

Estado actual de la terapia génica de enfermedades hematológicas hereditarias

A review of gene therapy for hereditary blood disorders

Juan A. Bueren

Jefe de la División de Terapias Innovadoras del Sistema Hematopoyético
CIEMAT, CIBER de Enfermedades Raras e IIS Fundación Jiménez Díaz.

Resumen

El desarrollo de vectores autoinactivados está ofreciendo resultados clínicos de eficacia incuestionable y de muy alta seguridad, pues en ninguno de los estudios clínicos en marcha se han evidenciado eventos adversos severos asociados al tratamiento. Como consecuencia de ello, en el año 2016 se aprobó el primer medicamento de terapia génica basado en un vector retroviral: Strimvelis. En virtud de los resultados de los estudios clínicos en marcha, es de prever que en los próximos años seguirán registrándose numerosos otros medicamentos génicos y que la terapia génica constituya el tratamiento de elección de enfermedades monogénicas de las células sanguíneas.

Palabras clave: Bioética, Ética clínica, Ensayos clínicos, Terapia génica, Enfermedades hematológicas

Abstract

The development of self-inactivated vectors is offering clinical results of unquestionable efficacy and very high safety, since none of the ongoing clinical studies have shown severe adverse events associated with the treatment. As a result of this, the first gene therapy drug based on a retroviral vector, *Strimvelis*, was approved in 2016. On the basis of the results of current clinical studies, it is expected that numerous other gene medicines will be approved in the next years, and that gene therapy will be the treatment of choice for several monogenic diseases of the blood.

Keywords: Bioethics, Clinical Ethics, Clinical trial, Gene therapy, Blood disorders

Introducción

La posibilidad de introducir genes en células de pacientes ha permitido desarrollar novedosos protocolos de terapia génica de enfermedades hereditarias y adquiridas, que están mostrando marcada eficacia terapéutica y elevada seguridad. Este hecho es particularmente evidente en diferentes patologías que afectan al sistema hematopoyético (Booth, Gaspar, & Thrasher, 2016).

En el caso de las enfermedades que afectan al sistema hematopoyético, la aproximación más eficaz se fundamenta en la transducción *ex vivo* de las células madre hematopoyéticas (CMH), las únicas con capacidad de autorenovación y pluripotencia, mediante vectores que permiten la integración estable del gen terapéutico en el genoma de estas células.

Para ello, las CMHs del paciente han de extraerse de la médula ósea, y purificarse mediante sistemas inmunomagnéticos habitualmente utilizados en los Servicios de Trasplante Hematopoyético. A continuación, estas células se incuban *in vitro* con el vector seleccionado para facilitar la integración del gen terapéutico en las CMHs. Finalizado este proceso, las células madre “curadas” del defecto genético son reinfundidas en el paciente. En función de la patología a tratar, como paso previo a la infusión, los pacientes pueden recibir un tratamiento de acondicionamiento con quimioterapia para eliminar las CMHs endógenas, para facilitar el anidamiento de las células corregidas en los nichos vacíos de la médula ósea.

Estado actual de la terapia génica de los principales ensayos clínicos en marcha

Existen unas treinta enfermedades monogénicas que se vienen tratando mediante trasplante hematopoyético alogénico. Debido a las limitaciones en la disponibilidad de donantes, así como a la morbilidad y mortalidad asociada a estos trasplantes, la infusión de CMHs autólogas corregidas genéticamente se está considerando una atractiva alternativa al trasplante alogénico.

A continuación se recoge el estado actual de los ensayos clínicos de terapia génica más significativos que se están realizando sobre diferentes enfermedades hematológicas, en particular sobre enfermedades monogénicas recesivas. Para ello se

El desarrollo de una nueva familia de vectores retrovirales y lentivirales autoinactivados está mostrando no sólo marcada eficacia, sino también muy alta seguridad para corregir defectos genéticos en células madre del sistema hematopoyético.

presentarán los resultados mostrados en tres reuniones científicas recientes, como son los Congresos de las Sociedades Europea y Americana de Terapia Génica y Celular (Florencia, Octubre de 2016; Washington, Mayo de 2017), y los *Spring School* de la Sociedades Europea y Española de Terapia Génica (Granada, Abril de 2017).

Immunodeficiencia SCID-X1:

La inmunodeficiencia severa combinada asociada a mutaciones en el gen que codifica la cadena gamma común (γ_c) del receptor de interleuquinas IL-2, 4, 7, 9, 15 y 21 (SCID-X1) constituye una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X. Representa aproximadamente la mitad de todas las inmunodeficiencias severas combinadas y tiene una prevalencia de entre 10-20 pacientes por millón.

La terapia génica de estos pacientes se realiza mediante la infusión de las CMHS autólogas corregidas genéticamente, sin que los pacientes reciban acondicionamiento previo. Este protocolo, desarrollado en primer lugar en París por los Drs. Alain Fischer y Marina Cavazzana, constituye el primer protocolo de terapia génica de una enfermedad monogénica que ha demostrado eficacia terapéutica incuestionable (Cavazzana-Calvo et al., 2000). El equipo del Dr. Adrian Thrasher en Londres también obtuvo una elevada eficacia terapéutica en el tratamiento de estos pacientes (Salima Hacein-Bey-Abina et al., 2002).

A pesar de que el 90% de los pacientes mostró una evidente mejoría clínica, 6 de los 20 pacientes tratados han desarrollado leucemia linfocítica (S. Hacein-Bey-Abina et al., 2003), si bien 5 de estos pacientes han respondido satisfactoriamente al tratamiento antitumoral.

Estudios posteriores evidenciaron que los vectores retrovirales se insertan preferentemente en la proximidad del origen de la transcripción de genes (Wu, Li, Crise, & Burgess, 2003), (Schroder et al., 2002). Este hecho y la elevada potencia de transactivación de las secuencias repetidas terminales (LTR) presentes en los vectores retrovirales explicaron la genotoxicidad observada en estos dos ensayos clínicos.

Con objeto de minimizar los riesgos de genotoxicidad, los equipos de los Drs. Thrasher, Kohn, Cavazzana y Williams pusieron en marcha un nuevo ensayo clínico con un vector retroviral autoinactivado, es decir, en el que la secuencia *enhancer* de las LTR se había inactivado. Como secuencia reguladora del gen terapéutico, en este vector se utilizó el promotor del gen del Factor de Elongación 1-alfa (*EF1 α*). Con este nuevo vector se han tratado 13 pacientes, habiéndose alcanzado una supervivencia libre de enfermedad superior al 90%, con un seguimiento de hasta 4 años (S. Hacein-Bey-Abina et al., 2014).

Debido a la eficacia y seguridad ofrecidas por los vectores lentivirales desarrollados por los Drs. Naldini, Trono y Verma (Montini et al., 2006; Naldini et al., 1996), una gran parte de los ensayos clínicos recientes vienen utilizando este nuevo tipo de vectores. Así, en el ensayo clínico dirigido por el Dr. Harry Malech del NHI de EEUU sobre pacientes X1-SCID se utilizó un vector lentiviral autoinactivado que también poseía como promotor el del gen *EF1 α* (De Ravin et al., 2016). En este ensayo se realizó la infusión de las células corregidas tras acondicionamiento submieloablativo en 3 pacientes adultos y 2 pediátricos, observándose el rescate de la función inmune en todos los pacientes tratados, incluyendo los pacientes adultos.

Es de destacar que en ninguno de los ensayos en los que se han tratado pacientes X1-SCID con vectores retro o lentivirales autoinactivados se han observado efectos

genotóxicos similares a los generados con los vectores retrovirales de primera generación.

Immunodeficiencia ADA-SCID:

La inmunodeficiencia severa combinada producida por mutaciones en el gen *ADA*

Los ensayos clínicos basados en la infusión de células madre hematopoyéticas corregidas genéticamente vienen evidenciando gran eficacia terapéutica, y mínimos riesgos en pacientes con inmunodeficiencias y otras enfermedades hematológicas congénitas.

(ADA-SCID) constituye una enfermedad autosómica recesiva con una prevalencia de 1-5/1.000.000. Esta enfermedad fue una de las primeras en ser tratadas

mediante terapia génica con vectores retrovirales, primero en el NIH de Estados Unidos (Blaese et al., 1995; Kohn et al., 1998), y luego en el Hospital S. Raffaele de Milán (Aiuti et al., 2002; Bordignon et al., 1993; Ferrari et al., 1992). Los mejores resultados se obtuvieron por el grupo de Milán, dirigido por el Dr. A. Aiuti como consecuencia de retirar la administración de la proteína recombinante ADA, y de realizar un acondicionamiento submieloablativo de los pacientes, como paso previo a la infusión de las células CD34⁺ transducidas (Aiuti & Roncarolo, 2009; Aiuti et al., 2002).

En la actualidad se han tratado un total de 42 pacientes con este vector, habiéndose alcanzado una supervivencia del 100% y una eficacia terapéutica del 75% (pacientes libres de terapia de replazamiento).

Ante los beneficios clínicos observados en estos pacientes, el vector retroviral ADA desarrollado por el equipo del Dr. Aiuti recibió en 2016 la autorización de la Agencia Europea del Medicamento para ser registrado como Medicamento de uso clínico, bajo la denominación de *Strimvelis* (Aiuti, Roncarolo, & Naldini, 2017).

A pesar de que el vector retroviral utilizado para pacientes ADA-SCID no estaba autoinactivado, a diferencia de lo que ocurrió en pacientes X1-SCID, en ninguno de estos pacientes se han observado fenómenos de genotoxicidad. No obstante, para mejorar aún más la seguridad de este protocolo de terapia génica se generó un vector lentiviral autoinactivado, en donde el gen *ADA* estaba regulado por el promotor *EF1 α* . Con este vector se han tratado 43 pacientes, habiéndose obtenido también una supervivencia del 100%. Más aún, todos estos pacientes, excepto uno, están actualmente libres de terapia de replazamiento.

Es muy significativo el hecho de que ninguno de los pacientes ADA-SCID tratados por terapia génica, ni siquiera los tratados con los vectores retrovirales de primera generación, hayan mostrado evidencias de genotoxicidad, evidenciando la seguridad asociada a la terapia génica de esta patología.

Síndrome de Wiscott-Aldrich (WAS):

Se trata de una enfermedad ligada al cromosoma X, con una prevalencia de 1-10/1.000.000. Los enfermos con WAS padecen sangrados, eccemas, infecciones, enfermedades autoinmunes y predisposición leucémica. En el ensayo clínico coordinado por el Dr. Christopher Klein en Alemania se trataron 10 pacientes con un vector retroviral de primera generación. Aunque en este ensayo se observaron beneficios clínicos iniciales (Boztug et al., 2010), 7 de los 10 pacientes tratados mostraron eventos adversos severos por la genotoxicidad del vector, reflejados en el desarrollo de síndromes leucémicos en 7 pacientes (Boztug et al., 2010).

Para aumentar la seguridad de este ensayo, se desarrollaron dos vectores en donde el gen WASP se regulaba por secuencias de su propio promotor. Tras los primeros resultados del equipo del H. San Raffaele en los que se mostraba la seguridad y eficacia de este nuevo ensayo (Aiuti et al., 2013), en otro ensayo reciente realizado por un Consorcio Europeo y Estadounidense se han tratado 13 pacientes con un vector lentiviral análogo. Doce de los 13 pacientes tratados están libres de enfermedad, habiendo fallecido uno de ellos debido a una infección pre-existente.

Ante los beneficios clínicos asociados a la terapia génica de pacientes con inmunodeficiencia por déficit en Adenosina Desaminasa, en el año 2016 se autorizó el primer medicamento de uso humano basado en un vector retroviral: *Strimvelis*

Como en los estudios clínicos de SCID-X1 y ADA-SCID, en los que se utilizaron vectores autoinactivados, ninguno de los pacientes WAS tratados con el vector lentiviral ha mostrado eventos adversos severos asociados al tratamiento o evidencias de genotoxicidad.

Granulomatosis crónica (CGD):

La granulomatosis crónica se caracteriza por una deficiente respuesta de las células fagocíticas para generar anión superóxido, lo que se manifiesta a través de un síndrome recurrente de infecciones y formación de granulomas. La causa más frecuente de CGD se debe a mutaciones en el gen que codifica la proteína GP91 del complejo de la NADPH oxidasa. Este gen está localizado en el cromosoma X. Se trata, por tanto, de una enfermedad autosómica recesiva, con una prevalencia de entre 1-10/1.000.000 de hombres.

Estudios previos sugerían que la corrección genética de aproximadamente un 5% de los granulocitos circulantes sería suficiente para reportar un beneficio terapéutico (Malech et al., 1997). Los estudios clínicos basados en el trasplante de células CD34⁺ autólogas transducidas con vectores retrovirales y trasplantadas en pacientes no acondicionados no mostraron beneficio terapéutico. No obstante, el ensayo clínico coordinado por el Dr. Manuel Grez en Frankfurt, en pacientes que recibieron acondicionamiento mieloablativo, indujo mejoría clínica en los dos pacientes tratados (Ott et al., 2006). A pesar de ello y como ocurrió en pacientes con SCID-X1 y WAS, en este ensayo clínico también se pusieron de manifiesto eventos adversos severos de

genotoxicidad (Stein et al., 2010).

En virtud de ello, recientemente se ha desarrollado un vector lentiviral en donde la expresión del gen *GP91* está dirigida por un promotor que potencia la expresión del gen terapéutico en células mieloides maduras. Cuatro de los 5 pacientes tratados con este vector han mostrado evidencias de injerto estable con células corregidas genéticamente. Asimismo, estos pacientes han recuperado la función de las células fagocíticas y han experimentado evidente mejoría clínica, sin evidencias de genotoxicidad.

Hemoglobinopatías:

La β -talasemia y la anemia de células falciformes constituyen dos hemoglobinopatías en las que se está ensayando la eficacia y seguridad de la terapia génica.

Con relación a la β -talasemia, la Dra. Marina Cavazzana reportó en el año 2010 los resultados del tratamiento de dos pacientes con un vector lentiviral en donde el gen de la β -globina estaba dirigido por secuencias del locus LCR de este gen (Cavazzana-Calvo et al., 2010). Aunque uno de los pacientes no mostró un buen injerto con las células transducidas por defectos atribuidos a la manipulación de las células, el segundo paciente sí lo mostró, con un patrón de reconstitución oligoclonal. Llamativamente, un único clon fue el responsable de la reconstitución del 70% de las células marcadas en la sangre. Este hecho fue debido a la inserción del provirus terapéutico en una región del gen *HGMA2*. Esta región es diana del miRNA *Let-7*, que degrada el RNA de *HGMA2*, una proteína implicada en el desarrollo de tumores benignos. Como consecuencia de la inactivación de esta diana, los autores observaron un aumento muy significativo en la expresión de *HGM2*, atribuyendo a ello la expansión del clon con esta inserción. A intervalos de tiempo de seguimiento más tardíos, no referidos en la publicación original, el patrón de reconstitución adquirió características policlonales, encontrándose el paciente actualmente en buen estado clínico.

La Dr. Giuliana Ferrari, del Hospital San Raffaele, ha reportado recientemente los resultados de un nuevo ensayo clínico de pacientes con β -talasemia utilizando otro vector lentiviral de características similares. En la actualidad se han tratado 3 pacientes adultos, 3 adolescentes y 1 paciente pediátrico. Tres de los 4 pacientes tratados que tienen mayor seguimiento se mantienen libres de transfusiones. El cuarto paciente no ha podido hacerse independiente de transfusiones por el momento, si bien la eficacia de transducción y el número de células infundidas fue similar. En todos los casos el patrón de reconstitución se está mostrando policlonal, sugiriendo de nuevo que no se están produciendo por fenómenos de transactivación génica.

La Dra. Marina Cavazzana tiene abierto un ensayo clínico similar para el tratamiento de pacientes con anemia falciforme. En el único paciente reportado hasta el momento, y realizado también con un vector lentiviral, se ha observado una clara eficacia clínica en ausencia de eventos adversos asociados al tratamiento (Ribeil et al., 2017).

Anemia de Fanconi (AF):

Los pacientes con anemia de Fanconi (AF) poseen mutaciones en alguno de los 21 genes de la ruta FA/BRCA, si bien más del 65% de estos pacientes poseen mutaciones en el gen *FANCA*. Se trata de una enfermedad autosómica recesiva, asociada a anomalías congénitas, fallo de médula ósea y predisposición a cáncer. En promedio, la manifestación de la aplasia se observa alrededor de los 8 años de edad, y prácticamente todos los pacientes que alcanzan los 40 años muestran evidencias de fallo de médula ósea. Una de las características de esta enfermedad, que la hace particularmente apropiada para su tratamiento por terapia génica, radica en la ventaja proliferativa de las células corregidas genéticamente, respecto a las células no corregidas, lo que se manifiesta claramente en pacientes con mosaicismo somático, en los cuales el fallo de médula ósea puede revertirse de manera espontánea (Gregory et al., 2001).

Los ensayos clínicos de terapia génica realizados hasta el momento no han reportado beneficios terapéuticos (Kelly et al., 2007), si bien han ayudado a comprender las dificultades a vencer para que se puedan desarrollar protocolos cada vez más eficaces y seguros.

A partir del año 2015, nuestro laboratorio, en colaboración con los hospitales Niño Jesús de Madrid y Val d'Hebrón de Barcelona, y el resto de la Red Española de Investigación en AF puso en marcha dos ensayos clínicos en pacientes con AF del subtipo A.

El objetivo del primer ensayo ha sido el de evaluar la seguridad y la eficacia de un procedimiento de colecta de CMHs de estos pacientes basado en el uso de dos fármacos movilizadores de CMHs con filgrastim y plerixafor. Los resultados de colecta de CMHs obtenidos en este ensayo clínico muestran que este procedimiento es el de mayor eficacia respecto a otros procedimientos utilizados hasta la actualidad.

Gracias a los resultados obtenidos en los ensayos clínicos de terapia génica de inmunodeficiencias y otras enfermedades congénitas de la sangre, se contempla que esta nueva herramienta terapéutica progresivamente remplace al trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos.

Con relación al ensayo de terapia génica, este se ha realizado con un vector lentiviral desarrollado en nuestro laboratorio, por lo que ha recibido la designación de Medicamento Huérfano por la Agencia Europea del Medicamento y la FDA de los EEUU. Los resultados obtenidos hasta el momento nos han permitido demostrar por primera vez la posibilidad de injertar CMHs de pacientes con AF tras su corrección genética y reinfusión en pacientes AF-A en ausencia de acondicionamiento alguno. Asimismo, los estudios preliminares realizados hasta el momento sugieren la estabilización del fallo de médula ósea tras la terapia génica. Estudios futuros indicarán en qué medida esta aproximación de terapia génica podrá revertir a largo plazo el fallo de médula ósea que con frecuencia compromete la supervivencia de estos pacientes.

Conclusiones

Si bien los fenómenos de oncogénesis insercional observados en la década de los 2000 cuestionaron la seguridad de la terapia génica realizada con vectores retrovirales de primera generación, el desarrollo de vectores autoinactivados está ofreciendo resultados clínicos de eficacia incuestionable y de muy alta seguridad, pues en ninguno de los estudios clínicos en marcha se han evidenciado eventos adversos severos asociados al tratamiento. En el año 2016 se aprobó el primer medicamento de terapia génica consistente en CMHs de pacientes con inmunodeficiencia ADA-SCID corregidas con un vector retroviral: *Strimvelis*.

En virtud de los resultados de los estudios clínicos actualmente en marcha, es de prever que en los próximos años seguirán registrándose numerosos otros medicamentos génicos similares a *Strimvelis*. Con todo ello, es más que probable que las terapias de las enfermedades monogénicas de las células sanguíneas basadas en el trasplante alogénico de CMHs se vean progresivamente sustituidas por aproximaciones de terapia génica en las que se infundan CMHs autólogas corregidas de su defecto génico. Como comentaba el Prof. Thrasher en el *Spring School* de terapia génica celebrado en Granada en abril de 2017, la terapia génica está permitiendo que enfermedades pediátricas con mortalidades del 100% pasen a tener supervivencias del 100% tras su tratamiento génico.

Con todo ello, nos encontramos todavía desarrollando los primeros pasos de la terapia génica en la práctica clínica. El espectacular desarrollo de las nucleasas de diseño está permitiendo alcanzar grandes avances en el campo de la terapia génica de edición basada en la reparación del DNA. Por otra parte, la modificación de las envueltas virales está facilitando contemplar la terapia génica *in vivo* para muchas más aplicaciones de las inicialmente contempladas, evitando con ello la manipulación celular *ex vivo*, que dificulta la práctica clínica de la terapia génica.

Por todo lo dicho, es de esperar que en pocos años la terapia génica se posicione junto a otras terapias estándar como una nueva herramienta para el tratamiento eficaz y seguro de enfermedades congénitas y también adquiridas.

Bibliografía

- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M. P., Baricordi, C., . . . Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*, 341(6148), 1233151. doi: 10.1126/science.1233151
- Aiuti, A., & Roncarolo, M. G. (2009). Ten years of gene therapy for primary immune deficiencies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 682-689.
- Aiuti, A., Roncarolo, M. G., & Naldini, L. (2017). Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an *ex vivo* gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med*. doi: 10.15252/emmm.201707573

- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., . . . Bordignon, C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, 296(5577), 2410-2413.
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., . . . Anderson, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270(5235), 475-480.
- Booth, C., Gaspar, H. B., & Thrasher, A. J. (2016). Treating Immunodeficiency through HSC Gene Therapy. *Trends Mol Med*, 22(4), 317-327. doi: 10.1016/j.molmed.2016.02.002
- Bordignon, C., Mavilio, F., Ferrari, G., Servida, P., Ugazio, A. G., Notarangelo, L. D., . . . et al. (1993). Transfer of the ADA gene into bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes for the treatment of patients affected by ADA-deficient SCID. *Hum Gene Ther*, 4(4), 513-520.
- Boztug, K., Schmidt, M., Schwarzer, A., Banerjee, P. P., Diez, I. A., Dewey, R. A., . . . Klein, C. (2010). Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med*, 363(20), 1918-1927. doi: 10.1056/NEJMoa1003548
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., . . . Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288(5466), 669-672.
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., . . . Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*, 467(7313), 318-322. doi: 10.1038/nature09328
- De Ravin, S. S., Wu, X., Moir, S., Anaya-O'Brien, S., Kwatema, N., Littel, P., . . . Malech, H. L. (2016). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med*, 8(335), 335ra357. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8856
- Ferrari, G., Rossini, S., Nobili, N., Maggioni, D., Garofalo, A., Giavazzi, R., . . . Bordignon, C. (1992). Transfer of the ADA gene into human ADA-deficient T lymphocytes reconstitutes specific immune functions. *Blood*, 80(5), 1120-1124.
- Gregory, J. J., Jr., Wagner, J. E., Verlander, P. C., Levrán, O., Batish, S. D., Eide, C. R., . . . Auerbach, A. D. (2001). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: Evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), 2532-2537.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J.-P., . . . Cavazzana-Calvo, M. (2002). Sustained Correction of X-Linked Severe Combined Immunodeficiency by ex Vivo Gene Therapy. *N Engl J Med*, 346(16), 1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina, S., Pai, S. Y., Gaspar, H. B., Armant, M., Berry, C. C., Blanche, S., . . . Thrasher, A. J. (2014). A modified gamma-retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 371(15), 1407-1417. doi: 10.1056/NEJMoa1404588
- Hacein-Bey-Abina, S., von Kalle, C., Schmidt, M., Le Deist, F., Wulffraat, N., McIntyre, E., . . . Fischer, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348(3), 255-256.

- Kelly, P. F., Radtke, S., Kalle, C., Balcik, B., Bohn, K., Mueller, R., . . . Williams, D. A. (2007). Stem cell collection and gene transfer in fanconi anemia. *Mol Ther*, 15(1), 211-219.
- Kohn, D. B., Hershfield, M. S., Carbonaro, D., Shigeoka, A., Brooks, J., Smogorzewska, E. M., . . . Parkman, R. (1998). T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA- deficient SCID neonates. *Nat.Med.*, 4(7), 775-780.
- Malech, H. L., Maples, P. B., Whiting-Theobald, N., Linton, G. F., Sekhsaria, S., Vowells, S. J., . . . Gallin, J. I. (1997). Prolonged production of NADPH oxidase-corrected granulocytes after gene therapy of chronic granulomatous disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(22), 12133-12138.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., . . . Naldini, L. (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*, 24(6), 687-696.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., . . . Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263-267.
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., . . . Grez, M. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med*, 12(4), 401-409.
- Ribeil, J. A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., . . . Cavazzana, M. (2017). Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*, 376(9), 848-855. doi: 10.1056/NEJMoa1609677
- Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., & Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 110(4), 521-529.
- Stein, S., Ott, M. G., Schultze-Strasser, S., Jauch, A., Burwinkel, B., Kinner, A., . . . Grez, M. (2010). Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med*, 16(2), 198-204.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., & Burgess, S. M. (2003). Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 300(5626), 1749-1751.