 例 (86%)。输注 Beti-cel 12 个月后, 单个细胞载体拷贝数明显增高, HbA^{T870} 的中位水平达到 8.7 g/dL (5.2~10.6 g/dL), 高于 1/2 期临床试验的 6 g/dL, 并且在接受 Beti-cel 治疗的 β -地贫患者中尚未见肿瘤发生、克隆优势的证据和癌症病例。2019 年, 欧盟药物管理局 (EMA) 授予 Bluebird Bio 公司 β -地贫治疗药物 Zynteglo™ (Beti-cel) 有条件上市许可, 用于 12 岁及以上非 β^0/β^0 基因型、适合造血干细胞移植但无匹配的同胞供者的 TDT 患者。2022 年 8 月, 美国食品和药物监督管理局 (FDA) 也批准了 Zynteglo™ 的上市许可 (图 2、表 1), 但目前该研究还存在受试患者数量少和随访期短的局限性, 需要更长时间的随访以充分确定 Beti-cel 的长期疗效和安全性, 而改进后的药物是否足以使 β^0/β^0 基因型地贫患者摆脱输血依赖还有待进一步临床试验评估。

目前国内还没有针对 β -地贫基因治疗的产品上市, 但已有多家公司申请“新药临床研究审批”

(investigational new drug, IND), 并获得中国国家药品监督管理局药品评审中心的临床试验默示许可, 即 IND 获批 (表 2)。深圳市禾沐基因生物技术有限责任公司 (以下简称“禾沐基因”) 研发了针对输血依赖型 β -地贫的药物 HGI-001, 在“研究者发起的临床试验” (investigator-initiated clinical trial, IIT) 试验中, 5 例完成 HGI-001 回输的患者均已无需输血治疗, 摆脱输血时间长达 34 个月 (截至 2023 年 12 月), 并且未发现与基因治疗相关的副作用。中吉智药 (南京) 生物技术有限公司 (以下简称“中吉智药”) 研发了针对输血依赖型 β -地贫的药物 GMCN508B, 该药物在病毒载体结构设计和生产工艺上进行了优化, 在 IIT 试验中, 2 例完成细胞回输的患者均已摆脱输血治疗, 并且未发现与基因治疗相关的副作用, 目前患者还在随访观察中。上海本导基因技术有限公司 (以下简称“本导基因”) 的“BD-211 自体 CD34⁺造血干细胞注射液”是一款基于本导基因下一代慢病毒载体平台 BDlenti 打造的基因修饰自体造血干细胞 β -地贫治疗药物, 已有 2 例 β^0/β^0 重症患者接受 BD-211 的回输治疗, 且随访周期超过 2 年, 初步证明其安全性和有效性。康霖生物科技 (杭州) 有限公司 (以下简称“康霖生物”) 的“KL003 细胞注射液”也是基于慢病毒载体平台打造的基因修饰自体造血干细胞 β -地贫治疗药物, 目前已完成 17 例患者的回输治疗, 最早接受治疗的患者摆脱输血已超过 2 年。

表 1 国际上已上市和开展 III 期临床试验的 β -地贫基因治疗产品

临床试验登记号	起始年份	受试者数量及年龄	受试者基因型	临床试验结果	产品名称	公司	上市时间和地区	基因治疗作用机制
NCT02906202 (III 期完成)	2016 年	23 例, ≤50 岁	非 β^0/β^0	20 例 摆脱输血依赖	Zynteglo (Beti-cel, BB305)	Bluebird	2019 年欧盟, 2022 年美国	利用慢病毒载体介导 β -珠蛋白的基因替代
NCT03207009 (III 期完成)	2017 年	18 例, ≤50 岁	β^0/β^0 、 $\beta^0/IVS-I-110$ 、 $IVS-I-110$ 纯合	—	同上	同上	同上	同上
NCT03655678 (III 期进行中)	2018 年	44 例, 12~35 岁	其中 26 例 β^0/β^0 、 $\beta^0/IVS-I-110$ 、 $IVS-I-110$ 纯合	42 例 摆脱输血依赖	Casgevy (Exa-cel, CTX001)	Vertex Pharmaceuticals 和 CRISPR Therapeutics	2023 年 英国	通过 CRISPR/Cas9 基因编辑提高 HbF 的合成

表2 国内已经通过和正在申请IND的 β -地贫基因治疗产品和公司

临床试验 登记号	临床试 验阶段	起始 年份	靶基因	产品名称	公司	基因治疗作用机制
NCT05864170	IND通过	—	<i>HBB</i>	HGI-001	禾沐基因	利用慢病毒载体介导 β -珠蛋白的基因替代
NCT05015920	IND通过	—	<i>HBB</i>	BD-211	本导基因	同上
NCT05860595	IND通过	—	<i>HBB</i>	KL003	康霖生物	同上
NCT05762510	IND通过	—	<i>HBB</i>	GMCN508B	中吉智药	同上
NCT05752123 NCT04390971 NCT04925206	II期临床	2021年	<i>BCL11A</i> 红系增强子	ET-01	博雅辑因	通过CRISPR/Cas9基因 编辑提高HbF的合成
—	IND通过	—	<i>HGB1/HGB2</i> 启动子	RM-001	瑞风生物	同上
NCT04211480 NCT04205435	I/II期临床	2022年	<i>BCL11A</i> 红系增强子	BRL-101	邦耀生物	同上
NCT06024876	Pre-IND	—	<i>HGB1/HGB2</i> 启动子	CS-101	正序生物	通过tBE碱基编辑器 提高HbF的合成

2 胎儿期 γ -珠蛋白的重新激活表达

人体内Hb组成从胚胎时期到成人共经历两次转换^[19]: (1)从胚胎期以 $\zeta_2\epsilon_2$ 为主转换到胎儿期以 $\alpha_2\gamma_2$ 为主,即胎儿血红蛋白(fetal hemoglobin, HbF); (2)从胎儿期HbF转换到出生后以 $\alpha_2\beta_2$ 为主,即成人血红蛋白(adult hemoglobin, HbA)。正常情况下, γ -珠蛋白在新生儿体内迅速减少至1%以下。由于观察到 γ -珠蛋白水平异常升高的镰状细胞贫血症(sickle cell disease, SCD)患者的病程较轻,人们对 γ -珠蛋白基因产生了兴趣并进行了深入研究^[20-21]。通过羟基脲(FDA批准的一种治疗 β -地贫的药物)诱导HbF表达来治疗SCD以及 β -地贫患者,成功减少了患者临床不良事件的发生^[22-23]。随着对 γ -珠蛋白基因表达调控分子机制的了解加深,通过改变珠蛋白调控相关转录因子的水平,促进 γ -珠蛋白链合成已被认为是治疗 β -地贫的新途径。

尽管许多转录阻遏蛋白与 γ -珠蛋白基因沉默有关,但在体内起主要作用的两种阻遏蛋白分别是B-细胞淋巴瘤因子11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A, BCL11A)和含7A的锌指和BTB结构域(zinc-finger- and BTB-domain-containing 7A, ZBTB7A),而BCL11A是HbF表达的主要调控因子^[24-25]。BCL11A是BCL家族Kruppel样转录因子,早期研究发现,BCL11A主要参与T、B淋巴细胞生成和神经发育过程^[26-27],因此直接破坏BCL11A会导致严重的后果。全基因组关联分析(genome-wide associa-

tion studies, GWAS)发现,位于2号染色体的BCL11A基因的rs11886868位点单核苷酸多态性与地贫患者体内HbF异常表达与疾病的严重程度高度相关^[24]。在红系细胞中,BCL11A的主要作用是抑制 γ -珠蛋白基因的表达^[28],通过结合在 β -珠蛋白基因簇上的基因间区和LCR区的HS3位点^[29]以及 γ -珠蛋白基因启动子区域-115位点的TGACCA序列^[30-31]发挥功能。针对BCL11A的基因治疗策略也已经成为 β -地贫基因治疗的热点,包括 γ -珠蛋白基因启动子区BCL11A结合位点破坏、BCL11A红系特异性增强子破坏等。

2.1 γ -珠蛋白基因启动子区BCL11A结合位点破坏

转录阻遏蛋白BCL11A和LRF/ZBTB7A通过与 γ -珠蛋白基因HBG1和HBG2启动子中的顺式调控元件结合来介导 γ -珠蛋白到 β -珠蛋白表达的围产期转换,抑制这些阻遏蛋白与其在成体红细胞前体中的靶标的结合,可以重新激活 γ -珠蛋白的表达,生成HbF^[25]。OTQ923是由Intellia和诺华合作开发的基因编辑疗法,其通过CRISPR/Cas9有针对性地破坏HBG1和HBG2基因启动子区域,造成 γ -珠蛋白基因+246位开始5 kb的基因间缺失,增加HbF表达,并在一项针对SCD的临床研究(NCT04443907)中,有效减轻了SCD患者临床症状,但目前还未发布 β -地贫相关临床研究计划。CRISPR/Cas9编辑HBG1和HBG2启动子中的远端CCAAT盒也可以重新激活 γ -珠蛋白的表达。广州瑞风生物技术公司研发团队报告了基于CCAAT盒破坏的药物RM-

001的初步临床效果,已经有7例TDT患者接受了RM-001的治疗,其中5例随访时间超过15个月,所有患者在输注RM-001后1个月内停止浓缩红细胞输注,并在报告期内保持无输注,观察期超过6个月的所有患者Hb仅由HbF(97.6%~99.8%)和HbA₂组成,前4例患者在回输18个月时的平均HbF为11 g/dL(10.9~11.3 g/dL),同时没有RM-001相关或可能相关的严重不良事件的报告^[32]。

Edit-301是美国Editas公司基于CRISPR-Cas12a开发的同样针对*HBG1*和*HBG2*基因启动子区域CCAAT盒进行基因敲除的药物,Editas研发团队发现Cas12a相比Cas9拥有更好的特异性和更高的编辑效率,并在临床前动物实验中检测到纯化的红细胞中平均40%~50%的HbF的稳定表达^[33-34]。针对TDT的临床试验(NCT05444894)正在开展中,2例TDT患者已进行Edit-301回输治疗。患者1在治疗后20天停止接受浓缩红细胞输注,HbF浓度达7.2 g/dL,患者2也表现出早期改善,更多数据还在持续收集。

2.2 *BCL11A*红系特异性增强子的破坏

锌指核酸酶(zinc-finger nuclease, ZFN)和CRISPR/Cas9介导的*BCL11A*基因红系特异增强子破坏可导致*BCL11A*表达下调,诱导HbF的生成,使Hb转换逆转^[35-37]。ST-400是Sangamo Therapeutics公司基于ZFN编辑策略开发的HbF诱导表达的药物,其I/II期临床研究(NCT03432364)中治疗的3例患者的外周血中均检测到目标基因的编辑和HbF表达的提升,但在报道期内暂未观察到患者摆脱输血依赖^[38]。华东师范大学和上海邦耀生物科技有限公司刘明耀团队通过CRISPR/Cas9靶向破坏+58 kb *BCL11A*红系特异性增强子GATA1结合位点,成功上调 γ -珠蛋白的表达^[39-40]。在针对TDT的药物BRL-101的I/II期临床试验(NCT04211480、NCT04205435)中共计报道了6例患者(包括4例 β^0/β^0)数据,所有患者在接受BRL-101治疗后均不再进行输血治疗,HbF在6个月内增至90%以上,经编辑的HSPCs保留多谱系分化能力,患者外周血单个核细胞的编辑频率增至60%以上(表2),提示采用CRISPR/Cas9编辑+58 kb *BCL11A*红系特异性增强子GATA1结合位点治疗TDT的有效性^[41]。

目前进展最快的是由CRISPR Therapeutics和

Vertex Pharmaceuticals主导的Exagamglogene autotemcel(Exa-cel,也称为CTX001),同样是采用CRISPR/Cas9介导*BCL11A*红系特异性增强子GATA1结合位点编辑的药物^[42]。在2022年美国血液学年会上,Exa-cel针对TDT患者临床试验(CLIMB THAL-111、NCT03655678)的最新数据被展示出来,接受Exa-cel治疗的TDT患者共44例,其中26例(59.1%)患者具有 β^0/β^0 或 β^0/β^0 样基因型($\beta^0/IVS-I-110$ 、 $IVS-I-110/IVS-I-110$)。在治疗前的2年内,患者平均每年接受36.0(15.0~71.0)单位的RBCs,接受Exa-cel治疗后,42例患者不再接受血红细胞输注,另外两例患者尚未停止输血,但输血量分别降低了75%和89%。治疗后第3个月,HbF和平均总Hb水平增加(>9 g/dL),此后平均总Hb水平增加到并保持在>11 g/dL。在第6个月,骨髓CD34⁺HSPCs和外周血单个核细胞中被编辑的*BCL11A*等位基因的平均比例分别为74.3%和63.4%,在随访 ≥ 1 年的所有患者中,这些比例保持稳定^[43]。两例患者发生严重不良反应,但均已解决,认为与Exa-cel和白消安有关。没有死亡、停药或恶性肿瘤的发生。2023年11月,英国药品和保健产品监管机构批准了CRISPR/Cas9基因编辑疗法CASGEVY™(Exa-cel)的有条件上市许可,可以用于治疗无法获得HLA匹配造血干细胞的输血依赖型地贫患者^[44],这也是CRISPR基因疗法全球首款获批药物,是具有里程碑的标志性事件(表1)。此前Exa-cel还曾获FDA授予治疗SCD和TDT的再生医学先进疗法认定、快速通道资格、孤儿药资格和罕见儿科疾病认定。

*BCL11A*红系特异性增强子区域中的GATA1结合位点破坏可显著诱导患者产生HbF,其相邻的TAL1-GAT1结合位点内CTG基序也有相似的作用而被作为基因编辑靶标。ET-01是博雅辑因公司基于以上原理开发的 β -地贫治疗药物(表2),目前仅报道了1例患者ET-01的临床试验(NCT04390971)数据,治疗后患者的HbF产量和总Hb显著增加,其中HbF水平分别从基线时的0.34 g/dL增加到8.99 g/dL,总Hb水平在第18个月时达到11.0 g/dL,患者在输注ET-01后第87天接受了最后一次浓缩红细胞输注,并在超过15个月的时间内未进行红细胞输注。对42个潜在脱靶位点的NGS分析显示,编辑

效率低于1%,在整个回访过程中,42个位点均未观察到显著变化。这些初步结果支持ET-01治疗TDT的进一步临床试验^[45]。

2.3 利用碱基编辑技术改变BCL11A结合位点核心序列

碱基编辑是一种基于CRISPR/Cas9系统开发的针对单个碱基进行替换的方法。目前最常用的包括腺嘌呤碱基编辑器(adenine base editor, ABE)和胞嘧啶碱基编辑器(cytosine base editor, CBE),可以实现A→T或者C→G的转换而不引起DNA双链断裂(DNA double-strand break, DSB),从而避免由于DSB带来的潜在风险。碱基编辑器可以实现对突变位点碱基的校正,在不更改原本基因序列的情况下实现对疾病的治疗^[46-47],但考虑到β-地贫突变类型超过400种,针对每一种突变类型进行碱基校正将会是一项复杂的工作,而γ-珠蛋白诱导表达可能让绝大多数β-地贫患者获益。研究发现,针对BCL11A识别位点的核心序列或BCL11A的增强子序列进行碱基替换同样可以诱导γ-珠蛋白的稳定高表达^[39,48]。BEAM公司开发的BEAM-101采用ABE碱基编辑器,靶向HBG1和HBG2基因启动子区域,通过实现A→G碱基替换,破坏相应转录因子对HbF的负调控作用,从而上调γ-珠蛋白的表达。在一项针对SCD的临床前研究中,BEAM-101实现了超过90%的等位基因被编辑,HbF水平上调,占比超过总Hb的60%,并且致病蛋白HbS显著降低。BEAM-101针对SCD的临床研究(NCT05456880)正处在患者招募阶段,也将发布针对β-地贫的临床研究方案。另有国内团队采用tBE碱基编辑器对HBG1和HBG2启动子区BCL11A结合位点核心序列进行碱基替换,并发现tBE介导的针对TGACCA中C→T的替换能够彻底破坏BCL11A的结合,而ABE介导的A→G的碱基替换仅影响了部分结合,采用tBE编辑后的HSC能够诱导更多的γ-珠蛋白的表达^[49]。目前正序生物正对该研究成果进行临床转化,针对β-地贫的临床研究(NCT06024876)正在进行中(表2)。

3 总结与展望

β-地贫的基因治疗近年来取得了重大进展(图2)。

通过病毒载体进行基因添加是治疗基因缺陷型遗传病的传统研究模式,却通常因编码目的基因的元件过大、病毒载体转染效率低等问题,导致目的基因在靶细胞中表达水平过低而无法满足临床应用需求。目的基因片段随机整合到基因组内部,还可能导致某些功能基因的失活,引发其它的安全问题。近年来,慢病毒载体应用日趋成熟,国内外多家药物研发机构开发了慢病毒载体介导β-珠蛋白表达的药物(表1和表2),受试者体内均检测到了不同程度的β珠蛋白表达水平的提升,并且已报道的上百例临床试验数据中,还暂未发现与载体插入有关的恶性疾病发生的报道。然而,在已有的研究中,慢病毒载体介导的外源β-珠蛋白在单个红细胞中表达水平仍然是有限的,这使得部分β⁰/β⁰患者依然不足以摆脱输血依赖。采用基因编辑的方式降低红系特异性的BCL11A阻遏蛋白的表达,或者破坏BCL11A在γ-珠蛋白启动子区域的结合位点,可以诱导γ-珠蛋白的大量表达。利用HbF来替换HbA,降低红细胞中α-珠蛋白和β-类珠蛋白的不平衡,可以减少游离α-珠蛋白形成的四聚体对红细胞前体的损伤。大多数β-地贫患者通过治疗可以摆脱输血依赖,但是否彻底治愈还有待探讨,HbF持续表达在临床上也属于Hb疾病的一种,HbF拥有比HbA更强的氧结合能力,高表达HbF对患者长期生活的影响,尤其对女性患者妊娠期胎儿的影响还有待观察。mRNA或者核糖核蛋白形式的CRISPR/Cas系统能够介导瞬时的、高效的基因组DNA靶向插入和缺失,诱导目的DNA功能的改变,达到疾病治疗的目的,但CRISPR介导的碱基插入和缺失具有较高的随机性,插入或丢失片段大小不一,双链断裂同样可能引起染色体易位而带来安全性问题^[50]。碱基编辑器能够在不引入双链断裂的情况下进行单个碱基或者小段DNA序列的替换,替换后的DNA序列更为可控,可以恢复成野生型的序列,也可以根据设计要求进行改变,未来有可能成为一种更加安全的遗传病基因治疗方式。

目前针对α-地贫的基因治疗,在国际上未受到重视,由于普遍认为轻型α-地贫无需治疗,重型α-地贫胎儿围产期致死,并且低估了大量输血依赖型α-地贫患者的治疗需求,导致研发资金投入极少,更没有相关基因治疗药物的上市。但是,在东南亚和

我国南方地区,包括广东、广西和云南等, α -地贫是影响最大、发病率最高的遗传病之一,并且其基因突变类型具有明显的种族特征和地域差异,临床需求迫切。禾沐基因和中吉智药基于前期开发 β -地贫基因治疗药物的经验,利用慢病毒介导的 α -珠蛋

白的基因替代疗法,分别开发了针对 α -地贫的基因治疗药物(表3),并申请了IIT临床试验,这是国内药物研发机构在 α -地贫基因治疗药物开发道路上迈出的重要一步。

表3 国内开展 α -地贫IIT临床试验的产品和公司

临床试验登记号	临床阶段	药物	公司	靶基因	作用机制
NCT05851105	I期(进行中)	HGI-002	禾沐基因	HBA	利用慢病毒载体介导 α -珠蛋白的基因替代
NCT05757245	I期(募集)	GMCN508A	中吉智药	HBA	同上

参考文献:

[1] KATTAMIS A, FORNI G L, AYDINOK Y, et al. Changing patterns in the epidemiology of β -thalassemia[J]. European journal of haematology, 2020, 105(6): 692-703.

[2] PIEL F B, WEATHERALL D J. The alpha-thalassemias [J]. The New England journal of medicine, 2014, 371(20): 1908-1916.

[3] VICHINSKY E. Complexity of alpha thalassemia: growing health problem with new approaches to screening, diagnosis, and therapy[J]. Annals of the New York academy of sciences, 2010, 1202: 180-187.

[4] WEATHERALL D J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden[J]. Blood, 2010, 115(22): 4331-4336.

[5] ZHAO P, WENG R, WU H. Molecular spectrum of α - and β -thalassemia mutations in a large ethnic hakka population in Southern China[J]. Hemoglobin, 2018, 42(2): 117-121.

[6] MUNCIE H L, CAMPBELL J. Alpha and beta thalassemia [J]. American family physician, 2009, 80(4): 339-344.

[7] BORGNA-PIGNATTI C, RUGOLOTTO S, DE STEFANO P, et al. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine[J]. Haematologica, 2004, 89(10): 1187-1193.

[8] 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[J]. Haematologica, 2014, 99(5): 811-820.

[9] SADELAIN M, BOULAD F, GALANELLO R, et al. Therapeutic options for patients with severe beta-thalassemia: the need for globin gene therapy[J]. Human gene therapy, 2007, 18(1): 1-9.

[10] FERRARI G, THRASHER A J, AIUTI A. Gene therapy using haematopoietic stem and progenitor cells[J]. Nature reviews genetics, 2021, 22(4): 216-234.

[11] ARLET J B, RIBEIL J A, GUILLEM F, et al. HSP70 sequestration by free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia[J]. Nature, 2014, 514(7521): 242-246.

[12] GOODMAN M A, MALIK P. The potential of gene therapy approaches for the treatment of hemoglobinopathies: achievements and challenges[J]. Therapeutic advances in hematology, 2016, 7(5): 302-315.

[13] KOLATA G B, WADE N. Human gene treatment stirs new debate[J]. Science, 1980, 210(4468): 407.

[14] BANK A, DORAZIO R, LEBOULCH P. A phase I/II clinical trial of beta-globin gene therapy for beta-thalassemia [J]. Annals of the New York academy of sciences, 2005, 1054: 308-316.

[15] CAVAZZANA-CALVO M, PAYEN E, NEGRE O, et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia[J]. Nature, 2010, 467(7313): 318-322.

[16] MALIK P. Gene Therapy for Hemoglobinopathies: Tremendous Successes and Remaining Caveats[J]. Molecular therapy: The journal of the American society of gene therapy, 2016, 24(4): 668-670.

[17] NEGRE O, BARTHOLOMAE C, BEUZARD Y, et al. Pre-clinical evaluation of efficacy and safety of an improved lentiviral vector for the treatment of β -thalassemia and sickle cell disease[J]. Current gene therapy, 2015, 15(1):

- 64-81.
- [18] THOMPSON A A, WALTERS M C, KWIATKOWSKI J, et al. Gene therapy in patients with transfusion-dependent β -thalassemia[J]. *The New England journal of medicine*, 2018, 378(16): 1479-1493.
- [19] SANKARAN V G, ORKIN S H. The switch from fetal to adult hemoglobin[J]. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, 2013, 3(1): a011643.
- [20] POWARS D R, WEISS J N, CHAN L S, et al. Is there a threshold level of fetal hemoglobin that ameliorates morbidity in sickle cell anemia?[J]. *Blood*, 1984, 63(4): 921-926.
- [21] PLATT O S, BRAMBILLA D J, ROSSE W F, et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1994, 330(23): 1639-1644.
- [22] ALEBOUYEH M, MOUSSAVI F, HADDAD-DEYLAMI H, et al. Hydroxyurea in the treatment of major beta-thalassemia and importance of genetic screening[J]. *Annals of hematology*, 2004, 83(7): 430-433.
- [23] STEINBERG M H, BARTON F, CASTRO O, et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment [J].*The journal of the American medical association*, 2003, 289(13): 1645-1651.
- [24] UDA M, GALANELLO R, SANNA S, et al. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of β -thalassemia[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, 2008, 105(5): 1620-1625.
- [25] MASUDA T, WANG X, MAEDA M, et al. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin[J]. *Science*, 2016, 351(6270): 285-289.
- [26] LIU P, KELLER J R, ORTIZ M, et al. Bcl11a is essential for normal lymphoid development[J]. *Nature immunology*, 2003, 4(6): 525-532.
- [27] SATTERWHITE E, SONOKI T, WILLIS T G, et al. The BCL11 gene family: involvement of BCL11A in lymphoid malignancies[J]. *Blood*, 2001, 98(12): 3413-3420.
- [28] SANKARAN V G, MENNE T F, XU J, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A[J]. *Science*, 2008, 322(5909): 1839-1842.
- [29] XU J, SANKARAN V G, NI M, et al. Transcriptional silencing of $\{\gamma\}$ -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6[J]. *Genes & development*, 2010, 24(8): 783-798.
- [30] LIU N, HARGREAVES V V, ZHU Q, et al. Direct promoter repression by BCL11A controls the fetal to adult hemoglobin switch[J]. *Cell*, 2018, 173(2): 430-442.
- [31] MARTYN G E, WIENERT B, YANG L, et al. Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of BCL11A or ZBTB7A binding[J]. *Nature genetics*, 2018, 50(4): 498-503.
- [32] LIU R, WANG L, XU H, et al. Safety and efficacy of RM-001 (autologous HBG1/2 promoter-modified CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells) in patients with transfusion-dependent β -thalassemia[J]. *Blood*, 2023, 142(Supplement 1): 4994.
- [33] ZHANG L, ZURIS J A, VISWANATHAN R, et al. As-Cas12a ultra nuclease facilitates the rapid generation of therapeutic cell medicines[J]. *Nature communications*, 2021, 12(1): 3908.
- [34] DE DREUZY E, HEATH J, ZURIS J A, et al. EDIT-301: An experimental autologous cell therapy comprising Cas12a-RNP modified mPB-CD34⁺ cells for the potential treatment of SCD[J]. *Blood*, 2019, 134(Supplement 1): 4636.
- [35] URNOV F D, REIK A, VIERSTRA J, et al. Clinical-scale genome editing of the human BCL11A erythroid enhancer for treatment of the hemoglobinopathies[J]. *Blood*, 2015, 126(23): 204.
- [36] CANVER M C, SMITH E C, SHER F, et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis[J]. *Nature*, 2015, 527(7577): 192-197.
- [37] SMITH E C, LUC S, CRONEY D M, et al. Strict in vivo specificity of the Bcl11a erythroid enhancer[J]. *Blood*, 2016, 128(19): 2338-2342.
- [38] SMITH A R, SCHILLER G J, VERCELLOTTI G M, et al. Preliminary results of a phase 1/2 clinical study of zinc finger nuclease-mediated editing of BCL11A in autologous hematopoietic stem cells for transfusion-dependent beta thalassemia[J]. *Blood*, 2019, 134(Supplement 1): 3544.
- [39] WU Y, ZENG J, ROSCOE B P, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells [J]. *Nature medicine*, 2019, 25(5): 776-783.
- [40] FU B, LIAO J, CHEN S, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene editing of the BCL11A enhancer for pediatric β 0/ β 0

- transfusion-dependent β -thalassemia[J]. *Nature medicine*, 2022, 28(8): 1573-1580.
- [41] FU B, ZHANG X, WANG L, et al. S271: An updated follow-up of BRL-101, CRISPR-Cas9-mediated gene editing of the BCL11A enhancer for transfusion-dependent β -thalassemia[J]. *HemaSphere*, 2023, 7: e406095b.
- [42] FRANGOUL H, ALTSHULER D, CAPPELLINI M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β -thalassemia[J]. *The New England journal of medicine*, 2021, 384(3): 252-260.
- [43] LOCATELLI F, LANG P, LI A, et al. Efficacy and safety of a single dose of exagamglogene autotemcel for transfusion-dependent β -thalassemia[J]. *Blood*, 2022, 140(Supplement 1): 4899-4901.
- [44] WONG C. UK first to approve CRISPR treatment for diseases: what you need to know[J]. *Nature*, 2023, 623(7988): 676-677.
- [45] SHI J, FANG R, GAO Z, et al. Preliminary safety and efficacy results of EDI001: An investigator initiated trial on CRISPR/Cas9-modified autologous CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells for patients with transfusion dependent β -thalassemia[J]. *Blood*, 2022, 140(Supplement 1): 10652-10653.
- [46] HARDOUIN G, ANTONIOU P, MARTINUCCI P, et al. Adenine base editor-mediated correction of the common and severe IVS1-110 (G>A) β -thalassemia mutation[J]. *Blood*, 2023, 141(10): 1169-1179.
- [47] BADAT M, EJAZ A, HUA P, et al. Direct correction of haemoglobin E β -thalassaemia using base editors[J]. *Nature communications*, 2023, 14(1): 2238.
- [48] LI C, GEORGAKOPOULOU A, MISHRA A, et al. In vivo HSPC gene therapy with base editors allows for efficient reactivation of fetal γ -globin in β -YAC mice[J]. *Blood advances*, 2021, 5(4): 1122-1135.
- [49] HAN W, QIU H Y, SUN S, et al. Base editing of the HBG promoter induces potent fetal hemoglobin expression with no detectable off-target mutations in human HSCs[J]. *Cell stem cell*, 2023, 30(12): 1624-1639.
- [50] FROCK R L, HU J, MEYERS R M, et al. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases[J]. *Nature biotechnology*, 2015, 33(2): 179-186.

本文引用格式:

陈 辉, 贾玉艳, 黄 粤, 等. 地中海贫血基因治疗进展和现状[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(1): 1-10. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.01.001

CHEN H, JIA Y Y, HUANG Y, et al. Progress and current status of gene therapy for thalassemia[J]. *Journal of Guangxi medical university*, 2024, 41(1): 1-10. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.01.001