



Σχολή Κοινωνικών Επιστημών



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Ιατρικής

Κοινό Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα Σπουδών  
**Διαχείριση Γήρανσης και Χρόνιων Νοσημάτων**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

**Η Γονιδιακή Θεραπεία στην Αντιμετώπιση  
των Κληρονομικών Αναιμιών**

Οικονομούδης Ιωάννης  
Α.Μ. 520431

Επιβλέπων καθηγητής: Ράπτης Αθανάσιος

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή Οικονομούδη Ιωάννη που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

## Η Γονιδιακή Θεραπεία στην Αντιμετώπιση των Κληρονομικών Αναιμιών

Οικονομούδης Ιωάννης

Επιτροπή Κρίσης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Αθανάσιος Ράπτης

Καθηγητής Παθολογίας Σ. Διαβήτη

Τμήμα Ιατρικής

Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συν-Επιβλέπων καθηγητής:

Δημήτριος Παπαγιάννης

Αναπληρωτής Καθηγητής Δημόσιας Υγείας

Τμήμα Νοσηλευτικής

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πάτρα, Φεβρουάριος 2025

*Στους Πάσχοντες από  
Κληρονομικές Αναιμίες*

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Διαχείριση Γήρανσης και Χρόνιων Νοσημάτων» της Σχολής Κοινωνικών Επιστημών του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου (Ε.Α.Π.) και εντάσσεται στο θεματικό πεδίο ΓΧΝ22: «Σακχαρώδης Διαβήτης, Νεφρική Ανεπάρκεια, β-Θαλασσαιμία, Δρεπανοκυτταρική Αναιμία». Ο κύριος σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της γονιδιακής θεραπείας των κληρονομικών αναιμιών εστιάζοντας στη γονιδιακή θεραπεία της β-θαλασσαιμίας και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, χρησιμοποιώντας κυρίως διεθνείς βιβλιογραφικές αναφορές και ανασκοπήσεις (επιστημονικά άρθρα και βιβλία). Στο πρώτο κεφάλαιο αναφέρονται τα γενικά χαρακτηριστικά των κληρονομικών αναιμιών, η παθοφυσιολογία τους (α-θαλασσαιμία, β-θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία), τα συμπτώματα και οι στρατηγικές θεραπείας που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα. Στο δεύτερο κεφάλαιο τα χαρακτηριστικά της γονιδιακής θεραπείας (in vivo – ex vivo) και στοιχεία για την εφαρμογή της κατά την τελευταία δεκαετία, στη θεραπεία ανιάτων ασθενειών. Στο τρίτο κεφάλαιο τα τελευταία ερευνητικά δεδομένα για την αποτελεσματικότητα, της γονιδιακής θεραπείας σε διάφορες μονογονιδιακές ασθένειες και οι γενετικοί φορείς που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα για τη μεταφορά γονιδίων. Στο τέταρτο κεφάλαιο διερευνώνται οι μέθοδοι εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας στη β-θαλασσαιμία και στη δρεπανοκυτταρική αναιμία και τα κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά από την εφαρμογή της, σε ασθενείς με κληρονομικές αναιμίες. Στο πέμπτο και έκτο κεφάλαιο παρουσιάζονται έρευνες από την εφαρμογή συγκεκριμένων γονιδιακών φαρμακευτικών προϊόντων και το οικονομικό κόστος της εφαρμογής τους, στη δρεπανοκυτταρική αναιμία και στη β-θαλασσαιμία. Στο τέλος παρουσιάζονται τα συμπεράσματα και οι προοπτικές για την οριστική θεραπεία της β-θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, καθώς και τρόποι εξομάλυνσης του υψηλού οικονομικού κόστους εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας.

## Περίληψη

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι οι πιο συχνές μονογονιδιακές διαταραχές παγκοσμίως οι οποίες παρουσιάζουν υπολειπόμενη κληρονομικότητα. Σε ετήσια βάση διαγιγνώσκονται περίπου 60.000 ασθενείς με β-θαλασσαιμία (TDT) και 300.000 ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD) λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο της β-σφαιρίνης (HBB), με αποτέλεσμα την αναποτελεσματική ερυθροποίηση. Οι συμβατικές διαθέσιμες στρατηγικές διαχείρισης αυτών των διαταραχών, όπως η μετάγγιση ερυθροκυττάρων εφ' όρου ζωής, εξακολουθούν να μην είναι ικανοποιητικές και δεν εξαλείφουν τις κύριες αιτίες. Η βέλτιστη προσέγγιση μπορεί να γίνει με την αποκατάσταση του ελαττωματικού γονιδίου, πιθανώς μέσω μεταμόσχευσης φυσιολογικών αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSCs) από έναν φυσιολογικό δότη ή μέσω των προσεγγίσεων της γονιδιακής θεραπείας (είτε *in vivo* είτε *ex vivo*), για τη διόρθωση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (HSCs) του ασθενούς. Η γονιδιακή θεραπεία ανάλογα με την ασθένεια, μπορεί να γίνει με τη χορήγηση, ενός λειτουργικού θεραπευτικού γονιδίου ως υποκατάστατο του ελαττωματικού ή ενός ενδογενούς αντίστοιχου σε αυτό που απουσιάζει, είτε με μείωση των επιπέδων των προϊόντων ενός επιβλαβούς ελαττωματικού γονιδίου. Οι στόχοι αυτοί μπορεί να επιτευχθούν χρησιμοποιώντας διάφορα εξελιγμένα εργαλεία, της μοριακής Βιολογίας, συμπεριλαμβανομένων των γυμνών ολιγονουκλεοτιδίων, ιικών και μη ιικών φορέων. Επίσης, αυτό μπορεί να γίνει με τη χρήση προγραμματισμένων νουκλεασών, που επιτρέπουν στοχευμένες γονιδιωματικές τροποποιήσεις, όπως το σύστημα CRISPR/Cas9, που έχει πολύ καλές προοπτικές τόσο για τη βασική έρευνα όσο και για κλινικές εφαρμογές. Η *in vivo* γονιδιακή θεραπεία πέρα από τα θεραπευτικά αποτελέσματα, σε κάποιους ασθενείς μπορεί να προκαλέσει ανοσοαντιδράσεις, λόγω των φορέων και των διαγονιδίων που εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό. Γι' αυτό έχουν αναπτυχθεί περίπλοκες τεχνολογίες όχι μόνο για την προστασία των πρωτεϊνών του ιικού καψιδίου από την αναγνώριση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, αλλά και για την επιτυχή εφαρμογή κλινικών δοκιμών με μη ενσωματωμένους φορείς. Η *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία φαίνεται να είναι πιο ασφαλής, καθώς μειώνει τον κίνδυνο των ανεπιθύμητων εκτός στόχου επιπτώσεων. Σε ότι αφορά τη χρήση φορέων μεταφοράς γονιδίων, ο αδενο-σχετιζόμενος ιός (AAV) έχει αναδειχθεί ως βασικό εργαλείο διανομής στην κλινική γονιδιακή θεραπεία λόγω της ελάχιστης

παθογονικότητάς του και της ικανότητάς του να καθιερώνει μακροπρόθεσμη γονιδιακή έκφραση σε διαφορετικούς ιστούς. Επίσης, οι SIN-λεντι-ικοί φορείς αποτελούν επί του παρόντος το προτιμότερο εργαλείο για τη μεταφορά γονιδίων σε HSCs. Οι γονιδιακές θεραπείες περιλαμβάνουν διάφορες στρατηγικές, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής ενίσχυσης, της γονιδιακής παρεμβολής και της γονιδιακής επεξεργασίας. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί αρκετές γενετικές τεχνικές και παρ' όλο που έχουν σημειώσει σημαντικές προόδους, εξακολουθούν να υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με την παράδοση και την ασφάλειά τους. Η γονιδιακή θεραπεία στη β-θαλασσαιμία και στη δρεπανοκυτταρική αναιμία μπορεί να γίνει με ενεργοποίηση της έκφρασης της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, στοχεύοντας τον ενισχυτή BCL11A. Αυτό θα αυξήσει την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη HbF και θα ανακουφίσει από τα συμπτώματα και στις δύο ασθένειες. Επίσης, φαίνεται επιτυχής η εισαγωγή και έκφραση λεντι-ιών που φέρουν το θεραπευτικό διαγονίδιο της β-σφαιρίνης στα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs), σε β-θαλασσαιμικούς ασθενείς και η χορήγηση της λεντι-αιμοσφαιρίνης HbA<sup>T87Q</sup> σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Τα φαρμακευτικά προϊόντα γονιδιακής θεραπείας, που μπορούν να διατεθούν σήμερα για κλινική εφαρμογή στη β-θαλασσαιμία και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία, είναι το Casgevy και το Lyfgenia. Το Casgevy έχει εγκριθεί για κλινική εφαρμογή από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA), ενώ στις Η.Π.Α. έχουν εγκριθεί από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για κλινική εφαρμογή και τα δύο. Ωστόσο, επειδή το οικονομικό κόστος αυτών των φαρμάκων είναι πολύ υψηλό, τίθενται προβληματισμοί για την ευρεία χορήγησή τους. Περαιτέρω έρευνα και ανάπτυξη είναι ζωτικής σημασίας για τη βελτίωση της προσιτότητας, της προσβασιμότητας και της μακροπρόθεσμης αποτελεσματικότητας της γονιδιακής θεραπείας για αυτές τις εξουθενωτικές ασθένειες.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η απόκτηση γνωστικού υπόβαθρου στις μεθόδους γονιδιακής θεραπείας για την θεραπεία κληρονομικών ασθενειών και ειδικότερα στην διερεύνηση της εφαρμογής τέτοιων μεθόδων ως τρόπους αντιμετώπισης και οριστικής θεραπείας των κληρονομικών αναιμιών, με επίκεντρο τη β-θαλασσαιμία και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία.

Η εργασία αυτή καλύπτει τρεις τομείς:

- (1) Παθοφυσιολογία των κληρονομικών αναιμιών. Αίτια και η συμβατική αντιμετώπισή τους (Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>).
- (2) Η Γονιδιακή θεραπεία και η αποτελεσματικότητά της, στη β-θαλασσαιμία και στη δρεπανοκυτταρική αναιμία (Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup>, 4<sup>ο</sup>).
- (3) Κλινική εφαρμογή της Γονιδιακής θεραπείας (στη β-θαλασσαιμία και στη δρεπανοκυτταρική αναιμία) και το οικονομικό κόστος από την εφαρμογή της (Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>, 6<sup>ο</sup>, 7<sup>ο</sup>).

### **Λέξεις – Κλειδιά**

Γονιδιακή θεραπεία, Κληρονομικές αναιμίες, Γονιδιακή θεραπεία β-θαλασσαιμίας και δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, Οικονομικό κόστος γονιδιακής θεραπείας.



# Gene Therapy in Treatment of Hereditary Anemias

Ioannis Oikonomoudis

## Abstract

Hemoglobinopathies, characterized by recessive inheritance, are the most common single-gene disorders worldwide. Approximately 60,000 patients with  $\beta$ -thalassemia (TDT) and 300,000 patients with sickle cell disease (SCD) are diagnosed annually, resulting in ineffective erythropoiesis due to mutations in the  $\beta$ -globin gene (HBB). Conventional management strategies for these disorders, such as lifelong red blood cell transfusions, often prove unsatisfactory and fail to address the underlying genetic cause. The optimal approach may involve restoring the defective gene, potentially through hematopoietic stem cell transplantation from a compatible donor or gene therapy approaches (in vivo or ex vivo). Gene therapy aims to correct the patient's hematopoietic stem cells (HSCs) by introducing a functional therapeutic gene. This can involve replacing the defective gene, providing an endogenous counterpart to the missing gene, or reducing the expression of the harmful gene product. These therapeutic goals can be achieved using various sophisticated molecular biology tools, including naked oligonucleotides, viral and non-viral vectors. Programmed nucleases, such as the CRISPR/Cas9 system, enable targeted genomic modifications. The CRISPR/Cas9 system holds significant promise for both basic research and clinical applications. In vivo gene therapy can elicit immune responses in some patients due to the introduction of vectors and transgenes. Sophisticated technologies have been developed to protect viral capsid proteins from recognition by the host immune system. Additionally, efforts have focused on successful clinical trial implementation using non-integrating vectors. Ex vivo gene therapy appears to be safer, as it reduces the risk of unwanted off-target effects. Regarding gene transfer vectors, adeno-associated virus (AAV) has emerged as a key delivery tool in clinical gene therapy due to its minimal pathogenicity and its ability to establish long-term gene expression in various tissues.

For gene transfer into hematopoietic stem cells (HSCs), self-inactivating (SIN) lentiviral vectors are currently the preferred approach. Gene therapies encompass various strategies, including gene amplification, gene insertion, and gene editing. In recent decades, significant progress has been made in the development of genetic techniques for treating inherited blood disorders. However, challenges related to safe and efficient delivery of these therapies remain. Gene therapy approaches for  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease show promising results. These approaches include, reactivating fetal hemoglobin (HbF) expression, targeting the BCL11A enhancer. This can increase HbF production, which can alleviate symptoms in both diseases. In  $\beta$ -thalassemia, introducing lentiviruses carrying the therapeutic  $\beta$ -globin gene into induced pluripotent stem cells (iPSCs) has demonstrated promising outcomes in clinical trials. In sickle cell disease, administering lenti-hemoglobin HbA<sup>T87Q</sup>, a modified hemoglobin protein, has shown therapeutic potential. Two gene therapy products, Casgevy and Lyfgenia, have received regulatory approval. Casgevy is approved by the European Medicines Agency (EMA), while both have been approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). Despite these advancements, the high cost of these therapies poses significant challenges to widespread access and equitable treatment. Further research and development are crucial to improve the affordability, accessibility, and long-term efficacy of gene therapy for these debilitating diseases.

The purpose of this dissertation is to acquire fundamental knowledge in gene therapy methods for treating hereditary diseases. This research will specifically investigate the effective application of such methods for treating hereditary anemias, with a particular focus on  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease.

This work covers three areas:

- (1) Pathophysiology of hereditary anemias. Causes - Conventional treatment (Chapter 1<sup>o</sup>).
- (2) Gene therapy and its effectiveness, in  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease (Chapter 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup>).
- (3) Clinical application of Gene therapy (in  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease) and the financial cost of its application (Chapter 5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>).

## Keywords

Gene therapy, hereditary anemias, treatment of  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease, financial cost of gene therapy.

## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	v
Περίληψη .....	vi
Abstract.....	ix
Περιεχόμενα.....	xii
Κατάλογος Εικόνων/Σχημάτων .....	xiv
Κατάλογος Πινάκων .....	xv
Συντομογραφίες & Ακρωνύμια .....	xvi
Εισαγωγή .....	1
Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> Παθολογία της Αναιμίας .....	4
1.1 Γενικά Στοιχεία .....	4
1.2 Ερυθροποίηση και Κληρονομικές Αναιμίες .....	6
1.2.1 Η Παθοφυσιολογία της β-Θαλασσαιμίας.....	9
1.2.2 Η Παθοφυσιολογία της Δρεπανοκυτταρικής Αναιμίας .....	11
1.2.3 Η Παθοφυσιολογία της α-Θαλασσαιμίας.....	12
1.3 Συμβατικές Θεραπείες στις Κληρονομικές Αναιμίες .....	13
1.4 Στρατηγικές Θεραπείας των Κληρονομικών Αναιμιών .....	14
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> Γονιδιακή Θεραπεία .....	16
2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά .....	16
2.2 In Vivo και Ex Vivo Γονιδιακή Θεραπεία .....	21
2.2.1 Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα της In Vivo και Ex Vivo Γονιδιακής Θεραπείας .....	28
2.2.2 Παρενέργειες Χρήσης Φορέων στη Γονιδιακή Θεραπεία.....	29
2.2.3 Ασφαλείς Θέσεις Εισαγωγής των Διαγονιδίων στο Γονιδίωμα.....	31
2.3 Τα Νέα Δεδομένα στη Γονιδιακή Θεραπεία .....	32
Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> Αποτελεσματικότητα Γονιδιακής Θεραπείας .....	35
3.1 Θεραπεία των Μονογονιδιακών Ασθενειών .....	35
3.2 Προκλήσεις, Στρατηγικές και Προοπτικές στη Θεραπεία των Μονογονιδιακών Ασθενειών .....	37
3.3 Σύγκριση γ-Ρετροϊκών, AAV και Λεντι-ϊκών Φορέων στη Θεραπεία των Μονογονιδιακών Ασθενειών .....	42
Κεφάλαιο 4 <sup>ο</sup> Η Γονιδιακή Θεραπεία στις Κληρονομικές Αναιμίες.....	44
4.1 Ενεργοποίηση της Έκφρασης της Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης στη β-Θαλασσαιμία και τη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία .....	44

4.2 Χρήση Πολυδύναμων Βλαστοκυττάρων στη Γονιδιακή Θεραπεία των Κληρονομικών Αναιμιών .....	51
4.3 Λεντι-αιμοσφαιρίνη στη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία.....	53
Κεφάλαιο 5 <sup>ο</sup> Εφαρμογή Γονιδιακής Θεραπείας στη β-Θαλασσαιμία και στη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία σε Ελλάδα, Ευρώπη και Η.Π.Α.....	56
5.1 Κλινική Εφαρμογή Γονιδιακής Θεραπείας στη β-Θαλασσαιμία και στη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία στην Ελλάδα.....	56
5.2 Κλινικές Μελέτες Γονιδιακής Θεραπείας στη β-Θαλασσαιμία και στη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία στην Ευρώπη.....	57
5.2.1 Έλεγχος Αποτελεσματικότητας του Casgevy .....	59
5.3 Έγκριση Γονιδιακών Θεραπειών για τη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία από τον Οργανισμό FDA των Η.Π.Α.....	60
Κεφάλαιο 6 <sup>ο</sup> Το Οικονομικό Κόστος - Όφελος της Γονιδιακής Θεραπείας των Κληρονομικών Αναιμιών .....	64
Κεφάλαιο 7 <sup>ο</sup> Συμπεράσματα-Προοπτικές της Γονιδιακής Θεραπείας στις Κληρονομικές Αναιμίες .....	73
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	79
Ιστοσελίδες .....	108
Παράρτημα – Γλωσσάριο Βιολογικών Όρων.....	109

## Κατάλογος Εικόνων/Σχημάτων

Εικόνα 1.1 Φυσιολογικά ερυθροκύτταρα .....	4
Εικόνα 1.2 Μη φυσιολογικά ερυθροκύτταρα στη δρεπανοκυτταρική αναιμία ....	5
Εικόνα 1.3 Σχηματική αιμοποιητική διαφοροποίηση .....	6
Εικόνα 1.4 Σχηματική παρουσίαση της χρωμοσωμικής θέσης του συμπλέγματος των γονιδίων α- και β-σφαιρίνης στο 16p και 11p αντίστοιχα. ....	7
Εικόνα 1.5 Το μόριο της αιμοσφαιρίνης HbA .....	9
Εικόνα 2.1 Εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας στη συγγενή αμαύρωση του Leber .....	18
Εικόνα 2.2 Φυσικοί μηχανισμοί μικροβιακών συστημάτων CRISPR/Cas9 .....	19
Εικόνα 2.3 In vivo και ex vivo γονιδιακή θεραπεία .....	24
Εικόνα 2.4 Γονιδιακή θεραπεία με χρήση φορέα AAV .....	26
Εικόνα 2.5 Χρήση φορέων γονιδιακής θεραπείας και η ονομασία των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται σε διαφορετικές ασθένειες.....	27
Εικόνα 3.1 Αιμοποίηση και κύριες ασθένειες στο επίκεντρο της ex vivo γονιδιακής θεραπείας σε HSCs.....	36
Εικόνα 3.2 Διαφορετικοί τύποι και μηχανισμοί συστημάτων CRISPR/Cas .....	41
Εικόνα 3.3 Μέση ολική αιμοσφαιρίνη και τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης της Ομάδας C HGB-206.....	54
Εικόνα 4.1 Μετάβαση από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) στην αιμοσφαιρίνη ενηλίκων (HbA).....	46
Εικόνα 4.2 Θέση επεξεργασίας στόχου του sgRNA που κατευθύνει το CRISPR-Cas9 στην ειδική για τα ερυθροκύτταρα περιοχή ενίσχυσης του BCL11A.....	47
Εικόνα 4.3 Κλασματοποίηση αιμοσφαιρίνης - Ποσοστά των κυττάρων F στους ασθενείς της μελέτης.....	49
Εικόνα 4.4 Συχνότητα επεξεργασμένων αλληλομόρφων γονιδίων σε κύτταρα: CTX001, εμπύρηνια του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών.....	50
Εικόνα 6.1 Γονιδιακή θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας με lono-cel, χρησιμοποιώντας λεντι-ικό φορέα LVV .....	65
Εικόνα 6.2 Κόστος επώνυμης γονιδιακής θεραπείας ανά μονάδα .....	66
Εικόνα 6.3 Κόστος που δαπανάται στη δρεπανοκυτταρική αναιμία από μη-ηλικιωμένους (0-64 ετών) .....	67
Εικόνα 6.4 Ηλικιακό προφίλ του οικονομικού κόστους που δαπανάται στην δρεπανοκυτταρική αναιμία και σε άτομα της ομάδας ελέγχου .....	69

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 2.1 Γενετικές διαταραχές που αντιμετωπίζονται με το σύστημα CRISPR/Cas9 .....	20
Πίνακας 2.2 Κλινικές μελέτες ex vivo γονιδιακής θεραπείας σε διαφορετικές ασθένειες .....	22
Πίνακας 2.3 Κλινικές μελέτες in vivo γονιδιακής θεραπείας σε διαφορετικές ασθένειες .....	23
Πίνακας 6.1 Συνολικό οικονομικό κόστος και κόστος δαπάνης προσωπικού εισοδήματος των μη ηλικιωμένων (ηλικία 0-64 ετών) για την αντιμετώπιση της SCD.....	68

## Συντομογραφίες & Ακρωνύμια

Σύμβολο	Πλήρης Ονομασία	Περιγραφή
AADC	Aromatic l-amino Acid Decarboxylase Deficiency	Ανεπάρκεια Αρωματικής-L-Άμινο-οξικής-Δεκαρβοξυλάσης
AAV	Adeno-associated Virus-derived Vectors	Φορείς Προέλευσης από Άδενο-Σχετιζόμενους Ιούς
AAVS1	Adeno-Associated Virus Site 1	Περιοχή 1 στο χρωμόσωμα 19 του Άδενο-Σχετιζόμενου Ιού
ACS	Acute Chest Syndrome	Οξύ Θωρακικό Σύνδρομο
ADA-SCID	Adenosine-Deaminase - Severe Combined Immunodeficiency	Απαμινάση της Αδενοσίνης - Σοβαρή Συνδυασμένη Ανοσοανεπάρκεια
aGvHD	Acute Graft Versus Host Disease	Ασθένεια Μοσχεύματος Εναντίον Ξενιστή
ARSA	Arylsulphatase A	Αρυλοσουλφατάση Α
ASOs	Antisense Oligonucleotides	Συμπληρωματικά Ολιγονουκλεοτίδια
ASPA	Aspartoacylase	Ασπαρτοακυλάση
ATTR	Amyloidosis Transthyretin	Αμυλοείδωση Τρανσθυρετίνης
CAT	Committee for Advanced Therapies	Επιτροπή Προηγμένων Θεραπειών
CAR T cells	Chimeric Antigen Receptor T cells	Χιμαϊρικά Τ Κύτταρα Υποδοχέα Αντιγόνου
CDAs	Congenital Dyserythropoietic Anemias	Συγγενείς Δυσερρυθροποιητικές Αναμιμές
CGD	Chronic Granulomatous Disease	Χρόνια Κοκκιοματώδης Νόσος
CLP	Common lymphoid progenitor	Κοινά Προγονικά λεμφοειδή κύτταρα
CMP	Multipotent Common Myeloid Progenitor	Πολυδύναμα Προγονικά Μυελοειδή (κύτταρα)
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	Επιτροπή Φαρμακευτικών Προϊόντων για τον άνθρωπο
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat /Crispr associated protein 9	Ομαδοποιημένες Τακτικές Ενδιάμεσες Σύντομες Παλινδρομικές Επαναλήψεις /Crispr Συνδεόμενη Πρωτεΐνη 9
DMD	Duchenne Muscular Dystrophy	Μυϊκή Δυστροφία Duchene
DLBCL	Diffuse large B cell lymphoma	Διάχυτο Λέμφωμα Μεγάλων Β κυττάρων
EMA	European Medicines Agency	Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
ETP	Early T-lineage Progenitor	Προγονική Γραμμή Τ λεμφοκυττάρων
FALS	Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis	Οικογενής Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση
FH	Familial Hypercholesterolemia	Οικογενής Υπερχολιστερολαιμία
FIX	Factor IX	Παράγοντας ΙΧ (πήξης του αίματος)
GAD	Glutamic Acid Decarboxylase	Αποκαρβοξυλάση του Γλουταμικού Οξέος
G6PDD	Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency	Αφυδρογονάση της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης
GMP	Granulocyte-Monocyte Progenitor	Προγονικά Κοκκιοκύτταρα-Μονοκύτταρα



hATTR	hereditary Amyloidosis Transthyretin	Κληρονομική Αμυλοείδωση Τρανσθυρετίνης
HSCs	Hematopoietic Stem Cells	Αιμοποιητικά Βλαστοκύτταρα
HSCT	Hematopoietic Stem Cells Transplantation	Αιμοποιητικά Βλαστοκύτταρα Μεταμόσχευσης
HBB	Hemoglobin B	B-Αιμοσφαιρίνη
HBD	Hemoglobin D	Δέλτα-Αιμοσφαιρίνη
HbH	Hemoglobin H	Αιμοσφαιρίνη H
HDR	Homology-Directed Repair	Ομόλογη Κατευθυνόμενη Επιδιόρθωση
HLA	Human Leucocyte Antigens	Αντιγόνα Λεμφοκυττάρων Ανθρώπου
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection	Ενδοκυτταροπλασματική Έγχυση Σπέρματος
iPSs	Induced Pluripotent Stem Cells	Επαγόμενα Πολυδύναμα Βλαστοκύτταρα
IL-2	Interleukin-2	Ιντερλευκίνη 2
LCA	Leber Congenital Amaurosis	Leber Συγγενής Αμαύρωση
LMPP	lymphoid-primed MPP	Λεμφοειδή - αρχικά πολυδύναμα κύτταρα
loci	Specific location of a gene, DNA sequence, or position on a Chromosome	Γονιδιακή θέση, αλληλουχία DNA (περιέχει πολλά αλληλόμορφα γονίδια)
LPLD	Lipoprotein Lipase Deficiency	Ανεπάρκεια Λιποπρωτεϊνικής Λιπάσης
LT-HSCs	Long Term-Hematopoietic Stem Cells	Αιμοποιητικά Βλαστικά Κύτταρα Μεγάλου Χρόνου Ζωής
LTRs	Long Terminal Repeats	Μακριές Τερματικές Επαναλήψεις
MLD	Metachromatic Leukodystrophy	Μεταχρωματική Λευκοδυστροφία
MEP	Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor	Προγονικά Μεγακαρυωτικά – Ερυθροκύτταρα
MMPs	Matrix metalloproteinases	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
MPPs	Multipotent progenitor cells	Πολυδύναμα Προγονικά Κύτταρα
nCas9	nickases Cas9	Νικάση Cas9 (ενδονουκλεάση)
NHLBI	National Heart, Lung, and Blood Institute	Εθνικό Ινστιτούτο Καρδιάς, Πνεύμονα και Αίματος
NHEJ	Non-Homologous End Joining	Μη Ομόλογη Σύνδεση Ελεύθερων Άκρων
NK	Natural Killer Cells	Φυσικά Κυτταροκτόνα Κύτταρα
OTCD	Ornithine Transcarbamylase Deficiency	Ανεπάρκεια Τρανσκαρβαμυλάσης της Ορνιθίνης
PAM	Protospacer Adjacent Motif	Μοτίβο Παρακείμενων Πρώτο- Διαχωριστικών Αλληλουχιών (παρακείμενες μικρές αλληλουχίες αναγνώρισης του DNA στόχου)
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Περιφερικά Μονοπύρηνια Κύτταρα του Αίματος
PID	Primary Immunodeficiency	Πρωτογενής Ανοσοανεπάρκεια
pRBC	Packed Red Blood Cells	Συμπυκνωμένα Ερυθροκύτταρα
qPCR	Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction	Ποσοτική σε Πραγματικό Χρόνο Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)
QALY	Quality-Adjusted Life-Year	Ποιοτικώς Σταθμισμένο Έτος Ζωής
RISC	RNA-Induced Silencing Complex	RNA-Σύμπλοκο Επαγωγής Αποσιώπησης
SCD	Sickle Cell Disease	Δρεπανοκυτταρική Αναιμία

SCID	Severe Combined Immunodeficiency	Σοβαρή Συνδυασμένη Ανοσοανεπάρκεια
SCID-X1	Severe Combined Immunodeficiency X1 Disease	Σοβαρή Μικτή Φυλοσύνδετη Ανοσοανεπάρκεια X1
SERCA2a	Sarcoplasmic Reticulum Ca (2+)-ATPase	ΑΤΡάση - Ca (2+) του Σαρκοπλασματικού Δικτύου
SIN	Self-Inactivating	Αυτό Απενεργοποίηση (γ-Ρετροϊών)
SMA	Spinal Muscular Atrophy	Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία
shRNAs	short RNAs	RNA Κοντής Φουρκέτας
siRNA	Small Interference RNA	Μικρό Παρεμβαλόμενο RNA
sgRNA	single guide RNA	Απλός Οδηγός RNA
SNPs	Single-Nucleotide Polymorphisms	Μονονουκλεοτιδικός Πολυμορφισμός
SOS	Sinusoidal Obstruction Syndrome	Σύνδρομο Ημιτονοειδούς Απόφραξης (Αποφρακτικό Σύνδρομο Φλεβών Ήπατος)
sVOE-CR	Severe VOEs-Complete Resolution	Πλήρης Θεραπεία Σοβαρού Αγγειοαποφρακτικού Επεισοδίου
SUPT5H (GENE)	DSIF (DRB Sensitivity Inducing Factor) Elongation Factor Subunit	Γονίδιο: υπομονάδα του παράγοντα επιμήκυνσης της σύνδεσης δίκλωνου RNA (DSIF)
TALENs	Transcription Activator-like Effector Nucleases	Νουκλεάσες Τύπου Μεταγραφικής Ενεργοποίησης
T7E1	T7 Endonuclease 1	T7 Ενδονουκλεάση 1
3PN	Tri-Pronuclear Zygotes	Τριπλοειδές Ζυγωτό
VSVg	Vesicular Stomatitis Virus g	Ιός Φυσαλιδώδους Στοματίτιδας g
VOCe	Vaso-Occlusive Episodes	Αγγειοαποφρακτικό Επεισόδιο
VOCs	Vaso-Occlusive Crises	Αγγειοαποφρακτικές Κρίσεις
VOD	Veno-Occlusive Disease	Φλεβοαποφρακτική Ασθένεια (στο Ήπαρ)
VOD-SOS	Veno-Occlusive Disease - Sinusoidal Obstruction Syndrome	Φλεβοαποφρακτική Ασθένεια - Σύνδρομο Ημιτονοειδούς Απόφραξης
WAS	Wiskott-Aldrich Syndrome	Γουίσκοτ-Άλντριτς Σύνδρομο
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
X-ALD	X- Linked Adrenoleukodystrophy	X-Συνδεδεμένης Αδρενολευκοδυστροφίας
X-CGD	X-linked Chronic Granulomatous Disease	X-Συνδεδεμένη Χρόνια Κοκκιωματώδης Νόσος
ZFNs	Zinc-Finger Nucleases	Νουκλεάσες Δακτύλων-Ψευδαργύρου

## Εισαγωγή

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (W.H.O.) ορίζει την αναιμία ως μια παθολογική κατάσταση κατά την οποία ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων ή η ικανότητά τους να μεταφέρουν οξυγόνο είναι ανεπαρκής. Υπάρχει δηλαδή, μειωμένος απόλυτος αριθμός ερυθροκυττάρων (RBC) κατά την κυκλοφορία του αίματος ή ο αριθμός των RBC και συνεπώς η ικανότητα μεταφοράς του οξυγόνου είναι ανεπαρκής για να καλύψει τις φυσιολογικές ανάγκες του οργανισμού (Chaparro & Suchdev, 2019; Newhall et al., 2020). Ωστόσο, η αναιμία πιο συχνά διαγιγνώσκεται από τη χαμηλή συγκέντρωση της Hb (αιμοσφαιρίνης) ή την χαμηλή τιμή του αιματοκρίτη. Επίσης, μπορεί να διαγνωστεί ελέγχοντας τον αριθμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τον μέσο όγκο των ερυθροκυττάρων, τον αριθμό των δικτυοερυθροκυττάρων του αίματος ή στην περίπτωση της κληρονομικής αναιμίας, με ηλεκτροφόρηση της Hb (Chaparro & Suchdev, 2019).

Παγκοσμίως, η αναιμία υπολογίζεται ότι επηρεάζει 1,6 δισεκατομμύρια ανθρώπους και η διάγνωσή της προσδιορίζεται από τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης του ασθενούς. Όμως, αυτές οι πληροφορίες δεν καθορίζουν την αιτιολογική υποκείμενη παθολογία της αναιμίας (Newhall et al., 2020).

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι οι πιο συχνές μονογονιδιακές διαταραχές διεθνώς με ολοένα και μεγαλύτερη αύξηση των ασθενών σε παγκόσμιο επίπεδο κάθε χρόνο. Με δεδομένο ότι οι περισσότερες αιμοσφαιρινοπάθειες δείχνουν υπολειπόμενη κληρονομικότητα, οι φορείς της ασθένειας είναι συνήθως κλινικά σιωπηλοί. Προγράμματα για προ-σύλληψη και προγεννητικό έλεγχο των φορέων, με δυνατότητα προγεννητικής διάγνωσης, θεωρούνται ευεργετικά σε πολλές ενδημικές χώρες που παρουσιάζονται οι κληρονομικές αναιμίες (Harteveld et al., 2022).

Στην περίπτωση της εξαρτώμενης από μετάγχιση β-θαλασσαιμίας (TDT) και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (SCD), σε παγκόσμιο επίπεδο διαγιγνώσκονται περίπου 60.000 ασθενείς με TDT και 300.000 ασθενείς με SCD (Bauer & Orkin, 2015; Saraf et al., 2014). Αυτές οι δύο ασθένειες προκαλούνται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της β υπομονάδας της αιμοσφαιρίνης (HBB). Οι μεταλλάξεις HBB που προκαλούν TDT έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη σύνθεση ( $\beta^+$ ) ή απουσία ( $\beta^0$ ) της β-σφαιρίνης και ανισορροπία μεταξύ των αλυσίδων της αιμοσφαιρίνης τύπου α και β (π.χ. β, γ και δ),

με αποτέλεσμα την αναποτελεσματική ερυθροποίηση (Cao & Galanello, 2010; Pasricha & Drakesmith, 2018; Shah et al., 2019). Η δρεπανοειδής αιμοσφαιρίνη είναι το αποτέλεσμα μιας σημειακής μετάλλαξης στην HBB. Έτσι, ο πολυμερισμός της υποξυγονωμένης δρεπανοειδούς αιμοσφαιρίνης προκαλεί παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων, αιμόλυση, αναιμία, επώδυνα αγγείο-αποφρακτικά, εγκεφαλικά επεισόδια, βλάβη των τελικών οργάνων και μειωμένο προσδόκιμο ζωής (Pasricha & Drakesmith, 2018).

Με την ανάπτυξη γενετικών εργαλείων όπως η ανάλυση συστοιχιών (Array) και η Αλληλουχία Επόμενης Γενιάς, εκτός από τον έλεγχο τελευταίας τεχνολογίας σε αιματολογικό, βιοχημικό και γενετικό επίπεδο, συνέβαλαν τα τελευταία χρόνια στην ανακάλυψη ενός αυξανόμενου αριθμού σπάνιων ανακατατάξεων και νέων παραγόντων που επηρεάζουν τη σοβαρότητα της νόσου. Προς αυτήν την κατεύθυνση έχει σημασία η συσχέτιση γονότυπου-φαινοτύπου και πώς αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μη αποκαλυπτικές και ιδιαίτερες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες προκαλούν κλινικά πιο σοβαρό φαινότυπο σε ασυμπτωματικούς φορείς. Έτσι, μια ειδική ομάδα ασθενών είναι οι φορείς της β-θαλασσαιμίας οι οποίοι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ενδιάμεσης β-θαλασσαιμίας, ποικίλης κλινικής βαρύτητας. Οι μηχανισμοί της νόσου μπορεί να περιλαμβάνουν διπλά γονίδια α-σφαιρίνης, μερικό μωσαϊκό, Μονογονεϊκή Ισοδισωμία του χρωμοσώματος 11p15.4, όπου βρίσκεται το γονίδιο HBB ή απλή-ανεπάρκεια ενός μη συνδεδεμένου γονιδίου SUPT5H στο χρωμόσωμα 19q, που αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε δύο Ολλανδικές οικογένειες με το χαρακτηριστικό της β-θαλασσαιμίας χωρίς παραλλαγές στο γονίδιο HBB (Harteveld et al., 2022).

Σύμφωνα με τους Gonçalves και Paiva (2017), γονιδιακή θεραπεία είναι η ικανότητα γενετικής βελτίωσης μέσω της διόρθωσης των αλλαγμένων (μεταλλαγμένων) γονιδίων ή τροποποιήσεων τους, που στοχεύουν στη θεραπευτική αγωγή. Αυτή η θεραπεία κατέστη δυνατή μέσω της προόδου της γενετικής μηχανικής, που επέτρεψε τον χειρισμό φορέων για την εισαγωγή εξωχρωμοσωμικού υλικού στα κύτταρα-στόχους. Ένα από τα κύρια σημεία εστίασης αυτής της τεχνικής είναι η βελτιστοποίηση των μεταφορέων του γενετικού υλικού (φορέων) που είναι ως επί το πλείστον πλασμίδια, νανοδομές ή ιοί. Οι ιοί διερευνώνται συχνότερα λόγω της υπεροχής τους να εισβάλλουν στα κύτταρα και να εισάγουν το γενετικό τους υλικό. Ωστόσο, υπάρχει μεγάλη ανησυχία σχετικά με την επιδείνωση των ανοσολογικών αποκρίσεων και ο

χειρισμός του γονιδιώματος, ειδικά σε κύτταρα της γεννητικής σειράς. Μελέτες *in vivo* σε σωματικά κύτταρα έδειξαν ικανοποιητικά αποτελέσματα με εγκεκριμένα πρωτόκολλα σε κλινικές δοκιμές. Αυτές οι δοκιμές έχουν διεξαχθεί στις Η.Π.Α., την Ευρώπη, την Αυστραλία και την Κίνα. Οι πρόσφατες βιοτεχνολογικές εξελίξεις, περιλαμβάνουν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα σε ασθενείς με ηπατικές παθήσεις, την ανοσοθεραπεία με χημειικούς υποδοχείς αντιγόνου T-λεμφοκυττάρων και τη γονιδιωματική επεξεργασία από το σύστημα CRISPR/Cas9.

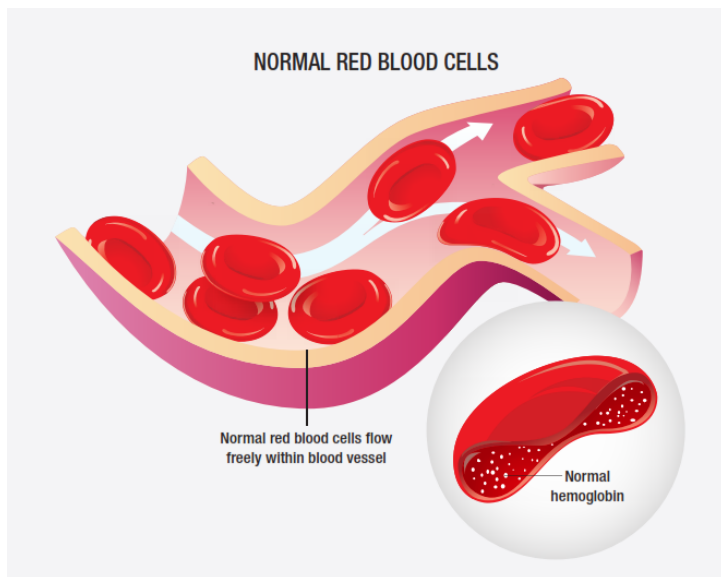
Στην περίπτωση των *in vivo* θεραπειών γονιδιακής επεξεργασίας είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν οι βασικές αιτίες πολλών γενετικών ασθενειών. Αυτό απαιτεί την ικανότητα ασφαλούς και αποτελεσματικής παροχής παραγόντων επεξεργασίας γονιδίων στα σχετιζόμενα όργανα και ιστούς, *in vivo*. Στην κατεύθυνση αυτή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ιικοί φορείς νανοσωματίδια λιπιδίων και σωματιδίων που μοιάζουν με ιούς (Raguram et al., 2022).

Ο κύριος σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας πέρα από την απόκτηση του γνωστικού υπόβαθρου στη γονιδιακή θεραπεία, είναι η διερεύνηση της δυνατότητας θεραπείας των κληρονομικών αναιμιών μέσω της γονιδιακής θεραπείας, την αναφορά στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται προς αυτήν την κατεύθυνση και ειδικότερα στην διερεύνηση της εφαρμογής τέτοιων μεθόδων ως τρόπους αντιμετώπισης και οριστικής θεραπείας των κληρονομικών αναιμιών, με επίκεντρο τη β-θαλασσαιμία και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία. Επίσης, θα παρουσιαστούν ορισμένες κλινικές δοκιμές και τα επιτεύγματα που έχουν γίνει στον τομέα αυτό μέχρι σήμερα, η τεχνολογική εξέλιξη στη χρήση μοριακών εργαλείων, το οικονομικό κόστος εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας στις κληρονομικές αναιμίες, καθώς και οι προοπτικές που ανοίγονται, προσδοκώντας πάντα την οριστική εξάλειψη των κληρονομικών αναιμιών.

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> Παθολογία της Αναιμίας

### 1.1 Γενικά Στοιχεία

Η ερυθροποίηση είναι μια αυστηρά ρυθμιζόμενη και πολύπλοκη διαδικασία που προέρχεται από τον μυελό των οστών, από πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και καταλήγει σε ώριμα, εκπτυγνόμενα ερυθροκύτταρα (Εικόνα 1.1).



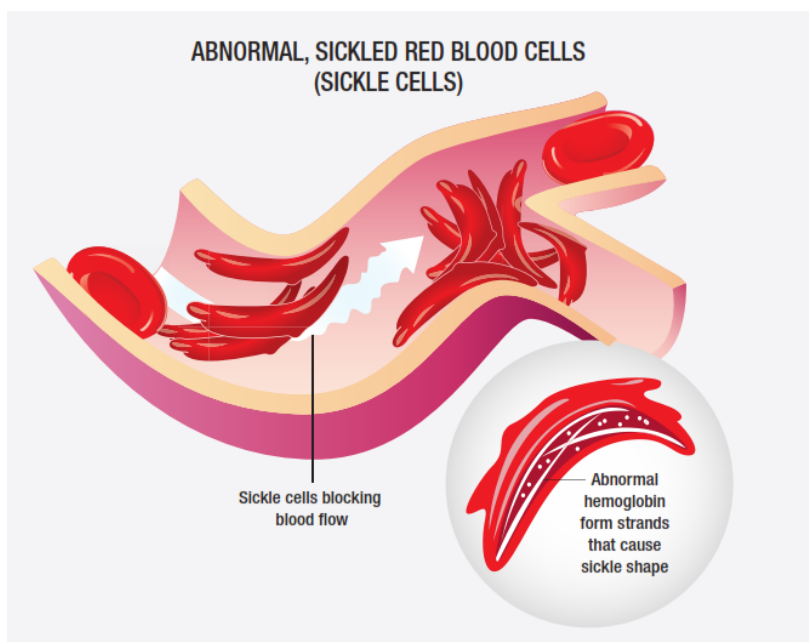
Εικόνα 1.1 Φυσιολογικά ερυθροκύτταρα

*Σημείωση.* Προσαρμοσμένη εικόνα από National Heart, Lung, and Blood Institute, 2022.

Η παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων με αλλαγμένη μορφή μπορεί να προκύψει, από την άμεση βλάβη της μυελικής ερυθροποίησης, όπως παρουσιάζεται στα διαφορετικά σύνδρομα της θαλασσαιμίας, κατά την οποία κληρονομείται η ανεπάρκεια του μυελού των οστών, καθώς και στην αναιμία χρόνιας νόσου. Εναλλακτικά, παρουσιάζεται σε διαταραχές όπως στη δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD) (Εικόνα 1.2), καθώς και στις ενζυμοπάθειες και σε ελαττώματα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων, όπου η μυελική ερυθροποίηση δεν επηρεάζεται άμεσα ή επηρεάζεται ελάχιστα. Παρά αυτές τις διαφορές στην παθοφυσιολογία, οι θεραπείες ήταν παραδοσιακά μη ειδικές, περιοριζόμενες στον συμπτωματικό έλεγχο της αναιμίας μέσω μετάγγισης συσσωρευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων (pRBC), με αποτέλεσμα την υπερφόρτωση σιδήρου και την τελική ανάγκη για χηλοποίηση σιδήρου ή σπληνεκτομή, για τη μείωση της ελαττωματικής καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ομοίως, στην αληθή πολυκυτταραιμία, η υπερπαραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων αντιμετωπιζόταν ιστορικά



με μη ειδική μυελοκαταστολή ή φλεβοτομή. Με μια βαθύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την παθοφυσιολογία της νόσου, έχουν εντοπιστεί νέοι θεραπευτικοί στόχοι, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, της παρέμβασης σε μη φυσιολογικά μονοπάτια σηματοδότησης και της γονιδιακής θεραπείας ως οριστικής θεραπείας (Zivot et al., 2018).



**Εικόνα 1.2 Μη φυσιολογικά ερυθροκύτταρα στη δρεπανοκυτταρική αναιμία**

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από National Heart, Lung, and Blood Institute, 2022.

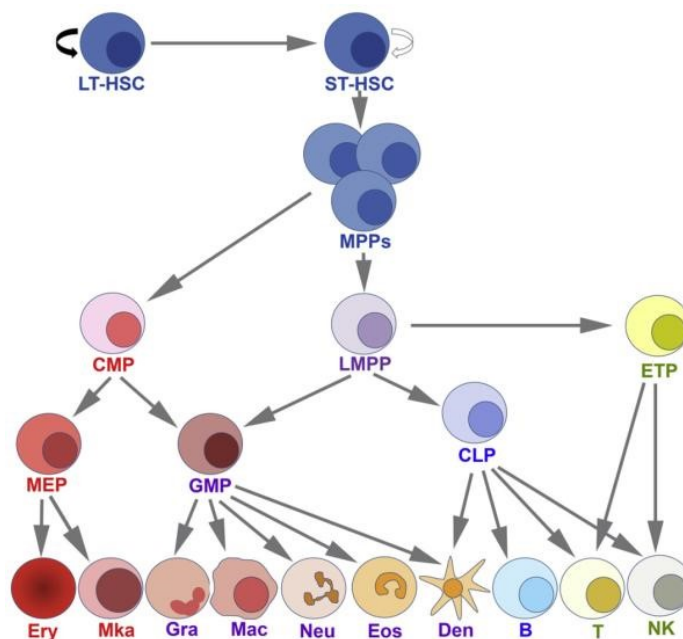
Η παθολογία της αναιμίας μπορεί να χωριστεί σε τρεις ευρείες κατηγορίες: τη μειωμένη παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, την αυξημένη καταστροφή ερυθρών αιμοσφαιρίων και την απώλεια ερυθρών αιμοσφαιρίων μέσω αιμορραγίας. Ωστόσο, η παθολογία της αναιμίας είναι συχνά πολυπαραγοντική και μπορεί παρουσιάζεται ως εκδήλωση μιας υποκείμενης διαταραχής (Newhall, et al., 2020).

Σε επίπεδο πληθυσμού και στην κλινική πράξη, η συγκέντρωση Hb είναι η πιο κοινή μέθοδος αιματολογικής αξιολόγησης για τον ορισμό της αναιμίας. Ο κρίσιμος ρόλος της Hb για τη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς εξηγεί τα πιο κοινά κλινικά συμπτώματα της αναιμίας, τα οποία περιλαμβάνουν κόπωση, δύσπνοια, περιορισμένους παλμούς ή αίσθημα παλμών και ωχρότητα του επιπεφυκότα και της παλάμης. Τα κλινικά σημεία και το ιατρικό ιστορικό χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση της αναιμίας όταν τα αιματολογικά δεδομένα δεν είναι διαθέσιμα, αλλά είναι περιορισμένα στην ικανότητά τους να ανιχνεύουν την αναιμία. Σοβαρή αναιμία

ορίζεται από τον W.H.O. ως  $Hb < 70 \text{ g/L}$  σε παιδιά ηλικίας κάτω των 5 ετών και  $Hb < 80 \text{ g/L}$  σε όλες τις άλλες ηλικιακές ομάδες, παρ' όλο που χρησιμοποιούνται και άλλοι ορισμοί, συμπεριλαμβανομένης της  $Hb < 50 \text{ g/L}$ , που έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια «υψηλής απόδοσης» και στον θάνατο (Chararro & Suchdev, 2019; Schreir, 2018).

## 1.2 Ερυθροποίηση και Κληρονομικές Αναμιμές

Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) είναι αρμόδια για την ανασύσταση όλου του ρεπερτορίου των κυττάρων του αίματος. Αποτελούν τα πρόδρομα αδιαφοροποίητα κύτταρα για τη δημιουργία όλων των κυτταρικών τύπων του αίματος και το σημείο εκκίνησης της αιμοποιητικής διαφοροποίησης. Τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) έχουν την ικανότητα να αυτο-ανανεώνονται και να διαφοροποιούνται σε προγονικά κύτταρα τα οποία διαφοροποιούνται περαιτέρω σε πολλαπλούς τύπους κυττάρων του αίματος και μεταξύ αυτών είναι τα ερυθροκύτταρα (Εικόνα 1.3) (Panigrahi & Pati, 2012).



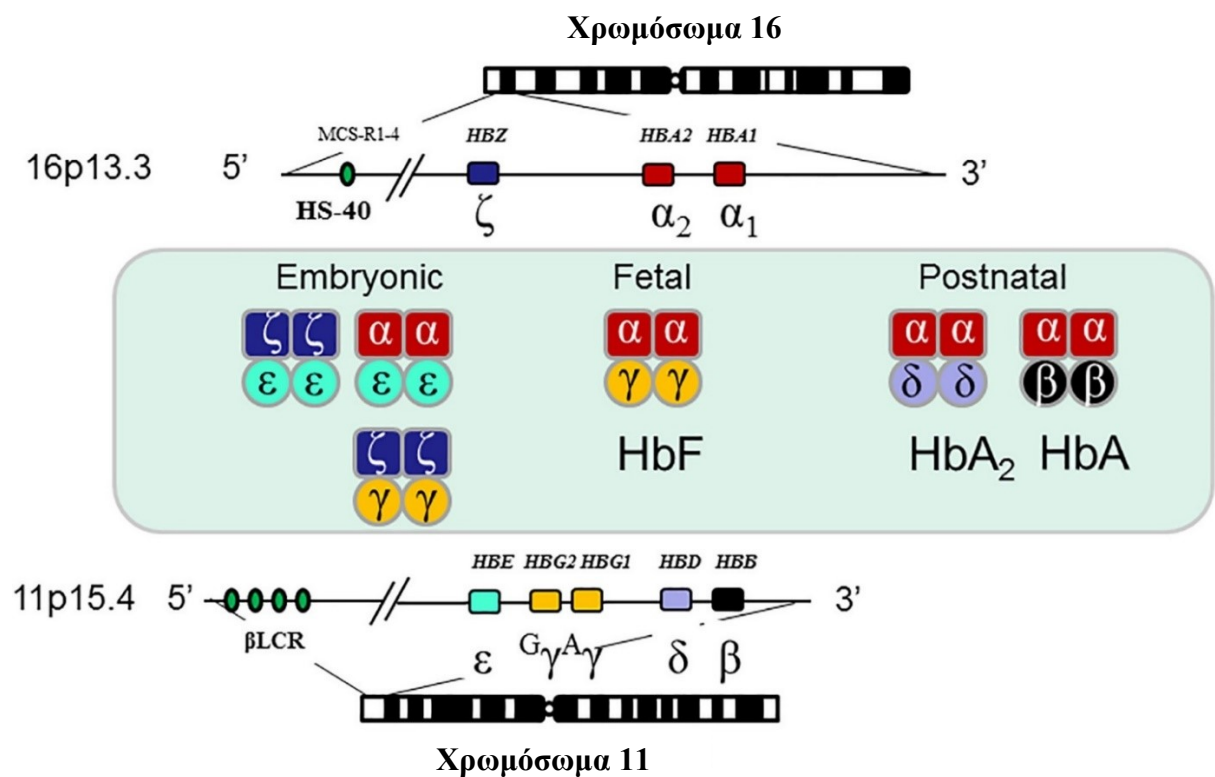
Εικόνα 1.3 Σχηματική αιμοποιητική διαφοροποίηση

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Panigrahi & Pati, 2012. Το στερεό καμπύλο βέλος αντιπροσωπεύει υψηλότερη δυναμική, της αυτο-ανανέωσης των LT-HSCs. Όπου LT-HSCs (αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μεγάλου χρόνου ζωής), ST-HSC (αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα μικρού χρόνου ζωής), MPPs (Πολυδύναμο προγονικά κύτταρα), CMP (Μυελοειδές κοινό προγονικό κύτταρο), LMPP (λεμφοειδές - αρχικό πολυδύναμο κύτταρο), ETP (προγονική γραμμή των T λεμφοκυττάρων), MEP (προγονικό μεγακαρυοκύτταρο-ερυθροκύτταρο) GMP (προγονικό κοκκιοκύτταρο-μονοκύτταρο) CLP (προγονικό κοινό λεμφοειδές), Ery (ερυθρό αιμοσφαίριο), Mka (μεγακαρυοκύτταρο), Gra (κοκκιοκύτταρο), Mac (μακροφάγο), Neu (συνδετερόφιλο), Eos (ηωσινόφιλο), Den (δενδριτικό κύτταρο), B (B - κύτταρο), T (T- κύτταρο), NK (φυσικό κυτταροκτόνο κύτταρο).



Η ανθρώπινη αιμοσφαιρίνη είναι μια τετραμερής πρωτεΐνη που αποτελείται από δύο τύπου άλφα και από δύο τύπου βήτα αλυσίδες σφαιρίνης, που η καθεμία σχηματίζει έναν θύλακα που περιέχει την ομάδα της αίμης για τη δέσμευση του οξυγόνου.

Τα γονίδια των αιμοσφαιρινών είναι διατεταγμένα σε δύο ξεχωριστές ομάδες γονιδίων σε διαφορετικούς χρωμοσωμικούς τόπους, με τη σειρά της έκφρασής τους κατά την ανάπτυξη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.4. Η έκφραση τους, ρυθμίζεται από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταγραφικών παραγόντων και ρυθμιστικών στοιχείων (προαγωγέων και ενισχυτών), για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση γονιδίων σε συγκεκριμένο στάδιο και ιστό και με συγκεκριμένο τρόπο (Farashi & Hartevel, 2018).



Εικόνα 1.4 Σχηματική παρουσίαση της χρωμοσωμικής θέσης του συμπλέγματος των γονιδίων  $\alpha$ - και  $\beta$ -σφαιρίνης στο 16p και 11p αντίστοιχα.

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Farashi & Hartevel, 2018. Τα εμβρυονικά και τα εμβρυϊκά γονίδια φαίνονται στο πλαίσιο. Επίσης απεικονίζονται οι διαφορετικές αιμοσφαιρίνες που εκφράζονται κατά την εμβρυϊκή περίοδο, από αριστερά προς τα δεξιά Hb Gower-1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Gower-2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) και Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), εμβρυϊκή περίοδος (HbF) και η περίοδος μετά τη γέννηση (HbA και HbA<sub>2</sub>).

Οι διαταραχές του γονιδίου της σφαιρίνης (αιμοσφαιρινοπάθειες) χαρακτηρίζονται είτε από μη φυσιολογικές παραλλαγές της αλυσίδας σφαιρίνης, όπως στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, είτε από μειωμένη σύνθεση των σφαιρινών σε ερυθροκύτταρα (θαλασσαιμία) κατά την αιμοποίηση (Weatherall & Clegg, 2008). Οι

αιμοσφαιρινοπάθειες κληρονομούνται ως επί το πλείστον με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο. Η μείωση ή η απουσία αλυσίδων α-σφαιρίνης έχει ως αποτέλεσμα την περίσσεια μη ζευγαρωμένων αλυσίδων σφαιρίνης τύπου β που σχηματίζουν αδιάλυτα ομοτετραμερή οδηγώντας σε ενδοκυτταρική καθίζηση, αναποτελεσματική ερυθροποίηση και οξεία αιμολυτική αναιμία, τυπική για τις σοβαρές μορφές α-θαλασσαιμίας (Yuan et al., 1995).

Οι συγγενείς δυσερυθροποιητικές αναιμίες (CDAs) είναι μια ετερογενής ομάδα κληρονομικών αναιμιών που επηρεάζουν τις φυσιολογικές οδούς διαφοροποίησης-πολλαπλασιασμού της ερυθροειδούς γενεαλογικής σειράς. Ανήκουν στην ευρεία ομάδα των αναποτελεσματικών καταστάσεων ερυθροποίησης που καταλήγουν κυρίως σε μονογραμμική κυτταροπενία. Οι CDAs ταξινομούνται σε 3 κύριους τύπους (I, II, III), μαζί με τις CDAs που σχετίζονται με τον παράγοντα μεταγραφής και τις παραλλαγές CDAs, με βάση τα διακριτικά μορφολογικά, κλινικά και γενετικά χαρακτηριστικά. Η αλληλουχία επόμενης γενιάς έχει φέρει επανάσταση στο πεδίο της διάγνωσης και της έρευνας των CDAs, με μείωση του χρόνου της διάγνωσης και επίσης, βελτίωσε τη διαφορική διάγνωση όσον αφορά τον εντοπισμό νέων αιτιολογικών/τροποποιητών γονιδίων και πολυγονιδιακών καταστάσεων. Οι κύριες βελτιώσεις σχετικά με τα CDAs ήταν στη μελέτη του μεταβολισμού του σιδήρου στην τύπου CDAII με τον σημαντικό ρόλο της ορμόνης ερυθροφερρόνης που προέρχεται από τους ερυθροβλάστες (Iolascon et al., 2020).

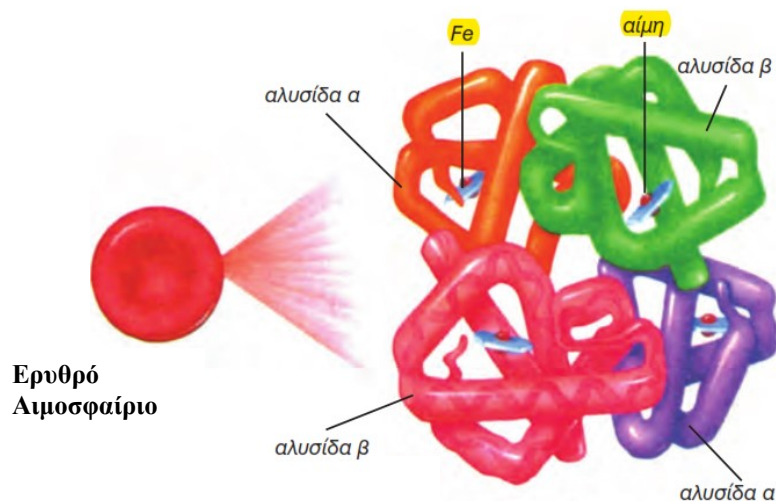
Στις κληρονομικές αναιμίες ανήκουν και οι β-θαλασσαιμίες που είναι κληρονομικές αιματολογικές διαταραχές οι οποίες προκύπτουν από την ανεπαρκή παραγωγή της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης. Έχουν εντοπιστεί περισσότερες από 200 διαφορετικές μεταλλάξεις (Boulad et al., 2018). Πρόκειται δηλαδή για μια ετερογενή ομάδα κληρονομικών αναιμιών με κοινό χαρακτηριστικό την ελαττωματική βιοσύνθεση μιας ή περισσότερων από τις υπομονάδες της β αλυσίδας της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης. Η προέλευσή τους έγκειται σε κληρονομικές μεταλλάξεις που βλάπτουν την έκφραση των προσβεβλημένων γονιδίων της αιμοσφαιρίνης. Το πρόβλημα προκύπτει από τη συνακόλουθη ανεπάρκεια παραγωγής της αιμοσφαιρίνης και την ανισορροπία στην παραγωγή των αλυσίδων της, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση αδιάλυτων ασύζευκτων αλυσίδων. Αυτές καθιζάνουν και βλάπτουν ή καταστρέφουν τους αναπτυσσόμενους ερυθροβλάστες και τα ερυθροκύτταρα, παράγοντας αναποτελεσματική ερυθροποίηση

και αιμολυτική αναιμία. Η θεραπεία σοβαρών περιπτώσεων απαιτεί δια βίου υποστήριξη μετάγγισης με θεραπεία της χηλίωσης του σιδήρου (Benz, 2023).

Η μείζονα β-θαλασσαιμία απαιτεί μεταγγίσεις δια βίου και η μόνη θεραπεία για τη σοβαρή β-θαλασσαιμία είναι η παροχή στους ασθενείς αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Η γονιδιακή θεραπεία σφαιρίνης υπόσχεται μια θεραπευτική μεταμόσχευση αυτόλογων βλαστοκυττάρων χωρίς τις ανοσολογικές επιπλοκές της αλλογενούς μεταμόσχευσης. Οι μελλοντικές κατευθύνσεις της γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνουν την ενίσχυση των προσεγγίσεων που βασίζονται σε λεντι-ϊικούς φορείς, τη λεπτή ρύθμιση του θεραπευτικού σχήματος και τον σχεδιασμό ασφαλέστερων φορέων. Η πρόοδος στη γενετική μηχανική προοιωνίζεται προς την εύρεση θεραπείας για τις σοβαρές διαταραχές της αιμοσφαιρίνης (Boulad et al., 2018).

### 1.2.1 Η Παθοφυσιολογία της β-Θαλασσαιμίας

Η σύνθεση της αιμοσφαιρίνης ελέγχεται από δύο συμπλέγματα πολλαπλών γονιδίων που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 16 (σφαιρίνες τύπου α) και στο χρωμόσωμα 11 (σφαιρίνες τύπου β). Το προϊόν του γονιδίου α συνδυάζεται με το προϊόν του γονιδίου β σχηματίζοντας HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), που είναι η κύρια μορφή αιμοσφαιρίνης των ενηλίκων, Εικόνα 1.5.



Εικόνα 1.5 Το μόριο της αιμοσφαιρίνης HbA

Σημείωση. Προσαρμοσμένη εικόνα από βιβλίο Βιολογίας Α΄ Λυκείου.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, δύο γονίδια της αιμοσφαιρίνης γ, που βρίσκονται επίσης στο χρωμόσωμα 11, συνδυάζονται με γονίδια της α-σφαιρίνης για να σχηματίσουν την HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Μια σταδιακή αλλαγή από HbF σε HbA ξεκινά πριν από τη γέννηση και ολοκληρώνεται σε μεγάλο βαθμό μέχρι την ηλικία των 6 μηνών. Στη β-θαλασσαιμία, μια μετάλλαξη στο γονίδιο της β-σφαιρίνης οδηγεί σε ανισορροπία μεταξύ των αλυσίδων α- και β-σφαιρίνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ασταθών α-τετραμερών στα ερυθροκύτταρα που οδηγεί σε πρόωρο κυτταρικό θάνατο στο πλαίσιο της διαφοροποίησης των ερυθροκυττάρων. Αυτό τελικά προκαλεί αναποτελεσματική ερυθροποίηση με εξασθενημένη διαφοροποίηση των ωριμαζόμενων ερυθροβλαστών στην πολυχρωματική και ορθοχρωματική φάση (Centis et al., 2000) και επίσης δομικές παραμορφώσεις της μεμβράνης (Yuan et al., 1994; Aljurf et al., 1996). Η προκύπτουσα αναιμία διεγείρει μια αντισταθμιστική αύξηση της ερυθροποίησης, με αυξημένο πολλαπλασιασμό των πρόδρομων ερυθροειδών στο μυελό των οστών, που οδηγεί σε μυελική επέκταση, οστικές παραμορφώσεις, εξωμυελική αιμοποίηση και ηπατοσπληνομεγαλία. Επιπλέον, η αναποτελεσματική ερυθροποίηση προκαλεί καταστολή της εψιδίνης (πεπτιδικής ορμόνης που παίζει καθοριστικό ρόλο στην ομοιόσταση του σιδήρου) με αποτέλεσμα την αυξημένη απορρόφηση σιδήρου και την πρωτογενή υπερφόρτωση σε σίδηρο (Rivella 2009; Chambers et al., 2023). Η ορμόνη ερυθροφερόνη που προέρχεται από τους ερυθροβλάστες αναστέλλει ειδικά την παραγωγή εψιδίνης και ο ρόλος της στη μεσολάβηση της ηπατικής υπερφόρτωσης σιδήρου έχει αναλυθεί (Iolascon et al., 2020). Σε ολόκληρο το σώμα, η διατροφική απορρόφηση σιδήρου και η εξαγωγή σιδήρου από τους ιστούς στο πλάσμα ρυθμίζονται από το πεπτίδιο εψιδίνη (hepcidin) που προέρχεται από το ήπαρ. Όταν οι απαιτήσεις σε σίδηρο στους ιστούς είναι υψηλές, οι συγκεντρώσεις της εψιδίνης είναι χαμηλές και αντίστροφα. Δηλαδή, η αυξημένη εψιδίνη οδηγεί σε ελαττωμένη απορρόφηση/απελευθέρωση σιδήρου ενώ χαμηλή εψιδίνη ευνοεί την αύξηση του σιδήρου στο πλάσμα (Anderson & Frazer, 2017).

Σχεδόν 200 μεταλλάξεις στην περιοχή του γονιδίου της β-σφαιρίνης έχουν εντοπιστεί που μπορούν να προκαλέσουν β-θαλασσαιμία. Δεδομένης αυτής της πολυπλοκότητας, είναι πιο χρήσιμο κλινικά να ταξινομηθεί η β-θαλασσαιμία ως μείζονα, ενδιάμεση ή ήπια, με βάση τον βαθμό και τη σοβαρότητα της αναιμίας και τα σωματικά ευρήματα. Η μείζονα θαλασσαιμία αποτελεί σοβαρή εξαρτώμενη από μετάγγιση αναιμία σε ασθενείς που στη γονιδιακή τους σύνθεση είναι ετερόζυγοι ή ομόζυγοι για τα δύο β<sup>0</sup>

αλληλόμορφα γονίδια. Η ενδιάμεση θαλασσαιμία είναι μια γενετικά ετερογενής κατάσταση με ποικίλους βαθμούς αναιμίας, στην οποία οι ασθενείς μπορεί να χρειαστούν διαλείπουσες μεταγγίσεις ή/και σπληνεκτομή. Οι ασθενείς είναι συνήθως ομόζυγοι για το ήπιο  $\beta^+$  αλληλόμορφο γονίδιο της θαλασσαιμίας ή έχουν ετερόζυγη σύνθεση για ένα  $\beta^+$  αλληλόμορφο γονίδιο ήπιας θαλασσαιμίας και ένα  $\beta^0$  αλληλόμορφο γονίδιο σοβαρής θαλασσαιμίας. Οι ασθενείς με ελάχιστο  $\beta^-$  θαλασσαιμία είναι ασυμπτωματικοί και συνήθως μόνο ήπια αναιμικοί, αν και είναι πιθανό να έχουν μικροκυττάρωση. Ο κλινικός φαινότυπος των  $\beta$ -θαλασσαιμιών μπορεί να τροποποιηθεί περαιτέρω από επιπρόσθετους παράγοντες όπως τα αυξημένα επίπεδα HbF ή συν-κληρονομικότητα της  $\alpha$ -θαλασσαιμίας, ιδιαίτερα όταν υπάρχει έλλειψη των 2α αλυσίδων με αποτέλεσμα τη μείωση του σχηματισμού  $\alpha$  τετραμερών, αποδεικνύοντας το ρόλο της ανισορροπίας των  $\alpha/\beta$  αλυσίδων στην παθοφυσιολογία της διαταραχής (Zivot, et al., 2018).

Η HbE/ $\beta$ -θαλασσαιμία που είναι μια διπλή ετεροζυγωτία της αιμοσφαιρίνης E (HbE) και της  $\beta$ -θαλασσαιμίας, είναι το πιο κοινό θαλασσαιμικό σύνδρομο που εντοπίζεται σε ενήλικες στη Νοτιοανατολική Ασία. Οι κλινικές εκδηλώσεις είναι ετερογενείς και μπορεί η μετάλλαξη να είναι πολύ ήπια, αλλά επίσης μπορεί να υπάρξει και περίπτωση η μετάλλαξη να είναι πολύ σοβαρή, παρόμοια με την ομόζυγη  $\beta$ -θαλασσαιμία ή μείζονα θαλασσαιμία. Στην HbE/ $\beta$ -θαλασσαιμία, το ένα αλληλόμορφο γονίδιο ( $\beta^0$ ) δεν παράγει την αλυσίδα της  $\beta$ -σφαιρίνης και το άλλο αλληλόμορφο ( $\beta^E$ ) παράγει μια αλυσίδα σφαιρίνης HbE, που προκύπτει από υποκατάσταση του νουκλεοτιδίου στο 26<sup>ο</sup> κωδικόνιο ( $GAG \rightarrow AAG$ , από γλουταμινικό οξύ σε λυσίνη) (Wattanapanitch et al., 2018).

### 1.2.2 Η Παθοφυσιολογία της Δρεπανοκυτταρικής Αναιμίας

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή που προκαλείται από μια σημειακή μετάλλαξη στην αλυσίδα της  $\beta$ -σφαιρίνης (HBB) με αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος, στην έκτη θέση της  $\beta$  πεπτιδικής αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης, που φυσιολογικά είναι το γλουταμινικό οξύ από το αμινοξύ βαλίνη (Ingram, 1956). Η κληρονομικότητα του  $\beta^S$  και από τους δύο γονείς έχει ως αποτέλεσμα την πιο συχνή και σοβαρή μορφή της νόσου, την Hb SS. Ωστόσο, άλλες σύνθετες ετερόζυγες μορφές της νόσου, συμπεριλαμβανομένων των HbSC,



HbS/ $\beta^0$  θαλασσαιμίας και HbS/ $\beta^+$  θαλασσαιμίας έχουν ως αποτέλεσμα επαρκή έκφραση της HbS που προκαλεί ενδοκυτταρική δρεπάνωση των ερυθροκυττάρων (Ware et al., 2017). Η μη φυσιολογική αιμοσφαιρίνη S προκαλεί ανώμαλο σχηματισμό της  $\beta$ -αλυσίδας, έτσι ώστε κατά τη διάρκεια επεισοδίων υποοξυγόνωσης, τα μόρια HbS να πολυμερίζονται μεταξύ τους για να αναγκάσουν το φυσιολογικό αμφίκυκλο ερυθροκύτταρο σε μια επιμήκη, άκαμπτη μορφή (Acquaye et al., 1988). Τα δρεπανοειδή ερυθροκύτταρα προκαλούν αγγειοαπόφραξη στα τριχοειδή αγγεία και τα αρτηρίδια καθώς και μη φυσιολογικές ενδοθηλιακές αλληλεπιδράσεις και χρόνια αιμόλυση. Αυτό οδηγεί σε αναιμία και υποξία των ιστών που τελικά οδηγεί σε μια ποικιλία σοβαρών επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένων επώδυνων αγγειοαποφρακτικών κρίσεων (VOCs), εγκεφαλικού επεισοδίου, πριαπισμού και οξέος θωρακικού συνδρόμου (ACS). Οι χρόνιες επιπλοκές σχετίζονται με αγγειοπάθεια μικρών και μεγάλων αγγείων, προοδευτική ισχαιμική βλάβη οργάνων και χρόνια αιμόλυση που μπορεί να περιλαμβάνουν εγκεφαλοαγγειακή νόσο, αμφιβληστροειδοπάθεια, πνευμονική υπέρταση, πέτρες στη χολή, νεφρική ανεπάρκεια, υποσπληνισμό, νόσο των οστών, ηπατοπάθεια και πρόωρο θάνατο (Piel et al., 2017; Powars et al., 2005).

### 1.2.3 Η Παθοφυσιολογία της $\alpha$ -Θαλασσαιμίας

Η  $\alpha$ -θαλασσαιμία προκύπτει από τη μείωση ή την απουσία αλυσίδων  $\alpha$ -σφαιρίνης που οδηγεί σε περίσσεια  $\beta$ -αλυσίδων οι οποίες σχηματίζουν ένα ίζημα μέσα στα αναπτυσσόμενα ερυθρά αιμοσφαίρια. Οι μη δεσμευμένες  $\beta$ -αλυσίδες σχηματίζουν τετραμερή, που ονομάζονται HbH ( $\beta_4$ ) στους ενήλικες ή Hb Bart ( $\gamma_4$ ) στην εμβρυϊκή περίοδο, προκαλώντας αιμολυτική αναιμία και αναποτελεσματική ερυθροποίηση. Τα άτομα που προσβάλλονται από  $\alpha$ -θαλασσαιμία έχουν ποικίλους βαθμούς αναιμίας, μικροκυττάρωσης και ποσοστό HbA<sub>2</sub> ανάλογα με τον αριθμό των προσβεβλημένων μη λειτουργικών γονιδίων της  $\alpha$  σφαιρίνης (1-4 γονίδια  $\alpha$ -σφαιρίνης) και τη σχετική αναλογία σύνθεσης της λειτουργικής αλυσίδας  $\alpha$  (Kan et al., 1968; Kan & Nathan, 1970). Η κατάσταση του σιωπηλού φορέα της  $\alpha$ -θαλασσαιμίας εμφανίζεται με ένα μόνο ελάττωμα του γονιδίου της  $\alpha$ -σφαιρίνης και οι ασθενείς είναι κλινικά ασυμπτωματικοί. Η διάγνωση εμφανίζεται συνήθως τυχαία μετά από αιματολογική αξιολόγηση ρουτίνας, κατά τον προγεννητικό έλεγχο ή μέρος του γενεαλογικού δέντρου. Τα χαρακτηριστικά της  $\alpha$ -θαλασσαιμίας προκύπτουν όταν διαγράφονται 2α

γονίδια. Οι ασθενείς συνήθως έχουν ήπια αναιμία με μικροκυττάρωση αλλά παραμένουν κλινικά ασυμπτωματικοί. Η νόσος της αιμοσφαιρίνης H (HbH) μπορεί να προκληθεί από μια μετάλλαξη 3 γονιδίων ή μετάλλαξη 2 γονιδίων σε συνδυασμό με μια άλλη μετάλλαξη σφαιρίνης (όπως στην Constant Spring) με αποτέλεσμα λιγότερο από 30% έκφραση, του γονιδίου της α-σφαιρίνης. Οι ασθενείς εμφανίζουν αιμολυτική αναιμία σε ποικίλο βαθμό, με υπερσπληνισμό, ίκτερο και άλλες επιπλοκές όπως πέτρες στη χολή ή λοιμώξεις. Οι ασθενείς με πιο ήπιο φαινότυπο HbH μπορεί να αντιμετωπιστούν με διαλείπουσες μεταγγίσεις αίματος κατά τη διάρκεια περιόδων στρες ή παροδικών ασθενειών. Πιο σοβαρές περιπτώσεις που χαρακτηρίζονται από σοβαρή αιμολυτική αναιμία απαιτούν τακτικές μεταγγίσεις αίματος και θεραπεία χηλώσης.

Άλλη σοβαρή μορφή που μπορεί να προκύψει είναι η ομόζυγη α-θαλασσαιμία Hb Hydrops Fetalis (που προκαλείται από διαγραφή των 4 γονιδίων της α σφαιρίνης). Αυτή η τελευταία μορφή της νόσου είναι γενικά θανατηφόρα κατά τη στιγμή της γέννησης, αν και άτομα που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με μετάγγιση ή μεταμόσχευση, σπάνια έχουν επιβιώσει μέχρι την ενηλικίωση (Yi et al., 2009). Όταν δεν παράγεται η α-σφαιρίνη, τα βρέφη πάσχουν από σύνδρομο Hb Bart's Hydrops Fetalis που χαρακτηρίζεται από σοβαρή ενδομήτρια αναιμία, έντονη ηπατοσπληνομεγαλία, καρδιακή ανεπάρκεια, ασκίτη και καθυστέρηση της ανάπτυξης. Τις περισσότερες φορές τα προσβεβλημένα και πρόωρα νεογνά, συνήθως πεθαίνουν στη μήτρα ή λίγο μετά τη γέννηση τους (Harteveld & Higgs, 2010).

### 1.3 Συμβατικές Θεραπείες στις Κληρονομικές Αναιμίες

Οι ασθενείς με κληρονομικές αναιμίες και αιμοσφαιρινοπάθειες (όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία και η β-θαλασσαιμία) υποβάλλονται σε θεραπεία με μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) για την ανακούφιση των συμπτωμάτων τους. Μερικοί από αυτούς τους ασθενείς μπορεί να έχουν σπάνιους τύπους ομάδων αίματος ή να αναπτύσσουν αυτοάνοσες αντιδράσεις, οι οποίες μπορεί να δυσκολέψουν την παροχή συμβατού αίματος από τον πληθυσμό των δοτών. Εργαστηριακά αναπτυγμένα RBC αντιπροσωπεύουν μια ιδιαίτερα ελκυστική εναλλακτική λύση που θα μπορούσε να ικανοποιήσει μια ανεκπλήρωτη κλινική ανάγκη. Η πρόκληση, ωστόσο, είναι να παραχθεί - από περιορισμένο αριθμό βλαστοκυττάρων - τα  $2 \times 10^{12}$

RBC που απαιτούνται για μια τυπική θεραπευτική δόση των ενηλίκων. Έχει σημειωθεί ενθαρρυντική πρόοδος στην παραγωγή RBC από ενήλικα βλαστοκύτταρα στο πλαίσιο της ορθής παρασκευαστικής πρακτικής. Το 2011, η ομάδα Douay διεξήγαγε μια επιτυχή μίνι-μετάγγιση αυτόλογων παρασκευασμένων RBC σε έναν μόνο εθελοντή. Στο Ηνωμένο Βασίλειο, σχεδιάζεται μια δοκιμή για να αξιολογηθεί εάν τα εργαστηριακά RBC είναι ισοδύναμα με τα RBC που παράγονται φυσιολογικά στους δότες, δοκιμάζοντας μια αλλογενή μίνι δόση εργαστηριακών RBC που έχουν καλλιεργηθεί στο εργαστήριο, για να χορηγηθούν σε πολλούς εθελοντές (Pellegrin et al., 2021).

#### 1.4 Στρατηγικές Θεραπείας των Κληρονομικών Αναμιμών

Η κληρονομική αναιμία έχει διάφορες εκδηλώσεις, όπως τη δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD), την αναιμία Fanconi, την ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PDD) και τις θαλασσαιμίες. Οι διαθέσιμες στρατηγικές διαχείρισης για αυτές τις διαταραχές εξακολουθούν να μην είναι ικανοποιητικές και δεν εξαλείφουν τις κύριες αιτίες. Όμως, αφού οι γενετικές μεταλλάξεις είναι οι κύριες αιτίες όλων των μορφών κληρονομικής αναιμίας, η βέλτιστη προσέγγιση περιλαμβάνει την αποκατάσταση του ελαττωματικού γονιδίου, πιθανώς μέσω μεταμόσχευσης φυσιολογικών αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSCs) από έναν συμβατό δότη ή μέσω των προσεγγίσεων της γονιδιακής θεραπείας (είτε *in vivo* είτε *ex vivo*) για τη διόρθωση των HSCs του ασθενούς. Έτσι, η μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων με διορθωμένο γονίδιο έχει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα για την SCD, την αναιμία Fanconi και τις θαλασσαιμίες και μπορεί να ξεπεράσει τον περιορισμό της πηγής αλλογενούς μεταμόσχευσης μυελού των οστών (Anurogo et al., 2021).

Ωστόσο, παρά τη σημαντική πρόοδο στη μεταμόσχευση με την προσθήκη εναλλακτικών πηγών αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων, πολλοί ασθενείς με κληρονομικά σύνδρομα της ανεπάρκειας του μυελού των οστών, εξακολουθούν να μην είναι επιλέξιμοι για μεταμόσχευση. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα των πλαισίων αλληλουχίας έχει βελτιώσει σημαντικά τη διάγνωση με τον εντοπισμό των κρυμμένων κληρονομικών περιπτώσεων. Τα ανδρογόνα είναι η κύρια μη μεταμοσχευτική



θεραπεία για την ανεπάρκεια του μυελού των οστών στη συγγενή Δυσκεράτωση και την αναιμία Fanconi, φθάνοντας σε ανταποκρίσεις έως και στο 80% των περιπτώσεων. Η δαναζόλη και η οξυμεθολόνη χρησιμοποιούνται συχνότερα, αλλά η αρρενοποίηση και η ηπατική τοξικότητα είναι από τα μεγαλύτερα προβλήματα που παρουσιάζονται. Η αναιμία Diamond-Blackfan συνήθως αντιμετωπίζεται με κορτικοστεροειδή, αλλά οι περισσότεροι ασθενείς τελικά γίνονται ανθεκτικοί σε αυτή τη θεραπεία και μπορεί να υπάρξει τοξικότητα με περεταίρω αύξηση της δόσης (δοσοπεριοριστική). Οι αυξητικοί παράγοντες εξακολουθούν να διαδραματίζουν ρόλο σε κληρονομικές περιπτώσεις αναιμιών, ιδιαίτερα ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων σε συγγενείς ουδετεροπενίες. Οι νέες θεραπείες είναι δικαιολογημένες και οι ανταγωνιστές των υποδοχέων θρομβοποιητίνης, η λευκίνη, η κερσετίνη και οι νέες προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας μπορεί να ωφελήσουν περιπτώσεις κληρονομικών αναιμιών στο μέλλον (Calado & Clé, 2017).

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> Γονιδιακή Θεραπεία

### 2.1 Γενικά Χαρακτηριστικά

Οι πρώτες κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας ξεκίνησαν πριν από περισσότερο από δύο δεκαετίες. Τις πρώτες ημέρες, η γονιδιακή θεραπεία είχε τη μοίρα πολλών προσεγγίσεων της πειραματικής ιατρικής και παρεμποδίστηκε από την εμφάνιση σοβαρών παρενεργειών στους λίγους ασθενείς που έλαβαν τη θεραπεία. Η κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών, που οδηγούν σε αναποδιές ή εμπόδια που σχετίζονται με τη θεραπεία και/ή τον φορέα, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη εξαιρετικά εξελιγμένων εργαλείων μεταφοράς γονιδίων με βελτιωμένη ασφάλεια και θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Χρησιμοποιώντας αυτά τα προηγμένα εργαλεία, ξεκίνησαν τα τελευταία χρόνια δοκιμές Φάσης I/II με εξαιρετικά κλινικά αποτελέσματα, για τις οποίες δεν έχουν αναφερθεί παρενέργειες μέχρι στιγμής. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί και εφαρμοστεί κλινικά, πολύ αποτελεσματικές στρατηγικές γονιδιακής στόχευσης και τεχνολογίες επεξεργασίας γονιδίων προς τη σωστή κατεύθυνση. Με περισσότερες από 1900 κλινικές δοκιμές μέχρι σήμερα, η γονιδιακή θεραπεία έχει περάσει από το όραμα στην κλινική πραγματικότητα (Kaufmann et al., 2013).

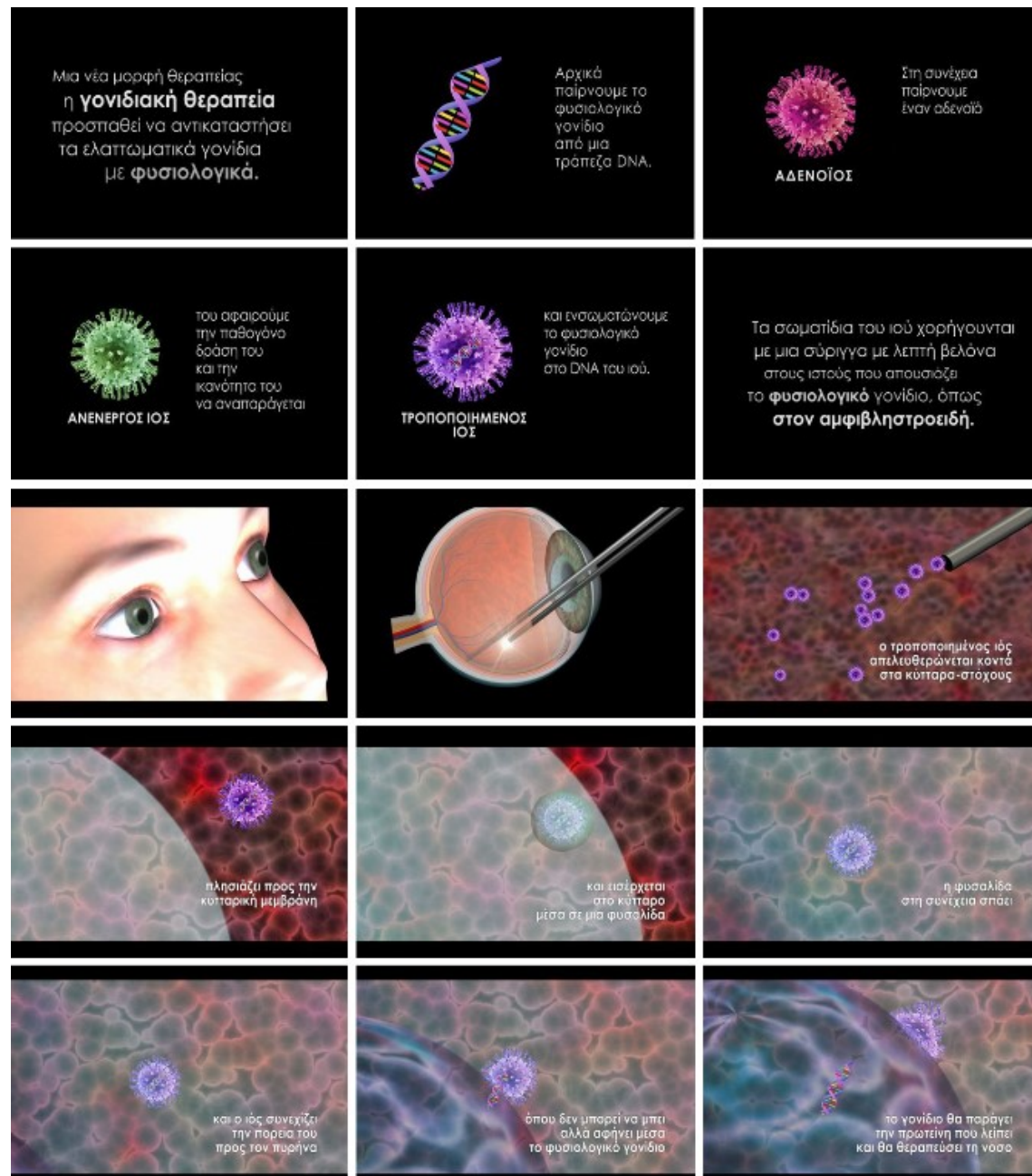
Η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) για τη θεραπεία, τη διαχείριση ή την πρόληψη των ανθρώπινων διαταραχών. Ανάλογα με τον τύπο της νόσου, αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε με τη χορήγηση ενός λειτουργικού, θεραπευτικού γονιδίου ως υποκατάστατο του ελαττωματικού ή ενός ενδογενούς αντίστοιχου σε αυτό που απουσιάζει, είτε με τη μείωση των επιπέδων των προϊόντων ενός επιβλαβούς ελαττωματικού γονιδίου, χρησιμοποιώντας διάφορα εξελιγμένα μοριακά εργαλεία, συμπεριλαμβανομένων των γυμνών ολιγονουκλεοτιδίων καθώς και ιικών και μη ιικών φορέων (Kaufmann et al., 2013).

Οι πρόοδοι στη μηχανική του γονιδιώματος έχουν εισαγάγει νέες συναρπαστικές ευκαιρίες για τους επιστήμονες να κατανοήσουν και να βελτιώσουν τη Βιολογία. Οι προγραμματιζόμενες νουκλεάσες επιτρέπουν στοχευμένες γονιδιωματικές τροποποιήσεις, οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν στη μελέτη βιολογικών μηχανισμών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη ασθενειών, στην ανακάλυψη φαρμάκων, στην εξατομικευμένη ιατρική, στην παραγωγικότητα της γεωργίας, ακόμη και στην περιβαλλοντική βιωσιμότητα (Barrangou & Doudna, 2016). Παρόλο που έχουν

αναπτυχθεί πολλές πλατφόρμες νουκλεασών, συμπεριλαμβανομένων των νουκλεασών δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs) και των νουκλεασών που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής (TALENs), το πρόσφατα κατασκευασμένο σύστημα CRISPR (ομαδοποιημένες τακτικές ενδιάμεσες σύντομες παλινδρομικές επαναλήψεις), (CRISPR)-Cas9 είναι αυτό που χρησιμοποιείται ευρέως. Η δημοτικότητα της πλατφόρμας CRISPR-Cas9 μπορεί να αποδοθεί στον εννοιολογικά απλό σχεδιασμό της, καθώς ένα μόνο βήμα κλωνοποίησης δημιουργεί ένα μοναδικό οδηγό RNA (sgRNA) που κατευθύνει τη δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης με τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης Cas9, στην τοποθεσία ενδιαφέροντος. Αυτό παρακάμπτει τη διαδικασία κλωνοποίησης πολλαπλών σταδίων που απαιτείται για τη συναρμολόγηση των τομέων σύνδεσης DNA που βασίζονται σε πρωτεΐνες που κατευθύνουν τους ZFN και την ενδονουκλεάση TALEN. Επιπλέον, σε αντίθεση με τις νουκλεάσες Cas9, η περιοχή νουκλεάσης FokI των ZFNs και TALENs λειτουργεί ως διμερές, απαιτώντας το σχεδιασμό δύο πρωτεϊνών με αυστηρούς προσανατολισμούς και περιορισμούς απόστασης. Αντίθετα, ο μόνος περιορισμός σχεδιασμού που περιορίζει την κοινώς χρησιμοποιούμενη νουκλεάση Cas9 στο *S. pyogenes* είναι η απαίτηση ενός γειτονικού μοτίβου 5'-NGG-3' πρωτοδιαχωριστή (PAM), στο πρότυπο στόχο αμέσως μετά την αλληλουχία στόχου του sgRNA. Ωστόσο, αυτή η προϋπόθεση μπορεί να γίνει πιο ευέλικτη με τη χρήση εξειδικευμένων Cas9 με διαφορετικές ειδικές αλληλουχίες PAM (Kleinstiver et al., 2015; Ran et al., 2015). Η δέσμευση της Cas9 εξαρτάται από το PAM και κατά τη συμπληρωματική σύζευξη των βάσεων του sgRNA με το DNA στόχο, η Cas9 δημιουργεί μια στοχευμένη διάσπαση διπλού κλώνου στο DNA (Anders et al., 2014). Αυτό το σπάσιμο επιδιορθώνεται στη συνέχεια από τον μηχανισμό ενδογενούς κυτταρικής επισκευής και μπορεί να οδηγήσει σε τοπική εισαγωγή και/ή διαγραφή (indels) μέσω της οδού μη ομόλογης τελικής ένωσης (NHEJ) ή σε ακριβή τροποποίηση της αλληλουχίας μέσω ομόλογης κατευθυνόμενης επιδιόρθωσης (HDR), όταν ο χρήστης παρέχει ένα τμήμα πρότυπο δότη (Sentmanat et al., 2018).

Εργαλεία επεξεργασίας γονιδιώματος, όπως το σύστημα που σχετίζεται με σύντομες παλινδρομικές επαναλήψεις (CRISPR)-συνδεόμενο σύστημα (Cas) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την τροποποίηση γονιδίων σε συστήματα μοντέλων, συμπεριλαμβανομένων των ζωικών ζυγωτών και των ανθρώπινων σωματικών κυττάρων με πολύ καλές προοπτικές τόσο για τη βασική έρευνα όσο και για κλινικές εφαρμογές. Μέχρι σήμερα, παραμένει ένα σοβαρό κενό γνώσης η κατανόηση των

μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA σε ανθρώπινα πρώιμα έμβρυα και η αποτελεσματικότητα των πιθανών εκτός στόχου επιδράσεων της χρήσης τεχνολογιών όπως το σύστημα CRISPR/Cas9 σε ανθρώπινα προ-εμφυτευτικά έμβρυα (Liang et al., 2015). Στην εικόνα 2.1 (Athens Eye Hospital, 2024), βλέπουμε παράδειγμα χορήγησης γονιδιακής θεραπείας χρησιμοποιώντας AAV φορέα.

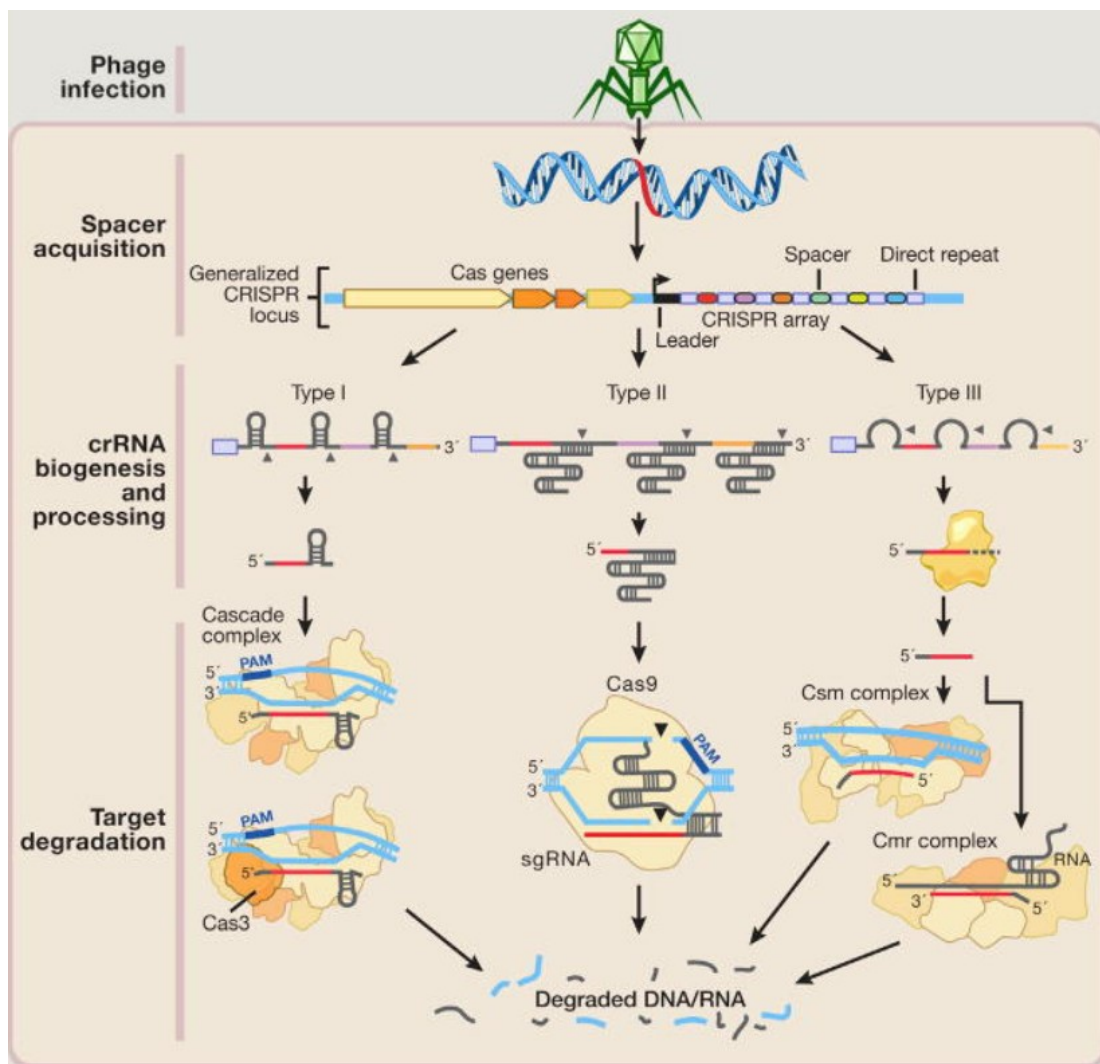


Εικόνα 2.1 Εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας στη συγγενή αμαύρωση του Leber

Από την τρέχουσα γενιά τεχνολογιών επεξεργασίας γονιδιώματος, η πιο γρήγορα αναπτυσσόμενη είναι η κατηγορία των κατευθυνόμενων από RNA ενδονουκλεασών,



γνωστών ως Cas9 από το μικροβιακό προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα CRISPR (ομαδοποιημένες τακτικές ενδιάμεσες σύντομες παλινδρομικές επαναλήψεις), οι οποίες μπορούν εύκολα να στοχευθούν σε σχεδόν οποιαδήποτε γονιδιωματική θέση επιλογής από έναν σύντομο οδηγό RNA. Ενώ τα γονίδια Cas μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, οι περισσότερες συστοιχίες CRISPR μεταγράφονται πρώτα ως ένα μεμονωμένο RNA πριν από την επακόλουθη επεξεργασία σε μικρότερα CRISPR RNA (crRNAs), τα οποία κατευθύνουν τη νουκλεολυτική δραστηριότητα ορισμένων ενζύμων Cas για την αποικοδόμηση των νουκλεϊκών οξέων-στόχων (Εικόνα 2.2) (Hsu et al., 2014).



Εικόνα 2.2 Φυσικοί μηχανισμοί μικροβιακών συστημάτων CRISPR/Cas9

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Hsu et al., 2014. Μετά την εισβολή στο κύτταρο ξένου γενετικού υλικού από βακτηριοφάγους ή πλασμίδια, συγκεκριμένα CRISPR-συνδεδεμένα (Cas) ένζυμα προσλαμβάνουν τις αλληλουχίες spacers από τις εξωγενείς αλληλουχίες protospacers και τις ενσωματώνουν ανάμεσα στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες CRISPR του βακτηριακού γονιδιώματος. Στα συστήματα I και III, το πρώτο pre-crRNA μεταγράφο διασπάται από τις CRISPR-σχετιζόμενες ριβονουκλεάσες, απελευθερώνοντας πολλαπλά μικρά crRNAs. Στο τύπο II του συστήματος, το ένα trans-ενεργοποιητικό (tracrRNA) υβριδίζεται με τις επαναλήψεις του crRNA, για να δώσει ένα υβριδικό μόριο που θα επεξεργαστεί από την ενδογενή RNase III. Τα ώριμα crRNAs των συστημάτων I και III φορτώνονται εν συνεχεία σε πρωτεϊνικά συμπλέγματα και είναι έτοιμα να αναγνωρίσουν και να πέψουν τις αλληλουχίες στόχους. Στο σύστημα II τα υβριδικά μόρια crRNA-tracrRNA είναι έτοιμα να στοχεύσουν και να πέψουν αλληλουχίες μετά τη δημιουργία συμπλόκου με τη νουκλεάση Cas9.

Γενετική διαταραχή	Μετάλλαξη	Επεξεργαζόμενος στόχος / ή που μπορεί να επεξεργαστεί με CRISPR/Cas9	Αναφορές
Καταρράκτης	Πολλαπλή	Crygc	Wu et al., 2013
β - Θαλασσαιμία	Πολλαπλή	HBB	Liang et al., 2015
Τυροσιναιμία	Πολλαπλή	Fah	Yin et al., 2014
Οξεία Μυελώδης Λευχαιμία	Πολλαπλή	MLL3	Chen et al., 2014
Υψηλά επίπεδα Χοληστερόλης	Υπερχολυστερολαιμία	PCSK9	Ding et al., 2014
Αναιμία Fanconi	c.456+4A>T	FANCC	Osborn et al., 2015
Μυελοϋπερπλαστικό Νεόπλασμα Αληθούς Πολυκυτταραιμία	V617F σημείο μετάλλαξης	JAK2	Smith et al., 2015
Κυστική Ίνωση	Διαγραφή κωδικονίου (κωδικοποιεί την Phe)	CFTR	Schwank et al., 2013
Μελαχρωστική Αμφιβληστροπάθεια	Πολλαπλή	RPGR	Bassuk et al., 2016
Δυστροφία Ενδοθηλίου του κερατοειδή	Πολλαπλή	TGFBI	Usui, 2016
Μυϊκή Δυστροφία του Duchene	Λανθασμένο εξώνιο	DMD	Long et al., 2016
Δρεπανοκυτταρική Αναιμία	(Αδενίνη σε Θυμίνη) στο 6 <sup>ο</sup> κωδικόνιο β-σφαιρίνης	HBB	Huang et al., 2015
Αληθούς Πολυκυτταραιμία (vera)	V61F	JAK2	Smith et al., 2015

**Πίνακας 2.1 Γενετικές διαταραχές που αντιμετωπίζονται με το σύστημα CRISPR/Cas9**

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένος πίνακας από Jamal et al., 2018.

Το CRISPR/Cas9 έχει εφαρμοστεί τόσο in vivo όσο και ex vivo για τη θεραπεία των κυττάρων σε άτομα που πάσχουν από διάφορες γενετικές διαταραχές (Πίνακας 2.1)

και επίσης βελτιστοποιημένο για τη δημιουργία οργανισμών μοντέλου ασθενειών (Jamal et al., 2018). Σε έρευνα των Liang και συνεργατών (2015), βρέθηκε ότι το CRISPR/Cas9 θα μπορούσε να διασπάσει αποτελεσματικά το ενδογενές γονίδιο της β-αιμοσφαιρίνης (HBB). Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της κατευθυνόμενης επισκευής με ομόλογο ανασυνδυασμό μεταξύ των γονιδίων (HDR - πρότυπο για ομόλογη κατευθυνόμενη επιδιόρθωση) και του HBB ήταν χαμηλή και τα επεξεργασμένα έμβρυα ήταν μωσαϊκά. Η διάσπαση εκτός στόχου ήταν επίσης εμφανής σε αυτά τα ζυγωτά 3PN (τριπλοειδές ζυγωτό) όπως αποκαλύφθηκε από τη δοκιμασία T7E1 (T7 RNA ενδονουλεάση 1) και την αλληλουχία ολόκληρου του εξώματος. Επιπλέον, το ενδογενές γονίδιο της δ-αιμοσφαιρίνης (HBD), το οποίο είναι ομόλογο με το HBB, συναγωνίστηκε με τα εξωγενή ολιγονουκλεοτίδια του δότη για να λειτουργήσει ως πρότυπο επιδιόρθωσης, οδηγώντας σε δυσάρεστες μεταλλάξεις. Τα δεδομένα έδειξαν επίσης, ότι η επιδιόρθωση του τύπου HBB σε αυτά τα έμβρυα έλαβε χώρα κατά προτίμηση μέσω της μη κατευθυνόμενης οδού HDR. Επομένως, χρειάζεται περαιτέρω βελτίωση της πιστότητας, λαμβάνοντας υπόψη την ιδιαιτερότητα της πλατφόρμας CRISPR/Cas9, προϋπόθεση για οποιεσδήποτε κλινικές εφαρμογές της επεξεργασίας με τη μεσολάβηση CRISPR/Cas9 (Liang et al., 2015).

## 2.2 In Vivo και Ex Vivo Γονιδιακή Θεραπεία

Υπάρχουν πολλά συστήματα μεταγωγής γονιδίων, τα οποία μπορούν είτε να παρέχουν παροδική είτε σταθερή μεταφορά των γονιδίων. Όταν το θεραπευτικό αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί με την έκφραση ενός μόνο γονιδίου σε μεταμιτωτικό ιστό, ευνοούνται τα συστήματα μη ενσωματωμένων φορέων. Πράγματι, σε μία από τις πρώτες in vivo κλινικές δοκιμές, χρησιμοποιήθηκε ένας εξασθενημένος φορέας που προέρχεται από αδενοϊό για τη θεραπεία της ανεπάρκειας της ορνιθινοτρανκαρβαμυλάσης (OTCD), μιας εγγενούς ασθένειας για τη σύνθεση της ουρίας (Raper et al., 2002). Οι ανοσοαντιδράσεις που προκαλούνται από φορείς και διαγονίδια ήταν αρχικά ανησυχητικές για την in vivo εφαρμογή των σωματιδίων φορέα, όπως τεκμηριώθηκε μετά από τον θάνατο ενός από τα 17 άτομα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία στη δοκιμή OTCD, ο οποίος προκλήθηκε από μια μαζική ανοσολογική αντίδραση κατά του καψιδίου, του εγχυόμενου αδενοϊκού φορέα (Raper et al., 2003). Πλέον, έχουν αναπτυχθεί περίπλοκες τεχνολογίες όχι μόνο για την προστασία των

πρωτεϊνών του ιικού καψιδίου από την αναγνώριση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, αλλά και για την επιτυχή εφαρμογή κλινικών δοκιμών με μη ενσωματωμένους φορείς κυρίως στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας του καρκίνου (Cattaneo et al., 2008; Russell et al., 2012).

	Κύτταρα στόχος	Ασθένεια	Μεταφερόμενο γονίδιο	Φορέας μεταφοράς του γονιδίου	Αναφορές
Ex vivo	T-Λεμφοκύτταρα	ADA-SCID	ADA	γ Πετροϊός	Blaese et al., (1995
	HSC	ADA-SCID	ADA	γ Πετροϊός	Aiuti et al., (2002
		SCID-X1	IL2R $\gamma$ c	Λεντιός	Cavazzana-Calvo et al., (2000)
		WAS	WASP	( $\pm$ SIN πρότυπο)	Boztug et al., (2010) and Aiuti et al., (2013)
		X-CGD	gp91phox		Ott et al., (2006)
	HSC	$\beta$ -θαλασσαιμία	$\beta$ -Σφαιρίνης	SIN-Λεντιός	Cavazzana-Calvo et al., (2010)
	HSC	X-ALD	ABCD1	SIN-Λεντιός	Cartier et al., (2009)
	HSC	MLD	ARSA	SIN-Λεντιός	Biffi et al., (2013)
	HSC	HIV	ZFNs στόχευση CCR5 (εξάλειψη)	Αδενοϊός	Burnett et al., (2012) and Lee et al., (2013)
	Ηπατοκύτταρα	Οικογενής Υπερχολυστερολαιμία	LDL υποδοχέας	γ Πετροϊός	Grossman et al., (1994)
	T-Λεμφοκύτταρα	Κακοήθεια στα B-λεμφοκύτταρα	Anti-CD19 CAR	SIN-Λεντιός	Kalos et al., (2011)
	Κεράτινοκύτταρα	Πομφολυγώδης Επιδερμόλυση (Epidermolysis bullosa)	Λαμινίνη 5 $\beta$ 3	γ Πετροϊός	Mavilio et al (2006)

**Πίνακας 2.2 Κλινικές μελέτες ex vivo γονιδιακής θεραπείας σε διαφορετικές ασθένειες**

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένος πίνακας από Kaufmann et al., 2013. Όπου +SIN (self-inactivating) αναφέρεται στην αυτό-αδρανοποίηση του ιού.

Για τη διόρθωση μονογονιδιακών διαταραχών (Πίνακας 2.2) σε μεταμιτωτικούς ιστούς,

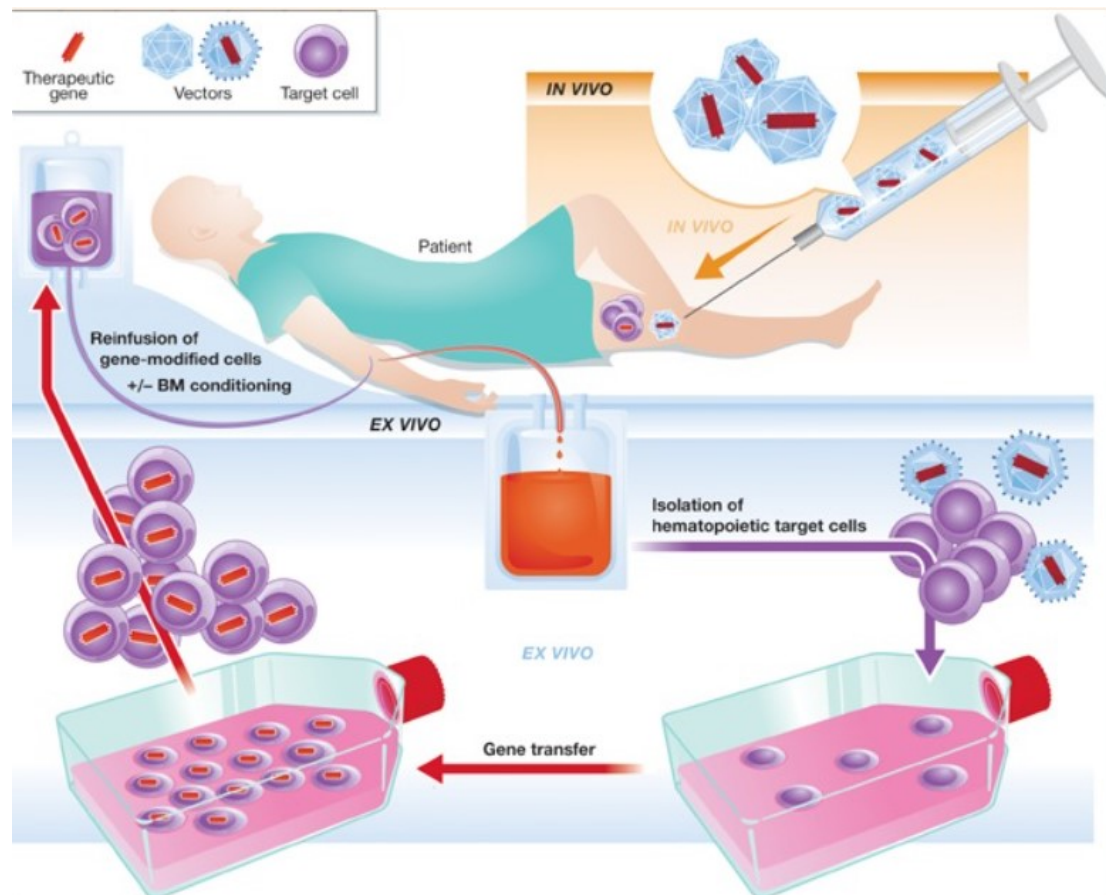


χρησιμοποιούνται επί του παρόντος αδενο-σχετιζόμενοι φορείς προερχόμενοι από ιό (AAV) που σε συνδυασμό με άλλα χαρακτηριστικά, όπως η χαμηλή φλεγμονώδης αντίδραση, έχουν αποδειχθεί ότι έχουν εξαιρετικό προφίλ ασφάλειας και επομένως αποτελούν εξαιρετικά ελκυστικά εργαλεία για την *ex vivo* και *in vivo*, γονιδιακή θεραπεία (Πίνακας 2.2 και Πίνακας 2.3). Έτσι, το φάρμακο Glybera® είναι ένας ανασυνδυασμένος AAV για άμεση ενδομυϊκή ένεση (Εικόνα 2.3) (Kaufmann et al., 2013).

Κύτταρα στόχος ενέσιμη χορήγηση		Ασθένεια	Μεταφερόμενο γονίδιο	Φορέας μεταφοράς του γονιδίου	Αναφορές
In vivo	Ενδοογκική	Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου	p53	Αδενοϊός (Gendicine®)	Wilson (2005) and Shi & Zheng (2009)
	Ενδομυϊκή	LPLD	LPL	AAV1 (Glybera®)	Bryant et al., (2013) and Kastelein et al., (2013)
	Συστηματική/Πυλαία φλέβα	OTCD	OTC	Αδενοϊός	Raper et al., (2002, 2003)
	Υποαμφιβληστροειδική	LCA	RPE65	AAV2	Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008
	Ενδοεγκεφαλική (υποθαλ. πυρήνας)	Ασθένεια Parkinson	GAD	AAV2	Kaplitt et al., (2007) and LeWitt et al., (2011)
	Ενδοεγκεφαλική	Ασθένεια Canavan	ASPA	AAV2	Leone et al., (2012)
	Ενδομυϊκή	Αιμορροφιλία B	F.IX	AAV2	Kay et al., (2000)
	Συστηματική/Πυλαία φλέβα	Αιμορροφιλία B	F.IX	AAV2, AAV8	Manno et al., (2006) Nathwani et al., (2011)
	Έγχυση στη στεφανιαία αρτηρία	Καρδιακή ανεπάρκεια	SERCA2a	AAV1	Jessup et al., (2011)

**Πίνακας 2.3 Κλινικές μελέτες *in vivo* γονιδιακής θεραπείας σε διαφορετικές ασθένειες**  
**Σημείωση.** Προσαρμοσμένος πίνακας από Kaufmann et al., 2013. *In vivo* στόχευση κυττάρων που προκαλούν την ασθένεια και ο φορέας μεταφοράς του γονιδίου θεραπείας.

Για παράδειγμα, σύμφωνα με τον Scott, (2015) το Alipogene tiparvov (Glybera®) χρησιμοποιείται για τη γονιδιακή θεραπεία σε ενήλικες ασθενείς με οικογενή ανεπάρκεια λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL) και σε πάσχοντες από σοβαρή ή πολλαπλή παγκρεατίτιδα και χορηγείται ως εφάπαξ με ενδομυϊκές ενέσεις στα πόδια.



Εικόνα 2.3 *In vivo* και *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Kaufmann et al., 2013. Για την *in vivo* εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας, το θεραπευτικό γονίδιο εισάγεται απευθείας στο σώμα (π.χ. μυς, ήπαρ) του ασθενούς, ενώ για εφαρμογές *ex vivo*, κύτταρα του ασθενούς πρώτα απομονώνονται από το σώμα του και τροποποιούνται γενετικά έξω από το σώμα. Στη συνέχεια επανεισάγονται στον ασθενή ως αυτόλογο μόσχευμα.

Αντίθετα, οι φορείς ρετροϊών προτιμώνται για τη σταθερή μεταφορά γονιδίου σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, αφού έχουν την ικανότητα να ενσωματώνονται στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Τα τρέχοντα πρωτόκολλα περιλαμβάνουν απομόνωση κυττάρων από τον ασθενή που ακολουθείται από γενετική τροποποίηση εκτός του σώματος και επακόλουθη επανεισαγωγή στον ασθενή ως αυτόλογο μόσχευμα (γονιδιακή θεραπεία *ex vivo*). Αυτό μειώνει τον κίνδυνο των ανεπιθύμητων εκτός στόχου επιπτώσεων, όπως η τοξικότητα λόγω της έκφρασης σε λάθος θέση του θεραπευτικού γονιδίου και αποκλείει τη μετάδοση του στα κύτταρα της γεννητικής

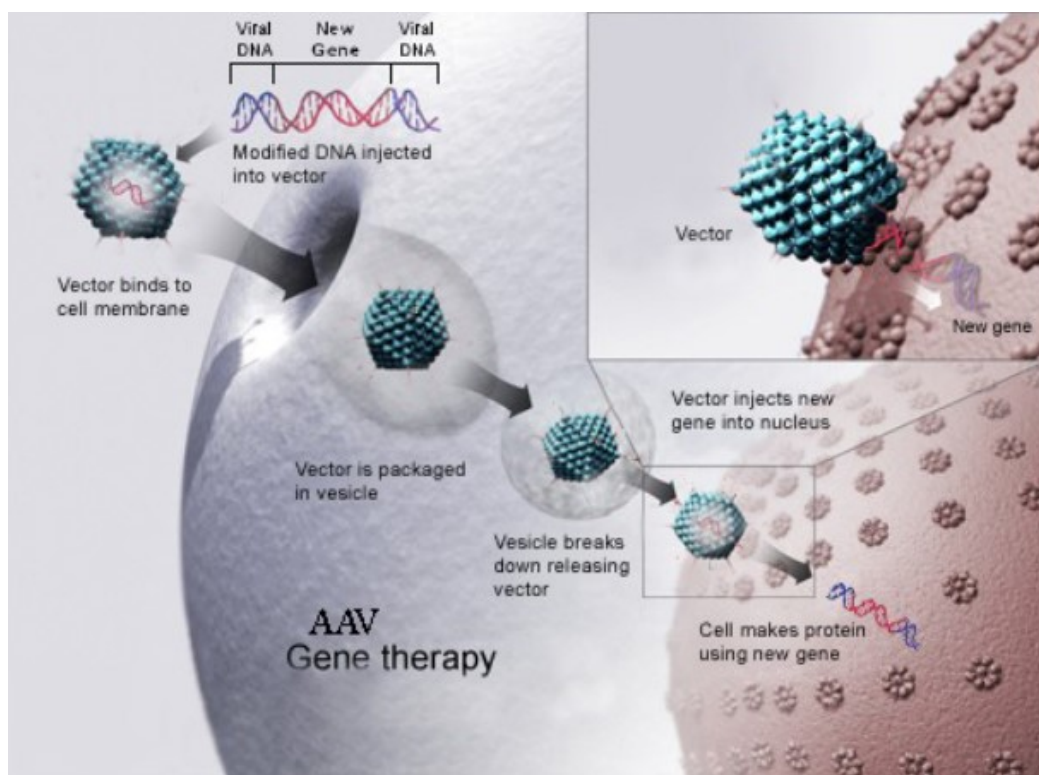
σειράς. Επιπλέον, ο θεραπευτικός παράγοντας μπορεί να χορηγηθεί πιο σθεναρά, καθώς το φάρμακο που βασίζεται σε γονίδια δεν υπόκειται σε μεταβολική ή νεφρική κάθαρση και είναι λιγότερο πιθανό να πυροδοτήσει ανοσοαποκρίσεις. Ανάλογα με το πρωτόκολλο, η *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία μπορεί ακόμη και να επιτρέψει την επιλογή, την επέκταση και τον ποιοτικό έλεγχο των τροποποιημένων κυττάρων πριν από την επανέγχυση, βελτιώνοντας έτσι περαιτέρω την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα (Εικόνα 2.3) (Kaufmann et al., 2013).

Η υιοθέτηση της *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας ως στρατηγική επιλογή έχει επιταχυνθεί την τελευταία δεκαετία, ειδικά σε πρωτογενείς ανοσοανεπάρκειες. Σε αυτές τις διαταραχές, τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα λαμβάνονται από το σώμα του ασθενούς και μετατρέπονται, συχνά με ενσωματωμένους ιικούς φορείς όπως rRV (ανασυνδυσασμένο ρετροϊό) και rLV (ανασυνδυσασμένο λεντιό) και μεταμοσχεύονται πίσω στον ασθενή. Αυτό είναι εξαιρετικά επιτυχές, όπως επιβεβαιώνεται από πρόσφατες ρυθμιστικές εγκρίσεις για σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID) με ανεπάρκεια απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA) και μπορεί να προσφέρει μια ισόβια θεραπεία για ασθενείς που δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με μεταμόσχευση μυελού των οστών (Van Haasteren et al., 2018).

Η διασφάλιση ότι ο φορέας γονιδιακής θεραπείας εκφράζει το θεραπευτικό διαγονίδιο στο σωστό κύτταρο μπορεί να είναι δύσκολη, καθώς η συστημική χορήγηση ειδικότερα, αλλά και η τοπική χορήγηση σε κάποιο βαθμό θα διασκορπίσουν ευρέως τον φορέα μέσω (τμημάτων) του σώματος, μέσω του λεμφικού συστήματος ή της κυκλοφορίας του αίματος. Έτσι, η χορήγηση γονιδίων απαιτεί να είναι ακριβής σε ικανοποιητικό βαθμό, όχι μόνο στη στόχευση του σωστού κυττάρου αλλά και στην αποφυγή των κυττάρων μη-στόχων. Όμως, η ανάπτυξη μιας επιτυχημένης στρατηγικής χορήγησης διαγονιδίου σε ένα όργανο, κατάλληλης για όλες τις εφαρμογές στο συγκεκριμένο όργανο, είναι απίθανη καθώς οι ασθένειες που επηρεάζουν το ίδιο όργανο μπορεί να προέρχονται από διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Έτσι, μια επιτυχημένη *in vivo* γονιδιακή θεραπεία θα πρέπει να αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας μια τριμερή προσέγγιση, εστιάζοντας στη μέθοδο χορήγησης, τον φορέα χορήγησης και τη διανομή (χορήγηση) στα κύτταρα-στόχους (Van Haasteren et al., 2018).

Τα νουκλεϊκά οξέα χρησιμοποιούνται σε πολλές θεραπευτικές μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής θεραπείας, αλλά η ικανότητά τους να

πυροδοτούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή *in vivo* μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα. Στην περίπτωση των αδενο-σχετιζόμενων ικών φορέων (AAV) (Εικόνα 2.4), μελέτες έχουν δείξει ότι το γονιδίωμα του φορέα ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου Toll 9 (TLR9), έναν υποδοχέα αναγνώρισης προτύπων που ανιχνεύει ξένο DNA (Chan et al., 2021). Οι ανάλογοι των Toll υποδοχείς (Toll-like receptors, TLRs) ανήκουν στην οικογένεια των υψηλά συντηρημένων υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (pattern-recognition receptors) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων του δότη και στην ανάπτυξη ασθένειας μοσχεύματος κατά ξενιστή aGvHD (Ζώγας κ.α., 2016).

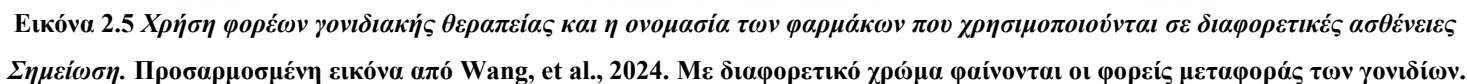


**Εικόνα 2.4 Γονιδιακή θεραπεία με χρήση φορέα AAV**

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Church, 2010. Ένα νέο γονίδιο εισάγεται σε ένα κύτταρο χρησιμοποιώντας το πρωτεϊνικό περίβλημα του AAV. Μόλις εισέλθει στον πυρήνα, το νέο γονίδιο παράγει λειτουργική πρωτεΐνη για τη θεραπεία μιας ασθένειας.

Ο αδενο-σχετιζόμενος ιός (AAV) έχει αναδειχθεί ως βασικό εργαλείο διανομής στην κλινική γονιδιακή θεραπεία λόγω της ελάχιστης παθογονικότητάς του και της ικανότητάς του να καθιερώνει μακροπρόθεσμη γονιδιακή έκφραση σε διαφορετικούς ιστούς. Ο ανασυνδυασμένος AAV (rAAV) έχει σχεδιαστεί για ενισχυμένη εξειδίκευση και αναπτύχθηκε ως εργαλείο για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών (Εικόνα 2.5) (Wang et al., 2024).





### 2.2.1 Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα της In Vivo και Ex Vivo Γονιδιακής Θεραπείας

Ένα από τα πλεονεκτήματα της ex vivo γονιδιακής θεραπείας είναι η ικανότητα «δειγματοληψίας» των μετά διεγερθέντων (τροποποιημένων) κυττάρων πριν από τη χορήγηση τους στον ασθενή. Αυτό διευκολύνει τους ελέγχους αποτελεσματικότητας και ασφάλειας πριν από την εισαγωγή του προϊόντος στον ασθενή. Για παράδειγμα η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της μεταγωγής ή/και της ακριβούς επανάληψης των γεγονότων ενσωμάτωσης του προϊόντος που έχει εγχυθεί. Στην περίπτωση της ex-vivo γονιδιακής θεραπείας σε κύτταρα του αίματος, υπάρχει επίσης εύκολη πρόσβαση στα κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή ακόμη και μετά τη χορήγηση μέσω δειγματοληψίας αίματος. Τέτοιες προσεγγίσεις δεν είναι τόσο απλές για την in vivo γονιδιακή θεραπεία, όπου οι ερευνητές μπορεί να χρειαστεί να καταφύγουν σε βιοψίες ιστού και αξιολόγηση του φαινοτύπου της ασθένειας, για να προσδιορίσουν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα, ειδικά σε περιπτώσεις όπου το θεραπευτικό διαγονίδιο δεν εκκρίνεται στην κυκλοφορία του αίματος (Van Haasteren et al., 2018).

Η μεταφορά γονιδίων βλαστοκυττάρων μπορεί να επιτευχθεί είτε με την ex vivo ή την in vivo γονιδιακή θεραπεία. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μια δια βίου θεραπεία, όπου το θεραπευτικό DNA διατηρείται πιστά και εκφράζεται στα θυγατρικά κύτταρα, όπως μπορεί να επιτευχθεί με την ενσωμάτωση ιικών φορέων. Ενώ στην ex vivo γονιδιακή θεραπεία αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων το αποτέλεσμα στο κύτταρο-στόχο είναι εμφανές (π.χ. στα κύτταρα CD34<sup>+</sup>), συχνά δεν μπορεί να ειπωθεί το ίδιο για in vivo γονιδιακή θεραπεία π.χ. σε όργανα όπως στον πνεύμονα ή το ήπαρ (Van Haasteren et al., 2018).

Ενώ οι θεραπείες που βασίζονται σε βλαστοκύτταρα είναι εγγενώς ελκυστικές, οι προσεγγίσεις που στοχεύουν σε κύτταρα που δεν διαιρούνται εύκολα μπορεί επίσης να έχουν αξία. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα σε ασθένειες όπου το θεραπευτικό γονίδιο μπορεί να δώσει πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα, όπως στην SCID, και/ή όπου η εισαγωγή μιας ενεργής μεταγραφικής μονάδας (τουλάχιστον ενός προαγωγέα και διαγονιδίου) μπορεί να επηρεάσει γειτονικά γονίδια που διαταράσσουν τη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης, που οδηγεί σε υπό ή υπερπολλαπλασιασμό. Είναι πιθανό ότι αυτή η μεταλλαξογόνος επίδραση εισαγωγής είναι πιο έντονη σε κύτταρα με υψηλή δυνατότητα πολλαπλασιασμού, όπως τα βλαστοκύτταρα ή τα προγονικά κύτταρα. Είναι σημαντικό ότι προσεγγίσεις για την ελαχιστοποίηση τέτοιων επιδράσεων στο ex-

νίνο πεδίο έχουν υιοθετηθεί ευρέως από εκείνους που αναπτύσσουν φορείς για *in vivo* μεταφορά γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της χρήσης αυτό-απενεργοποιούμενων φορέων και της αυξανόμενης μετάβασης από ρετροϊκούς σε λεντι-ϊκούς φορείς (Aiuti et al., 2017; Van Haasteren et al., 2018).

Καθώς ο αριθμός των κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας αυξάνεται, υπάρχει συνακόλουθη ανάγκη για αυξημένη παραγωγή φορέων. Η βελτίωση της συνολικής απόδοσης παραγωγής φορέων και η επέκταση της παραγωγικής ικανότητας θα είναι σημαντικοί στόχοι, διαφορετικά θα αποτελέσουν εμπόδια στην πρόοδο της γονιδιακής θεραπείας. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τις *in vivo* προσεγγίσεις, όπου μπορεί να χρειαστούν πολύ μεγάλες ποσότητες φορέα για τη στόχευση ολόκληρων οργάνων. Ένα πρόβλημα είναι ότι μεγάλο μέρος του παρεχόμενου παράγοντα γονιδιακής θεραπείας μπορεί να σπαταληθεί λόγω αναποτελεσματικών συσκευών χορήγησης, ενός ιδιαίτερου προβλήματος για τη χορήγηση αερολύματος στον πνεύμονα και της ικανότητας του σώματος να καθαρίζει ξένους παράγοντες σωματιδίων (Laube, 2015). Είναι κρίσιμο, επίσης, να επιδιωχθεί η ανάπτυξη φορέων που είναι πιο αποτελεσματικοί, έτσι ώστε να απαιτείται χαμηλότερη δόση για αποτελεσματικότητα (Van Haasteren et al., 2018).

### 2.2.2 Παρενέργειες Χρήσης Φορέων στη Γονιδιακή Θεραπεία

Οι σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρήθηκαν στις πρώιμες δοκιμές γονιδιακής θεραπείας με χρήση γαμμαρετροϊκών φορέων οδήγησαν σε εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τη διαδικασία ενσωμάτωσης ρετροϊών σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και πρωτογενή ανθρώπινα HSCs (CD34<sup>+</sup>) (Cattoglio et al., 2007; Deichmann et al., 2011; Derseet, 2007, Mitchell et al., 2004). Αυτές οι μελέτες αποκάλυψαν ότι οι φορείς γαμμαρετροϊών τείνουν να ενσωματώνονται σε στενή γειτνίαση με γονιδιακές ρυθμιστικές περιοχές (προαγωγείς, ενισχυτές, περιοχές ελέγχου θέσης) υποδηλώνοντας υψηλό κίνδυνο μεταγραφικής διαρρύθμισης, ειδικά επειδή οι διαμορφώσεις φορέα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις πρώιμες δοκιμές περιείχαν άθικτες του 5' άκρου επιμήκεις τελικές επαναλήψεις (LTR), συμπεριλαμβανομένων στοιχείων ισχυρού ενισχυτή και προαγωγέα, τα οποία αρχικά είχαν σκοπό να αυξήσουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Επιπλέον, η ανακάλυψη περιοχών



επικίνδυνων σημείων για ενσωμάτωση ρετροϊών, αύξησε την πιθανότητα απορρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.

Περαιτέρω παρατηρήσεις οδήγησαν στην ανάπτυξη του σχεδιασμού του SIN (αυτό-απενεργοποιούμενο) φορέα ρετροϊού με διαγραφές στην περιοχή U3 του 5' άκρου των LTR με αποτέλεσμα μεταγραφικά ανενεργές LTR. Η έλλειψη δραστικότητας του προαγωγέα αντισταθμίζεται από έναν εσωτερικό ετερόλογο προαγωγέα που οδηγεί την έκφραση του διαγονιδίου (Maetzig et al., 2011; Schambach et al., 2013). Αν και η διαμόρφωση SIN δεν είναι γνωστό ότι μεταβάλλει το προφίλ ολοκλήρωσης των γαμαρετροϊικών φορέων, η γονοτοξικότητα των φορέων που περιέχουν εσωτερικούς κυτταρικούς ή ειδικούς ιστικούς προαγωγείς μειώνεται σημαντικά, όπως μετράτε από τη δυνατότητα αυτών των φορέων να επάγουν μετασχηματισμό σε μια *in vitro* δοκιμασία κυτταρικής αθανатоποίησης (Modlich et al., 2006). Πράγματι στα θηλαστικά, η έκφραση που καθοδηγείται από υποκινητές που προσδίδουν περισσότερα φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης, αποκάλυψε μειωμένη επίπτωση ή ακόμα και απουσία ενεργοποίησης πρωτοογκογονιδίων (Zychlinski et al., 2008). Σε αντίθεση με τους γαμαρετροϊικούς φορείς, οι θέσεις εισαγωγής φορέων λεντιών μάλλον υποεκπροσωπούνται σε ρυθμιστικές περιοχές, αλλά αποκάλυψαν μια προτίμηση για ενσωμάτωση στο σώμα των γονιδίων. Αυτό μειώνει, αλλά δεν ανακουφίζει πλήρως, τον κίνδυνο γονοτοξικότητας σύμφωνα με μελέτες που αφορούν το ογκογονικό δυναμικό αυτών των φορέων είτε *in vitro* είτε *in vivo* (Modlich et al., 2009; Montini et al., 2006; Montini et al., 2009). Η κοινή διαπίστωση που προκύπτει από αυτές τις μελέτες είναι ότι η ενσωμάτωση ιικού φορέα είναι μια ενεργή διαδικασία που καταλύεται από τη σύνδεση του συμπλέγματος προενσωμάτωσης του ιού σε ανοιχτές περιοχές χρωματίνης στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, όπως χαρακτηρίζονται από υπερευαίσθητες θέσεις της DNA πολυμεράσης I και επιγενετικά σημάδια (Cattoglio et al., 2010; Deichmann et al., 2011; Felice et al., 2009).

Σε ότι αφορά τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες, αυτές πρέπει να εξισορροπηθούν με το αναμενόμενο κλινικό όφελος για τον μεμονωμένο ασθενή, λαμβάνοντας υπόψη τις κλινικές επιπλοκές που σχετίζονται με εναλλακτικές θεραπευτικές επιλογές, δηλαδή αλλογενή HSCT από μη συμβατό δότη. Πράγματι, η επιτυχία και η σκοπιμότητα της γενετικής θεραπείας είναι αδιαμφισβήτητη, δεδομένου ότι η πλειονότητα των περισσότερων από 60 ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για ADA-SCID και SCID-X1 τις τελευταίες δύο δεκαετίες παρουσίασαν ένα σαφές κλινικό όφελος. Παρά

την εμφάνιση λευχαιμίας σε ορισμένους από αυτούς τους ασθενείς, το ποσοστό συνολικής επιτυχίας της γονιδιακής θεραπείας υπερτερεί των αποτελεσμάτων που προέκυψαν μετά από αλλογενή HSCT με δότες που δεν ήταν συμβατοί με HLA (Kaufmann, et al., 2013).

### 2.2.3 Ασφαλείς Θέσεις Εισαγωγής των Διαγονιδίων στο Γονιδίωμα

Καμία χρωμοσωμική θέση στο ανθρώπινο γονιδίωμα δεν έχει ακόμη αποδειχθεί που να χαρακτηρίζεται ως καλόπιστη «Γονιδιακό ασφαλές Λιμάνι» (GSH), δηλαδή να είναι επαρκής για αξιόπιστη και ασφαλή θεραπευτική προσθήκη διαγονιδίου με οποιοδήποτε επίπεδο εμπιστοσύνης. Τρεις θέσεις έχουν μέχρι σήμερα στοχευθεί ως επί το πλείστον για προσθήκη διαγονιδίου, η αδενο-σχετιζόμενη θέση 1 του ιού (AAVS1), μια φυσική θέση ενσωμάτωσης του ιού AAV στο χρωμόσωμα 19, η θέση του γονιδίου του υποδοχέα 5 (CCR5) χημειοκίνης (μοτίβο C-C), το οποίο είναι ένα γονίδιο υποδοχέα χημειοκίνης γνωστό ως υποδοχέας HIV-1 και η θέση του ανθρώπινου γονιδιώματος ανάλογη του τύπου Rosa26 του ποντικού, ένας τύπος που έχει επικυρωθεί εκτενώς στο περιβάλλον του ποντικού για την εισαγωγή των πανταχού εκφραζόμενων διαγονιδίων (Irion et al., 2007; Perez et al., 2008). Η θέση AAVS1 στο χρωμόσωμα 19 έχει κερδίσει μεγάλη δημοτικότητα λόγω της εμπορικής διαθεσιμότητας αποτελεσματικών εργαλείων για τη στόχευσή της και της ικανότητάς της να υποστηρίζει την έκφραση διαγονιδίων σε πολλαπλούς τύπους κυττάρων (Ramachandra et al., 2011; Smith et al., 2008; Yang et al., 2008; Zou et al., 2011). Ωστόσο, αυτές οι θέσεις δεν μπορούν να υποστηρίξουν την πιστή έκφραση διαγονιδίων, τουλάχιστον σε ορισμένες κυτταρικές σειρές και τα διαγονίδια που εισάγονται στον τόπο AAVS1 μπορούν να αποσιωπηθούν μέσω μηχανισμών που περιλαμβάνουν DNA μεθυλίωση (Ordovás et al., 2015). Επιπλέον, η ενσωμάτωση στον τόπο AAVS1 διαταράσσει τη ρυθμιστική υπομονάδα του γονιδίου της 1 φωσφατάσης 12C (PPP1R12C) και οι συνέπειες της απλοανεπάρκειας ή της πλήρους αδρανοποίησής της σε διάφορους τύπους κυττάρων δεν έχουν διερευνηθεί σε βάθος. Ο τύπος του γονιδίου CCR5 αναγνωρίστηκε ως υποτιθέμενο ασφαλές λιμάνι μετά την ανακάλυψη ότι τα άτομα με φυσική ομόζυγη διαγραφή που οδηγεί σε πλήρη διαταραχή του γονιδίου CCR5 ήταν ανθεκτικά στη μόλυνση HIV-1 και δεν είχαν σημάδια εμφανούς παθολογίας (Liu et al., 1996), αν και μεταγενέστερες μελέτες συσχέτισαν τη

διαγραφή του γονιδίου CCR5 με αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες που προκαλούνται από μόλυνση με τον ιό του Δυτικού Νείλου και τη σχετική Ιαπωνική εγκεφαλίτιδα από ιό (Lim & Murphy, 2011; Larena et al., 2012). Επομένως, η ασφάλεια όλων των παραπάνω τοποθεσιών είναι προς το παρόν άγνωστη και στην καλύτερη περίπτωση πολύ αβέβαιη (λαμβάνοντας υπόψη τον εντοπισμό τους μέσα σε κωδικοποιητικά γονίδια, σε περιοχές με πυκνότητα γονιδίων και την εγγύτητά τους σε γονίδια που εμπλέκονται στον καρκίνο) (Sadelain et al., 2011).

### 2.3 Τα Νέα Δεδομένα στη Γονιδιακή Θεραπεία

Οι SIN-λεντι-ικοί φορείς είναι επί του παρόντος το προτιμότερο εργαλείο για τη μεταφορά γονιδίων σε HSCs, καθώς διαθέτουν ορισμένα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τους φορείς γαμμαρετροϊών που χρησιμοποιήθηκαν στις πρώιμες δοκιμές γονιδιακής θεραπείας (Naldini, 2011). Είναι σημαντικό ότι το σύμπλεγμα προ ενσωμάτωσης των λεντιών μετατοπίζεται ενεργά στον πυρήνα και έτσι διευκολύνει την αποτελεσματική μεταγωγή σε ποικιλία μη διαιρούμενων κυττάρων. Αντίθετα, άλλοι ρετροϊοί όπως οι γαμμαρετροϊοί εξαρτώνται από τη διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης κατά τη διάρκεια της μίτωσης, για τη μεταφορά του φορτίου τους στον πυρήνα του κυττάρου στόχου. Κατά συνέπεια, η αποτελεσματική μεταγωγή των HSCs μπορεί να επιτευχθεί με SIN-λεντι-ικούς φορείς μετά από μικρότερο χρόνο επώασης *in vitro*, διατηρώντας σε κάποιο βαθμό τη φυσιολογική φύση των HSCs και το δυναμικό εμφύτευσης τους. Επιπλέον, οι λεντι-ικοί φορείς μπορούν εύκολα να ψευδοτυποποιηθούν με φακέλους που περιέχουν γλυκοπρωτεΐνες του ιού της φουσαλιδώδους στοματίτιδας (VSVg) παρέχοντας έναν ευρύ τροπισμό και επιτρέποντας αποτελεσματική μεταγωγή των κυττάρων-στόχων όπως τα CD34<sup>+</sup> HSCs. Ο φάκελος VSVg επιτρέπει ισχυρά πρωτόκολλα κατασκευής και καθαρισμού, τα οποία συμβάλλουν σε ανώτερη φαρμακευτική ποιότητα αυτών των φορέων (Merten et al., 2011).

Κλινικές δοκιμές φάσης I/II με SIN-λεντι-ικούς φορείς έχουν ξεκινήσει για αρκετές ασθένειες PIDs, WAS (Wiskott-Aldrich-Σύνδρομο), ADA-SCID (Απαμινάση Αδενοσίνης-Σοβαρή Συνδυασμένη Ανοσοανεπάρκεια), CGD (Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος), καθώς και για ελαττώματα μη PID που επιδέχονται θεραπεία από γονιδιακά τροποποιημένα HSCs, συμπεριλαμβανομένης της X-συνδεδεμένης

Αδρενολευκοδυστροφίας (X-ALD), Μεταχρωματικής Λευκοδυστροφίας (MLD) και της β-θαλασσαιμίας (Kaufmann, et al., 2013).

Οι πιο προηγμένες από αυτές τις μελέτες Φάσης I/II στη WAS έγιναν στο Ηνωμένο Βασίλειο, τη Γαλλία, την Ιταλία και τις ΗΠΑ σε συνολικά 10 ασθενείς οι οποίοι έλαβαν αυτήν τη θεραπεία (Aiuti et al., 2013; Hacein-Bey-Abina et al., 2013). Σε αυτήν την περίπτωση, ένας φορέας SIN-λεντιός που περιείχε ένα τμήμα 1,6 kb πιο πάνω από τη ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου WAS, χρησιμοποιήθηκε για να οδηγήσει την έκφραση του διαγονιδίου WAS (Aiuti et al, 2013; Charrier et al., 2007; Marangoni et al., 2009; Rivat et al., 2012; Scaramuzza et al., 2013). Σε αντίθεση με τον φορέα γαμμαρετροϊού που χρησιμοποιήθηκε στην πρώτη δοκιμή γονιδιακής θεραπείας WAS, αυτός ο λεντι-ικός φορέας παρέχει φυσιολογική ρύθμιση της έκφρασης του διαγονιδίου WAS σε αιμοποιητικά κύτταρα. Οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αυτόλογα HSCs, που τροποποιήθηκαν με τον λεντι-ικό φορέα WAS, εμφάνισαν αποκατάσταση της έκφρασης της πρωτεΐνης WAS σε πολλαπλές σειρές λευκοκυττάρων, που τελικά οδήγησε σε αυξημένο αριθμό αιμοπεταλίων, ενισχυμένες λειτουργίες του ανοσοποιητικού και βελτίωση της κλινικής εκδήλωσης της νόσου (Aiuti et al., 2013; Hacein-Bey-Abina et al., 2013). Ομοίως, μια δοκιμή Φάσης I/II με SIN-λεντιικό φορέα για τη θεραπεία της ADA-SCID που έγιναν στο Ηνωμένο Βασίλειο και στις ΗΠΑ (NCT01380990) ήταν επιτυχής. Τέσσερις ασθενείς έχουν υποβληθεί μέχρι στιγμής σε θεραπεία με φορέα που περιέχει τον προαγωγέα EF1α που οδηγεί την έκφραση του cDNA ADA (Gaspar et al., 2013; Zhang et al., 2013).

Η γενετική τροποποίηση των HSCs προσφέρει επίσης την ευκαιρία για τη θεραπεία και άλλων μονογονιδιακών ασθενειών πέρα από τις PID, οι οποίες είναι επίσης θεραπεύσιμες με μεταμόσχευση αλλογενών HSCs σε συμβατούς για HLA αντιγόνα. Αυτό μπορεί να γίνει και σε εκ γενετής σφάλματα του μεταβολισμού, όπως διαταραχές βλεννοπολυσακχαριτών ή διαταραχές λυσοσωμικής αποθήκευσης. Ομοίως, οι Λευκοδυστροφίες, μια ομάδα κληρονομικών ασθενειών που χαρακτηρίζονται από ελαττώματα στο σχηματισμό ή/και διατήρηση του ελύτρου της μυελίνης στον εγκέφαλο, τον νωτιαίο μυελό και συχνά και στα περιφερικά νεύρα, μπορούν να αντιμετωπιστούν με αλλογενή μεταμόσχευση HSCs ανάλογα με το στάδιο της νόσου, τον ασθενή και την ηλικία. Οι μηχανισμοί διόρθωσης της νόσου με τη μεσολάβηση HSCs βασίζονται στην αντικατάσταση της μικρογλοίας του ΚΝΣ από τους απογόνους

των μεταμοσχευμένων αιμοποιητικών κυττάρων ή/και από έναν μηχανισμό που ονομάζεται «διασταυρούμενη διόρθωση», στον οποίο τα κύτταρα που προέρχονται από μονοκύτταρα εκκρίνουν ένα θεραπευτικό ένζυμο το οποίο στη συνέχεια απορροφάται από τα κύτταρα με την έλλειψη του ενζύμου στο ΚΝΣ (κυρίως σε ολιγοδενδροκύτταρα και νευρώνες), αποτρέποντας έτσι τη νευρογενετική εκδήλωση ή την εξέλιξη αυτών των διαταραχών (Byrne et al., 2012). Έτσι, τα γονιδιακά τροποποιημένα αυτόλογα HSCs μπορεί να προσφέρουν μια μοναδική ευκαιρία για τη θεραπεία μεταβολικών διαταραχών. Αυτό αποδείχθηκε στην πρώτη κλινική δοκιμή χρησιμοποιώντας έναν φορέα SIN-λεντιό για τη διόρθωση της X-ALD (Cartier et al, 2009). Η προοδευτική και μη αναστρέψιμη φύση αυτής της νόσου απαιτεί παρέμβαση όσο το δυνατόν νωρίτερα για να επιτραπεί η διακοπή της απομυελίνωσης. Αυτό επιτεύχθηκε σε δύο ασθενείς που έλαβαν θεραπεία 14-16 μήνες μετά τη μεταμόσχευση γονιδιακά τροποποιημένων αυτόλογων HSCs, στα οποία η μεταγωγή έγινε με λεντιϊκό φορέα που εκφράζει το λειτουργικό γονίδιο ABCD1. Έκτοτε η διαδικασία απομυελίνωσης δεν έχει προχωρήσει (συνολική παρακολούθηση 4 χρόνια). Πιθανότατα, αυτό το θεραπευτικό αποτέλεσμα ενισχύθηκε με την προετοιμασία των ασθενών πριν από τη μεταμόσχευση των γονιδιακά τροποποιημένων κυττάρων, καθώς οι προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η προετοιμασία μπορεί όχι μόνο να διευκολύνει την αποτελεσματική μεταμόσχευση γονιδιακών κυττάρων στον μυελό των οστών, αλλά μπορεί επίσης να έχει ευεργετική επίδραση στην ενδογενή αναστροφή της μικρογλοίας (Capotondo et al, 2012). Ακολουθώντας την ίδια ιδέα, ξεκίνησε το 2010 στο Μιλάνο μια κλινική μελέτη γονιδιακής θεραπείας για τη MLD, μια απομυελινωτική διαταραχή λυσοσωμικής αποθήκευσης που προκύπτει από ανεπάρκεια αρυλοσουλφατάσης A (ARSA). Η υπερέκφραση ARSA καταδείχθηκε σε όλες τις αιμοποιητικές γραμμές και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με αποτέλεσμα ουσιαστικό θεραπευτικό αποτέλεσμα χωρίς εξέλιξη της νόσου σε κανέναν από τους οκτώ βρεφικούς ασθενείς που έλαβαν θεραπεία (Biffi et al., 2013; Montini et al., 2013).

## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> Αποτελεσματικότητα Γονιδιακής Θεραπείας

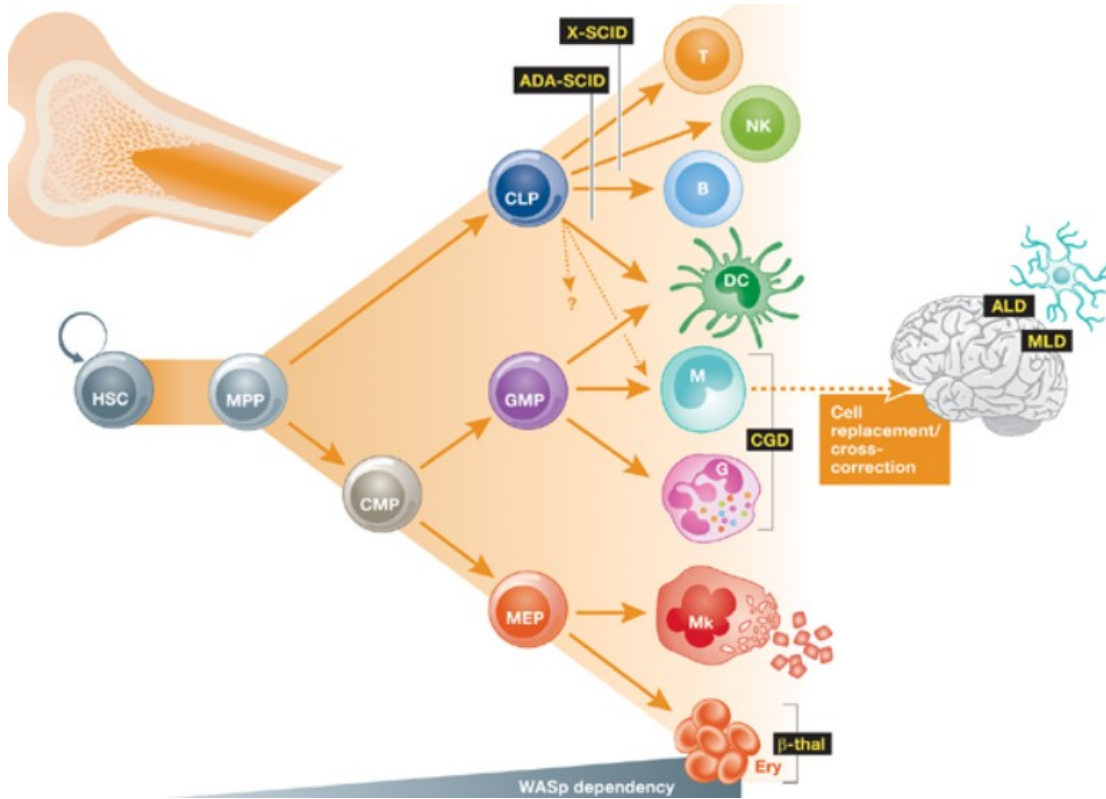
### 3.1 Θεραπεία των Μονογονιδιακών Ασθενειών

Η γονιδιακή θεραπεία αρχικά επικεντρώθηκε σε ορφανές ασθένειες με επιζήμια μονογενετικά ελαττώματα, όπως οι πρωτογενείς ανοσοανεπάρκειες (PID), για τις οποίες αυτή η θεραπεία θεωρήθηκε η τελευταία, αν όχι η μοναδική θεραπευτική επιλογή. Ο αυξανόμενος αριθμός επιτυχημένων δοκιμών οδήγησε την ανάπτυξη προσεγγίσεων γονιδιακής θεραπείας ώστε να συμπεριλάβουν πιο ευρεία εφαρμογή, για παράδειγμα, στον καρκίνο και τις χρόνιες ή προοδευτικές ασθένειες όπως η καρδιακή ανεπάρκεια, νευροεκφυλιστικές ή μεταβολικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της νόσου Πάρκινσον και του διαβήτη (Elsner et al., 2012; Jessup et al., 2011; LeWitt et al., 2011). Η μεταμόσχευση HSCs από αλλογενείς δότες συμβατούς με HLA είναι θεραπεία επιλογής για ασθενείς με PID, με αποτέλεσμα τη μακροχρόνια επιβίωση μεγαλύτερη από το 90% των ασθενών και την αποτελεσματική ανοσολογική ανασύσταση. Ωστόσο, για όλους τους υπόλοιπους, οι μεταμοσχεύσεις από μη συμβατούς δότες εξακολουθούν να συνδέονται με υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα λόγω αυτοάνοσων και φλεγμονωδών εκδηλώσεων, επίμονων λοιμώξεων, σοβαρών αντιδράσεων από την ασθένεια του μοσχεύματος εναντίον του ξενιστή (GvHD) και απόρριψης του μοσχεύματος (Honig et al., 2006; Mazzolari et al., 2007; Neven et al., 2009; Railey et al., 2009; Titman et al., 2008).

Ένα γενετικό ελάττωμα μπορεί να επηρεάσει το αιμοποιητικό σύστημα σε διάφορα στάδια της αιμοποίησης που μπορεί να οδηγήσει σε PID (Εικόνα 3.1). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η διακοπή στα πρώιμα στάδια της καθορισμένης γενεαλογίας οδηγεί σε πλήρη έλλειψη των επόμενων κυτταρικών υποσυνόλων, όπως συμβαίνει στη σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID). Αυτή η διαταραχή μπορεί να υποδιαιρεθεί ανάλογα με την υποκείμενη γενετική εκτροπή. Επί του παρόντος, οι προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας έχουν επικεντρωθεί κυρίως σε δύο από τους πιο κοινούς τύπους SCID, το αυτοσωμικό υπολειπόμενο κληρονομικό ενζυμικό ελάττωμα της απανταχού εκφραζόμενης απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA-SCID), που παίζει ρόλο στην οδό διάσωσης των πουρινών και τη δυσλειτουργία της ιντερλευκίνης 2 (IL-2) σηματοδότησης, λόγω μεταλλάξεων στη X-χρωμοσωμική κωδικοποιημένη κοινή αλυσίδα γάμμα του υποδοχέα IL-2 (SCID-X1) (Aiuti et al., 2009; Candotti et al., 2012; Cavazzana-Calvo et al., 2012; Fischer et al., 2013; Gaspar, 2012; Hacein-Bey-Abina et



al., 2002). Φαινοτυπικά, οι ασθενείς που πάσχουν από PID είτε στερούνται το λεμφοκυτταρικό τμήμα συμπεριλαμβανομένων των NK κυττάρων είτε τα λεμφοκύτταρά τους έχουν μειωμένη λειτουργία (Εικόνα 3.1) (Kaufmann et al., 2013).



Εικόνα 3.1 Αιμοποίηση και κύριες ασθένειες στο επίκεντρο της *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας σε HSCs

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Doulatov et al., 2012 όπως αναφέρεται στους Kaufmann et al., 2013. Το αιμοποιητικό βλαστοκύτταρο (HSC) έχει την ικανότητα να δημιουργεί όλα τα τελικώς διαφοροποιημένα αιμοποιητικά τελεστικά κύτταρα περνώντας από διάφορα ενδιάμεσα πρόδρομα στάδια. Η μοίρα της γενεαλογίας καθορίζεται κυρίως από τα προφίλ κυτοκινών που οδηγούν την ανάπτυξη από πολυδύναμους προγόνους (MPP) σε είτε ολιγοδύναμους δεσμευμένους λεμφοειδείς είτε μυελοειδείς προγόνους (CLP και CMP, αντίστοιχα). Το CLP παρέχει τελικά ώριμα B-λεμφοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα, φυσικά κυτταροκτόνα κύτταρα (NK) και δενδριτικά κύτταρα (DC). Τα DC μπορούν επίσης να προέλθουν από τη μυελοειδή γενεαλογία. Η CMP δημιουργεί προγονικά μεγακαρυοκύτταρα-ερυθροκύτταρα (MEP) και κοκκιοκύτταρα-μονοκύτταρα-προγονικά (GMP) που τελικά καταλήγουν είτε σε ερυθροκύτταρα (Ery) και μεγακαρυοκύτταρα που παράγουν αιμοπετάλια (Mk) ή μονοκύτταρα (M) και τις διαφορετικές οντότητες των κοκκιοκυττάρων (G), αντίστοιχα. Οι πρωτογενείς ανοσοανεπάρκειες (PID) που φαίνονται με μαύρο φόντο μπορούν να εκδηλωθούν σε πολλά από αυτά τα στάδια όπως υποδεικνύεται, με αποτέλεσμα ελαττώματα που επηρεάζουν μόνο ορισμένους κυτταρικούς τύπους.



Αυτοί οι ασθενείς μεταμοσχεύονται αμέσως μετά τη γέννηση, εάν υπάρχει διαθέσιμος αντίστοιχος συγγενής δότης. Διαφορετικά, το προσδόκιμο ζωής τους φτάνει μετά βίας πέρα από τη βρεφική ηλικία (Gathmann et al., 2009).

### 3.2 Προκλήσεις, Στρατηγικές και Προοπτικές στη Θεραπεία των Μονογονιδιακών Ασθενειών

Οι μονογονιδιακές ασθένειες για τις οποίες έχουν εντοπιστεί τα γονίδια που τις προκαλούν είναι ιδανικοί στόχοι για τη γονιδιακή θεραπεία (Zhang & Wu, 2024).

Οι γονιδιακές θεραπείες περιλαμβάνουν διαφορετικές στρατηγικές, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής ενίσχυσης, της γονιδιακής παρεμβολής και της γονιδιακής επεξεργασίας. Η γονιδιακή ενίσχυση αναφέρεται στην εισαγωγή ενός εξωγενούς γονιδίου στα κύτταρα για την επίτευξη μιας συγκεκριμένης λειτουργίας. Μεταξύ των διαφόρων μορφών της γονιδιακής ενίσχυσης είναι η γονιδιακή αντικατάσταση, που χρησιμοποιείται συνήθως για κληρονομικά νοσήματα τα οποία οφείλονται σε υπολειπόμενα αλληλόμορφα γονίδια και στοχεύει στην αντιστάθμιση της απώλειας της λειτουργικής πρωτεΐνης λόγω μεταλλάξεων των γονιδίων. Από την άλλη πλευρά, η γονιδιακή παρεμβολή ρυθμίζει τη μεταγραφή ή την έκφραση χρησιμοποιώντας ριβονουκλεϊκό οξύ (RNA) ή μικρά μόρια. Αυτή η στρατηγική μπορεί να λάβει διάφορες μορφές, όπως αναστολή της έκφρασης της λειτουργίας της μετάλλαξης, μεσολάβηση στην αποικοδόμηση του μεταλλαγμένου RNA (mRNA) και διόρθωση του συρραφής του πρώιμου mRNA. Μια άλλη στρατηγική, η γονιδιακή επεξεργασία, επιδιώκει να επιδιορθώσει τα μεταλλαγμένα γονίδια τροποποιώντας το γονιδίωμα, χρησιμοποιώντας εργαλεία επεξεργασίας που θεωρητικά είναι εφαρμόσιμα σε οποιαδήποτε μετάλλαξη (Anguela & High, 2019).

Η γονιδιακή θεραπεία έχει δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στη θεραπεία μονογονιδιακών ασθενειών όπως στη νωτιαία μυϊκή ατροφία (SMA), τη συγγενή αμαύρωση Leber (LCA) και την αιμορροφιλία, ανοίγοντας το δρόμο για την ευρύτερη εφαρμογή της σε άλλες γενετικές διαταραχές όπως η μυϊκή δυστροφία του Duchenne (DMD), τη νόσο του Huntington (HD), την αμυλοείδωση τρανσθυρετίνης (ATTR), την οικογενή υπερχοληστερολαιμία (FH) και την οικογενή αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (CALS). Επιπλέον, η γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιείται συχνά σε

συνδυασμό με μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSCT) για τη θεραπεία ασθενειών όπως σε διαταραχές της αιμοσφαιρίνης, μεταβολικές διαταραχές και διαταραχές αποθήκευσης όπως η β-θαλασσαιμία και οι λευκοδυστροφίες (Ravi et al., 2021; Sun & Roy, 2021). Παρά τις πολλά υποσχόμενες δυνατότητές της, η κλινική χρήση της γονιδιακής θεραπείας έχει περιοριστεί από τεχνικές προκλήσεις και ηθικούς λόγους (Zhang & Wu, 2024).

Τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν αναπτυχθεί αρκετές γενετικές τεχνικές, όπως η αντικατάσταση γονιδίων, η θεραπεία με συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια (ASOs), το μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (iRNA) και το CRISPR/σχετιζόμενο με CRISPR (Cas) πρωτεϊνικό σύστημα. Αν και αυτά τα εργαλεία έχουν σημειώσει σημαντικές προόδους, εξακολουθούν να υπάρχουν ανησυχίες σχετικά με την παράδοση και την ασφάλειά τους. Παρ' όλο που έχουν γίνει προσπάθειες για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων, απαιτούνται περαιτέρω βελτιώσεις (Zhang & Wu, 2024).

Η γονιδιακή αντικατάσταση είναι μια κλασική στρατηγική γονιδιακής θεραπείας που περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός αντιγράφου εξωγενούς συμπληρωματικού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (cDNA) σε κύτταρα στόχους, μέσω ενός φορέα μεταφοράς γονιδίου για να αντικαταστήσει το μεταλλαγμένο γονίδιο. Αυτή η θεραπεία χρησιμοποιείται ευρέως για μονογονιδιακές ασθένειες που προκύπτουν από μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (Petrich et al., 2020).

Τα συμπληρωματικά ολιγονουκλεοτίδια (ASOs) είναι μια σειρά από μονόκλωνα συνθετικά πολυμερή νουκλεϊκών οξέων που αποτελούνται από 15-25 νουκλεοτίδια, τμήματα DNA ή RNA που συνδέονται με γονίδια και προκαλούν την αποσιώπησή τους. Η σύνδεση του ASOs με το mRNA οδηγεί μέσω μιας σειράς διαδικασιών στην αναστολή της έκφρασής του (Roberts et al., 2020).

Το μικρό παρεμβαλλόμενο RNA (siRNA) είναι γενικά ένα δίκλωνο RNA 21 νουκλεοτιδίων που ακολουθείται από 2 νουκλεοτίδια στο 3' άκρο τα οποία προεξέχουν στον κάθε κλώνο. Το siRNA συναρμολογείται στο RNA σύμπλοκο επαγωγής της αποσιώπησης (RISC) και στη συνέχεια διαχωρίζεται στον οδηγό και στον κωδικό κλώνο. Η ενδονουκλεάση argonaute-2 (AGO2) ενεργοποιείται στο RISC λόγω της συμπληρωματικότητας μεταξύ του οδηγού κλώνου και του mRNA στόχου. Ως αποτέλεσμα, το mRNA υφίσταται διάσπαση και αποικοδόμηση (Roberts et al., 2020).

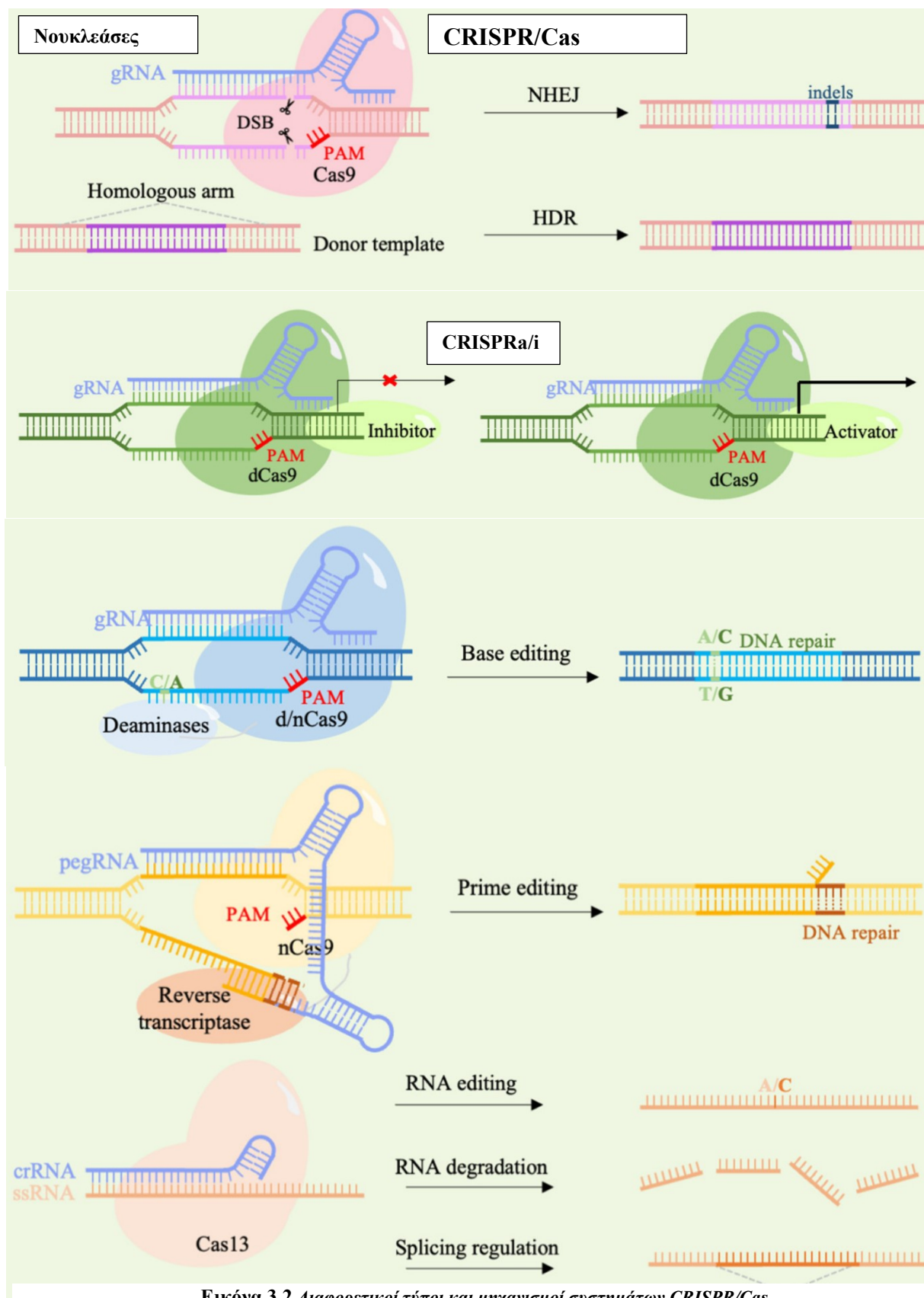
Τα RNA κοντής φουρκέτας (shRNAs) είναι συνθετικά μόρια RNA που μπορούν να διασπαστούν σε siRNA. Είναι πιο ανθεκτικά στη αποσιώπηση γονιδίων από τα siRNA, καθιστώντας τα καλύτερο εργαλείο για νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Chen et al., 2020).

Το MicroRNA (miRNA) είναι μια φυσική μορφή iRNA στα κύτταρα που παίζει ρόλο σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές δραστηριότητες. Το Pri-miRNA επεξεργάζεται στον πυρήνα από το Dicer για να σχηματίσει πρόδρομο miRNA, το οποίο στη συνέχεια εξάγεται στο κυτταρόπλασμα και διασπάται από το ένζυμο Drosha, δημιουργώντας ελεύθερα διπλά miRNA με μηχανισμό παρόμοιο με τα siRNA. Τα miRNA μπορούν να μεσολαβήσουν στην αποικοδόμηση του mRNA και να ρυθμίσουν τη μεταγραφή (Roberts et al., 2020).

Οι θεραπείες επεξεργασίας γονιδιώματος έχουν γίνει πραγματικότητα με την ανακάλυψη και προσαρμογή των νουκλεασών των δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs), των νουκλεασών που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής (TALEN) και των συστημάτων CRISPR/Cas. Αυτά τα συστήματα βασίζονται στους φυσικούς μηχανισμούς των ευκαρυωτικών κυττάρων οι οποίοι μετά από βλάβη του DNA, όπως δίκλωνα θραύσματα (DSBs), τα κύτταρα μπορούν να αναγνωρίσουν τη βλάβη και να ξεκινήσουν μια διαδικασία επισκευής μέσω μη ομόλογης τελικής ένωσης (NHEJ) ή με κατευθυνόμενη ομόλογη επιδιόρθωση (HDR). Στην περίπτωση NHEJ απλώς επανασυνδέονται τα δύο άκρα του DNA, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε εισαγωγή ή/και διαγραφή νουκλεοτιδίων (indels) στη θέση θραύσης, ενώ η HDR απαιτεί ένα πρότυπο δότη με πλευρικούς ομόλογους βραχίονες στη θέση στόχο και επιδιορθώνει τα DSBs μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Wang et al., 2020). Οι πρωτεΐνες ZFN, TALEN και Cas δημιουργούν ένα DSB στο γονιδίωμα που ενεργοποιεί την HDR, το οποίο μπορεί να επιδιορθώσει το σπάσιμο με κάποιο πρότυπο δότη για να επιτευχθεί η επεξεργασία του γονιδιώματος. Η περίπτωση της επεξεργασίας του γονιδιώματος με τη μεσολάβηση CRISPR/Cas9 έχει γίνει ιδιαίτερα δημοφιλής λόγω της ικανότητάς της, να αναγνωρίζει τον συγκεκριμένο DNA-στόχο μέσω μιας αλληλουχίας οδηγού RNA (gRNA), ενώ οι νουκλεάσες ZFN και TALEN απαιτούν μια πρωτεΐνη για τη στόχευση (Li et al., 2019; Wang et al., 2020).

Αν και η επεξεργασία που βασίζεται σε HDR μπορεί να επιδιορθώσει μεταλλάξεις, είναι αναποτελεσματική σε μετα-μιτωτικά κύτταρα όπως οι νευρώνες, επειδή

προϋποθέτει να πραγματοποιηθεί ο ομόλογος ανασυνδυασμός κατά την αντιγραφή του DNA. Επιπλέον, οι υψηλοί κίνδυνοι εκτός στόχου και τα ανεπιθύμητα indels σε άλλους τόπους παραμένουν πιθανά προβλήματα. Επομένως, η επεξεργασία γονιδίων με τη μεσολάβηση νουκλεάσης είναι πιο κατάλληλη για γονιδιακή σίγαση παρά για διόρθωση μεταλλάξεων. Για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί επεξεργαστές βάσεων DNA και RNA που βασίζονται σε κλασικά συστήματα CRISPR. Οι επεξεργαστές βάσης αποτελούνται από ένζυμα που τροποποιούν το DNA, συμπεριλαμβανομένης της κατασκευασμένης απαμινάσης κυτοσίνης ή αδενίνης απαμινάσης, και ενός απενεργοποιημένου συστήματος από νουκλεάση Cas9 (dCas9) ή μιας μεταλλαγμένης νικάσης Cas9 (nCas9). Μόλις το gRNA αναγνωρίσει μια συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα, το ζεύγος βάσεων RNA-DNA εκθέτει τις βάσεις-στόχους, επιτρέποντας τη μετατροπή του DNA από τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA. Η πρωτεΐνη Cas τελικά κόβει τον άλλο κλώνο για να επιδιορθώσει το DNA χωρίς να δημιουργήσει DSB (Wang et al., 2020). Οι επεξεργαστές βάσης της κυτοσίνης ή αδενίνης (CBE ή ABE) αντιμετωπίζουν τους περιορισμούς του HDR, αλλά παρουσιάζουν προβλήματα με το ζήτημα των πολλαπλών αλλαγών βάσης μέσα στο πλαίσιο επεξεργασίας (Rees & Liu, 2018). Ο άριστος επεξεργαστής (PE) είναι μια πρόσφατη εξέλιξη του συστήματος CRISPR/Cas που επεκτείνει την ακρίβεια της επεξεργασίας γονιδίων. Σε αυτό το σύστημα, ένας άριστος RNA οδηγός επεξεργασίας (pegRNA) αναγνωρίζει τη συγκεκριμένη θέση για την nCas9 (νικάση Cas9) και στη συνέχεια υβριδοποιείται με το ελεύθερο άκρο DNA για να ξεκινήσει η αντίστροφη μεταγραφή. Τα περιττά θραύσματα διασπώνται κατά τη διάρκεια της επακόλουθης διαδικασίας επιδιόρθωσης του DNA (Anzalone et al., 2019). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο PE είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο επεξεργασίας γονιδιώματος (Chen et al., 2021). Επιπλέον, το απενεργοποιημένο από νουκλεάση Cas9 μπορεί να συγχωνευθεί με άλλα δραστικά στοιχεία για την επίτευξη διαφόρων στόχων, όπως η παρεμβολή, ενεργοποίηση CRISPR (CRISPRi/a) και ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου στόχου μέσω μεταγραφικής αναστολής ή ενεργοποίησης (Wang et al., 2020). Εκτός από την επεξεργασία του DNA, έχουν εντοπιστεί και άλλες πρωτεΐνες Cas που επεξεργάζονται τα RNA. Η Cas13 είναι μια πρωτεΐνη Cas που στοχεύει το RNA αντί για το DNA, προκαλώντας διάσπαση RNA, την ωρίμανση του ή την επεξεργασία βάσεων. Πολλές παραλλαγές, όπως οι Cas13d και Cas13X, έχουν αναπτυχθεί (Bot et al., 2022) (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Διαφορετικοί τύποι και μηχανισμοί συστημάτων CRISPR/Cas

Σημείωση. Προσαρμοσμένη εικόνα από Zhang & Wu, 2024. Διαφορετικές νουκλεάσες που χρησιμοποιούνται κατά την γονιδιακή επεξεργασία με το σύστημα CRISPR/Cas.



Παρά την αξιοσημείωτη επιτυχία της *ex vivo* και *in vivo* θεραπείας αρκετών μονογονιδιακών διαταραχών (Dunbar et al., 2018), εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικά εμπόδια που πρέπει να ξεπεραστούν για τη βελτίωση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων σε αυτές τις ασθένειες (π.χ. αιμοσφαιρινοπάθειες, ανοσοανεπάρκειες και συγγενείς αναιμίες), καθώς και σε πολυπαραγοντικά νοσήματα του αίματος (π.χ. καρκίνος, αυτοάνοσα, και μολυσματικές διαταραχές). Εκτός από θέματα ειδικά για φορείς, όπως η ανοσογονικότητα και ο τροπισμός (Colella et al., 2018; Masat et al., 2013), η κλασική γονιδιακή αντικατάσταση έχει έναν σημαντικό περιορισμό, δηλαδή είναι δύσκολο να αντικατασταθεί πιστά η επαναδημιουργία χαρακτηριστικών ενδογενών προαγωγέων και η γονιδιακή ειδική ρύθμιση, εντός του πλαισίου ενός ιικού φορέα. Η ιστική, αναπτυξιακή και διεγερτική, ειδική γονιδιακή έκφραση, απαιτεί τη σύνθετη αλληλεπίδραση διαφορετικών γονιδιωματικών στοιχείων (προαγωγείς, ενισχυτές και αποσιωπητές) που μπορούν να εντοπιστούν σε απομακρυσμένες περιοχές του γονιδιώματος και να εκτείνονται σε αρκετές χιλιάδες αζωτούχων βάσεων (Schoenfelder & Fraser, 2019).

### **3.3 Σύγκριση γ-Ρετροϊκών, AAV και Λεντι-ϊκών Φορέων στη Θεραπεία των Μονογονιδιακών Ασθενειών**

Οι Αδενοσχετιζόμενοι ιικοί φορείς (AAV) είναι μικροί ιοί (περίπου 4,7 kb), περιορίζοντας την επιλογή των ρυθμιστικών στοιχείων που πρέπει να συμπεριληφθούν στην κασέτα έκφρασης, ειδικά κατά την παροχή μεγάλων διαγονιδίων (Li & Samulski, 2020). Επιπλέον, παραμένουν κυρίως ως επισώματα σε μη διαιρούμενα κύτταρα και χάνονται προοδευτικά μέσω της κυτταρικής διαίρεσης (Bortolussi et al., 2014; Ehrhardt et al., 2003), που αυτό αποτελεί ένα σημαντικό εμπόδιο για τη θεραπεία των βρεφικών διαταραχών και των ιστών που υφίστανται ταχύ πολλαπλασιασμό (π.χ. αιμοποιητικά και επιθηλιακά κύτταρα). Από την άλλη πλευρά, οι λεντιοί (LV) έχουν μεγαλύτερη χωρητικότητα φορτίου (περίπου 8 kb), ενσωματώνονται σταθερά στο γονιδίωμα και παραμένουν και μετά την κυτταρική αντιγραφή (Naldini et al., 1996). Ωστόσο, φέρουν τον εγγενή κίνδυνο μεταλλαξογένεσης, εισαγωγής και επανενεργοποίησης ογκογονιδίων (κυρίως όταν υπάρχουν ισχυροί προαγωγείς-ενισχυτές) (Cavazzana et al., 2019; Bushman, 2020). Επιπλέον, η ημι-τυχαία ενσωμάτωσή τους (Schroder et al., 2002) έχει ως αποτέλεσμα το μωσαϊκό της μεταγωγής και την ετερογενή έκφραση διαγονιδίων λόγω των επιδράσεων της θέσης

της χρωματίνης (Chen et al., 2017; Vansant et al., 2020), καθιστώντας τα θεραπευτικά επίπεδα δυσκολότερο να επιτευχθούν (Pavani & Amendola, 2021).

Όταν συνδυάζονται AAV και νουκλεάσες, τόσο οι κασέτες έκφρασης των διαγονιδίων όσο και οι θέσεις γονιδιωματικής ολοκλήρωσης, συμβάλλουν στη διορθωτική στρατηγική, διευρύνοντας σε υψηλό βαθμό τις θεραπευτικές δυνατότητες. Κατά κύριο λόγο, η στόχευση ενός λειτουργικού αντιγράφου ενός γονιδίου στον ενδογενή τόπο του, υπό τον έλεγχο του δικού του προαγωγέα και στο σωστό πλαίσιο χρωματίνης, μπορεί να οδηγήσει σε φυσιολογική έκφραση και να ελαχιστοποιήσει τις γονιδιοτοξικές ενσωματώσεις. Εναλλακτικά, τα διαγονίδια μπορούν να στοχευθούν σε ασφαλείς θέσεις ενσωμάτωσης ή σε συγκεκριμένα γονιδιωματικά στοιχεία ενδιαφέροντος για να δημιουργηθούν κύτταρα με νέες λειτουργίες, βελτιώνοντας περαιτέρω την ασφάλεια και αυξάνοντας τις πιθανές εφαρμογές θεραπείας γονιδιακής αντικατάστασης/προσθήκης (Cox et al., 2015).

Όταν ξεκίνησε η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν γ-ρετροϊικοί φορείς για τη διόρθωση της ελαττωματικής της  $\gamma$  αλυσίδας του υποδοχέα IL-2 που λείπει (IL2RG) σε πρόδρομα κύτταρα CD34<sup>+</sup>, απουσία θεραπείας προετοιμασίας. Τα αποτελέσματα ήταν πολλά υποσχόμενα σε βρέφη με φυλοσύνδετη μικτή ανοσοανεπάρκεια (SCID-X1), δείχνοντας μακροπρόθεσμη ανάκτηση T-λεμφοκυττάρων και κλινικό όφελος, αν και η ανάκτηση των NK και B λεμφοκυττάρων ήταν λιγότερο ισχυρή. Ωστόσο, ορισμένα βρέφη ανέπτυξαν οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία των T-λεμφοκυττάρων μετά τη γονιδιακή θεραπεία, λόγω εισαγωγής μεταλλαξογένεσης με τη μεσολάβηση φορέα. Κατά συνέπεια, έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την ανάπτυξη ασφαλέστερων φορέων. Έτσι στην SCID-X1, οι πιο πρόσφατες κλινικές δοκιμές χρησιμοποιούν λεντι-ϊικούς φορείς μαζί με ένα σχήμα προετοιμασίας χαμηλής δόσης και έχουν δείξει εξαιρετική και παρατεταμένη ανάκτηση των T λεμφοκυττάρων, αλλά και των B και NK κυττάρων, τόσο σε παιδιά όσο και σε ενήλικες (Blanco et al., 2020).



## Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> Η Γονιδιακή Θεραπεία στις Κληρονομικές Αναιμίες

### 4.1 Ενεργοποίηση της Έκφρασης της Εμβρυϊκής Αιμοσφαιρίνης στη β-Θαλασσαιμία και τη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία

Η εξαρτώμενη από μετάγγιση β-θαλασσαιμία (TDT) και η δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD), είναι μονογονιδιακές ασθένειες με σοβαρές και δυνητικά απειλητικές για τη ζωή εκδηλώσεις. Οι Frangoul et al., 2021, πραγματοποίησαν ηλεκτροδιάτρηση των CD34<sup>+</sup> αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και των προγονικών κυττάρων που ελήφθησαν από υγιείς δότες, με το CRISPR-Cas9 να στοχεύει τον ειδικό των ερυθροκυττάρων ενισχυτή BCL11A, ο οποίος είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που καταστέλλει την έκφραση της γ-σφαιρίνης και τη σύνθεση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Στην έρευνα αυτή, περίπου το 80% των αλληλόμορφων γονιδίων σε αυτόν τον τόπο τροποποιήθηκαν, χωρίς ενδείξεις επεξεργασίας εκτός στόχου. Στη συνέχεια αφού υποβλήθηκαν δύο ασθενείς σε μυελοαφαίρεση, ο ένας με TDT και ο άλλος με SCD, έλαβαν αυτόλογα κύτταρα CD34<sup>+</sup>, στα οποία έγινε επεξεργασία με CRISPR-Cas9 που στόχευε τον ίδιο ενισχυτή BCL11A. Σε έλεγχο αυτών των ασθενών μετά από περισσότερο από ένα χρόνο, οι δύο ασθενείς είχαν υψηλά επίπεδα επεξεργασμένων αλληλομόρφων γονιδίων στο μυελό των οστών και στο αίμα τους παρουσίασαν αύξηση στην εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, που κατανεμήθηκε πανκυτταρικά. Επίσης, είχαν ανεξαρτησία από μετάγγιση και εξάλειψη αγγείο-αποφρακτικών επεισοδίων (στον ασθενή με SCD) (Frangoul et al., 2021).

Η συνηθισμένη αντιμετώπιση αυτών των ασθενειών ήταν μετάγγιση και αποσιδήρωση σε ασθενείς με TDT (Engert et al., 2016) και διαχείριση πόνου, μετάγγιση και υδροξυουρία σε άτομα με SCD (Platt et al., 1984). Με τις πρόσφατα εγκεκριμένες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων των luspatercept (Cappellini et al., 2020) και crizanlizumab (Ataga et al., 2017), οι ασθενείς με TDT έχουν μειωμένες απαιτήσεις μετάγγισης ενώ οι ασθενείς με SCD παρουσιάζουν μείωση της συχνότητας εμφάνισης αγγείο-αποφρακτικών επεισοδίων. Όμως, καμιά συμβατική θεραπεία δεν αντιμετωπίζει την υποκείμενη αιτία της νόσου, ούτε βελτιώνει πλήρως τις εκδηλώσεις της. Η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών μπορεί να θεραπεύσει τόσο την TDT όσο και την SCD, αλλά λιγότερο από το 20% των επιλέξιμων ασθενών, έχουν

συμβατό δότη των αντιγόνων των λευκοκυττάρων (Eapen et al., 2019; Gluckman et al., 2017).

Το Betibeglogene autotemcel (Zynteglo), ένα προϊόν προσθήκης γονιδίων που βασίζεται σε λεντιούς, είναι εγκεκριμένο στην Ευρωπαϊκή Ένωση για τη θεραπεία ασθενών με TDT που έχουν μεταλλάξεις μη  $\beta^0$  και δεν έχουν αντίστοιχο αδελφό δότη (Mirza et al., 2024) και μελετάται σε ασθενείς με  $\beta^0/\beta^0$  γονότυπο TDT και σε εκείνους με SCD (Thompson et al., 2018; Ribeil et al., 2017). Επιπλέον, ένας ειδικός καταστολέας του BCL11A των ερυθροκυττάρων που χορηγείται μέσω τροποποιημένου λεντιού που κωδικοποιεί ένα μόριο RNA κοντής φουρκέτας, το οποίο έχει ενσωματωθεί σε ένα microRNA, έχει αποδειχθεί ότι επανενεργοποιεί το γονίδιο της γ-σφαιρίνης και βρίσκεται σε πρώιμη κλινική ανάπτυξη (Brendel et al., 2016; Brendel et al., 2020; Esrick et al., 2021).

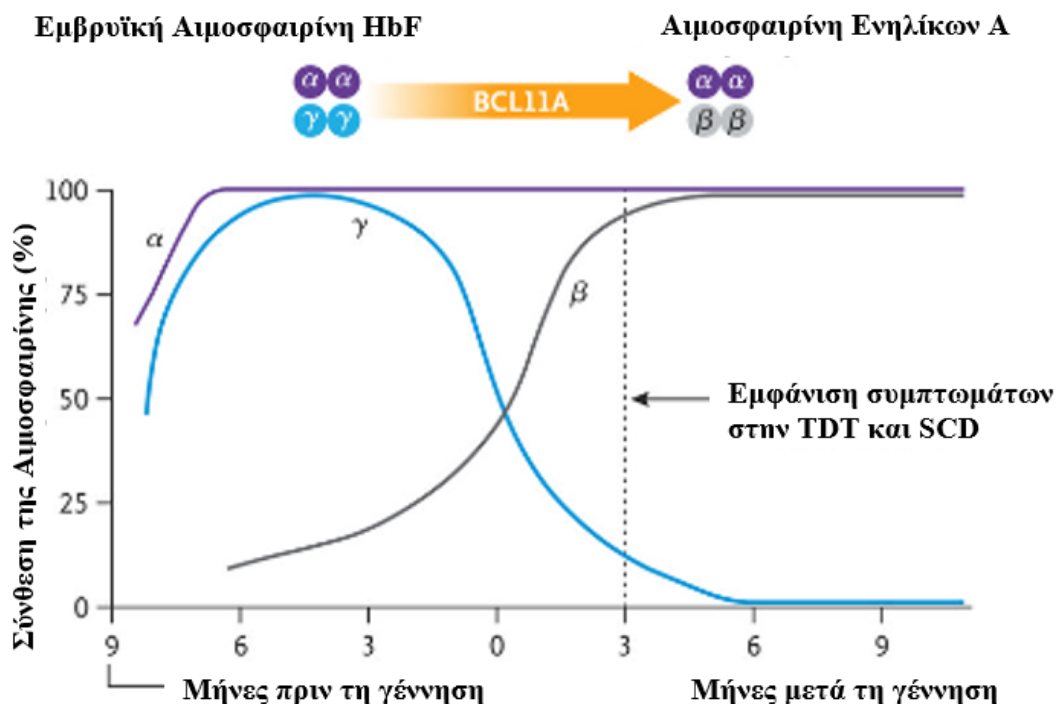
Τα αυξημένα επίπεδα εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (που αποτελούνται από δύο αλυσίδες άλφα και δύο γάμμα) σχετίζονται με βελτίωση από τη νοσηρότητα και θνησιμότητα των ασθενών με TDT και SCD (Musallam et al., 2012). Η παραγωγή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης ρυθμίζεται αναπτυξιακά έτσι ώστε το επίπεδο της γ-σφαιρίνης που παράγεται στη μήτρα να μειώνεται μετά τη γέννηση, καθώς η παραγωγή της β-σφαιρίνης και της αιμοσφαιρίνης των ενηλίκων (που αποτελείται από δύο άλφα και δύο βήτα αλυσίδες) αυξάνεται (Εικόνα 4.1). Τα νεογνά και τα βρέφη με TDT ή SCD είναι τυπικά ασυμπτωματικά, για τη χρονική περίοδο που τα επίπεδα της εμβρυϊκής τους αιμοσφαιρίνης, παραμένουν υψηλά και γίνονται συμπτωματικά κατά το πρώτο έτος της ζωής, όταν η σύνθεση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης μειώνεται (Sankaran & Orkin, 2013; Canver & Orkin, 2016). Οι ασθενείς με TDT ή SCD που συγκληρονομούν την κληρονομική ανοχή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, της οποίας η εμβρυϊκή έκφραση συνεχίζεται στην ενήλικη ζωή, έχουν μικρή ή καθόλου εμφάνιση της ασθένειας (Steinberg, 2020).

Μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν εντοπίσει μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (SNPs) που σχετίζονται με αυξημένη έκφραση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης σε ενήλικες (Bauer et al., 2013). Ορισμένοι από αυτούς τους SNPs εντοπίζονται στη θέση BCL11A στο χρωμόσωμα 2 και σχετίζονται με χαμηλότερη βαρύτητα, τόσο στην περίπτωση της TDT όσο και της SCD (Uda et al., 2008). Ο BCL11A, είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που περιέχει ψευδάργυρο και

καταστέλλει την έκφραση της γ-σφαιρίνης και της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρα. Οι SNPs που σχετίζονται με την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη, βρίσκονται σε έναν ειδικό για τα ερυθροκύτταρα ενισχυτή, έχουν ρυθμιστικό ρόλο καταστολής της έκφρασης BCL11A και αυξάνουν την έκφραση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Bauer et al., 2015).

### Μετάβαση από την Εμβρυϊκή στην Αιμοσφαιρίνη των Ενηλίκων

**BCL11A είναι ο μεταγραφικός  
παράγοντας της καταστολής της HbF**



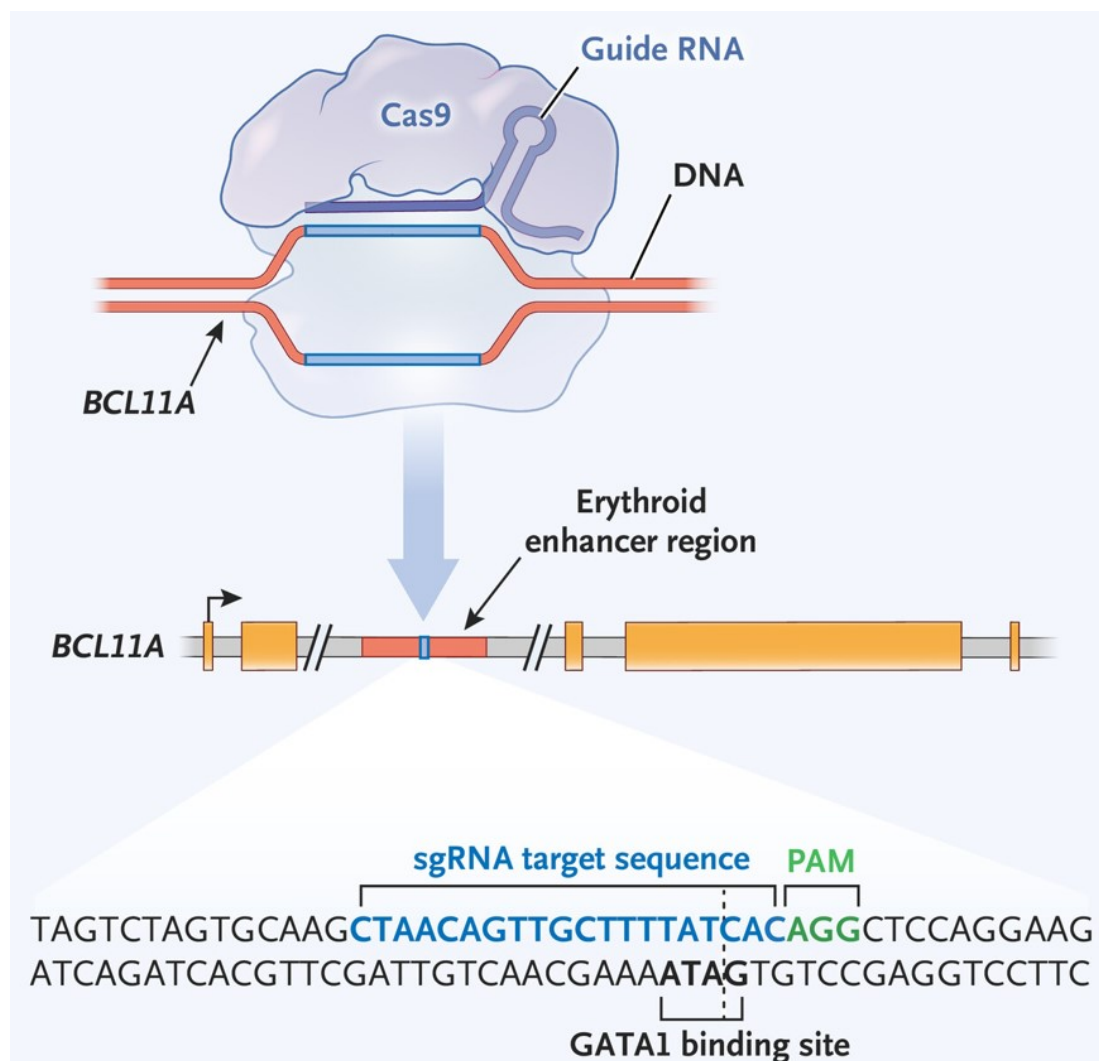
Εικόνα 4.1 Μετάβαση από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) στην αιμοσφαιρίνη ενηλίκων (HbA)

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Frangoul et al., 2021. Η πορεία από την εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη (HbF) στην αιμοσφαιρίνη ενηλίκων (HbA) λίγο μετά τη γέννηση και ο ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα BCL11A στη μεσολάβηση της καταστολής της γ-σφαιρίνης, συστατικού της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης. Σε ασθενείς που δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν λειτουργική ή επαρκή β-σφαιρίνη, η έναρξη των συμπτωμάτων συμπίπτει με τη μείωση των επιπέδων εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης περίπου 3 μήνες μετά τη γέννηση. Όπου SCD υποδηλώνει δρεπανοκυτταρική αναμία και TDT τη β-θαλασσαιμία που εξαρτάται από μετάγγιση.

Το σύστημα νουκλεάσης CRISPR-Cas9, είναι ένα βακτηριακό ανοσοποιητικό σύστημα που μπορεί να διασπάσει βακτηριοφαγικό ή πλασμιδικό DNA και επιτρέπει την προγραμματιζόμενη στόχευση εισαγωγών ή διαγραφών νουκλεοτιδίων σε μια συγκεκριμένη θέση του γονιδιωματικού DNA (Bak et al., 2018; Hendel et al., 2015).

Έτσι, για τη δημιουργία του φαινοτύπου της κληρονομικής ανοχής στην εμβρυική αιμοσφαιρίνη, μπορεί να χρησιμοποιηθούν οι τεχνικές επεξεργασίας των γονιδίων με CRISPR-Cas9 στα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και προγονικά κύτταρα (HSPCs), με στόχο την ειδική για τα ερυθροκύτταρα περιοχή του BCL11A, ώστε να μειωθεί η έκφραση BCL11A σε κύτταρα της ερυθροειδούς γενεαλογίας και να αποκατασταθεί η σύνθεση της γ-σφαιρίνης (Εικόνα 4.2). Το τελικό αποτέλεσμα είναι να ενεργοποιηθεί ξανά η παραγωγή της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης (Canver et al., 2015; Wu et al., 2019).

### Περιοχή του στόχου του συστήματος - ενδονουκλεάσης CRISPR-Cas9



Εικόνα 4.2 Θέση επεξεργασίας στόχου του sgRNA που κατευθύνει το CRISPR-Cas9 στην ειδική για τα ερυθροκύτταρα περιοχή ενίσχυσης του BCL11A

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από (Frangoul et al., 2021). Τα πέντε εξόνια BCL11A απεικονίζονται με κουτιά πορτοκαλί χρώματος. Το GATA1 υποδηλώνει τη θέση δέσμησης του μεταγραφικού παράγοντα GATA1 και το PAM το γειτονικό μοτίβο του πρωτοδιαχωριστή (NGG, μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που απαιτείται, για να ακολουθήσει αμέσως μετά η αλληλουχία του DNA στόχου από την Cas9).

Σε χρηματοδοτούμενο πρόγραμμα από την CRISPR Therapeutics and Vertex Pharmaceuticals, οι Frangul et al., 2021, διερεύνησαν τη χρήση της επεξεργασίας γονιδίων με βάση το CRISPR-Cas9 για τη θεραπεία δύο περιπτώσεων κληρονομικών αναιμιών. Η μία αφορούσε ασθενή με TDT και η άλλη σε ασθενή με SCD στους οποίους χορηγήθηκε το CTX001 (Frangoul et al., 2021).

Το CTX001 κατασκευάστηκε από κύτταρα CD34<sup>+</sup> με επεξεργασία με CRISPR-Cas9 με τη χρήση ενός μορίου RNA μονού-οδηγού (Εικόνα 4.2). Τα CD34<sup>+</sup> HSPCs συλλέχθηκαν από ασθενείς με αιμοφαίρεση μετά από κινητοποίηση είτε με filgrastim και plerixafor (στον ασθενή με TDT), είτε μόνο με plerixafor (στον ασθενή με SCD), μετά από τουλάχιστον 8 εβδομάδες μεταγγίσεων συσσωρευμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, με στόχο ένα επίπεδο δρεπανοειδούς αιμοσφαιρίνης λιγότερο από 30% (στον ασθενή με SCD). Οι ασθενείς πριν από την έγχυση του CTX001, έλαβαν έναν μονοπαράγοντα φαρμακοκινητικά προσαρμοσμένο τον μυελοκαταστολέα busulfan. Για την αξιολόγηση του ποσοστού των επεξεργασμένων αλληλομόρφων γονιδίων πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του DNA στην περιοχή του στόχου (Frangoul et al., 2021).

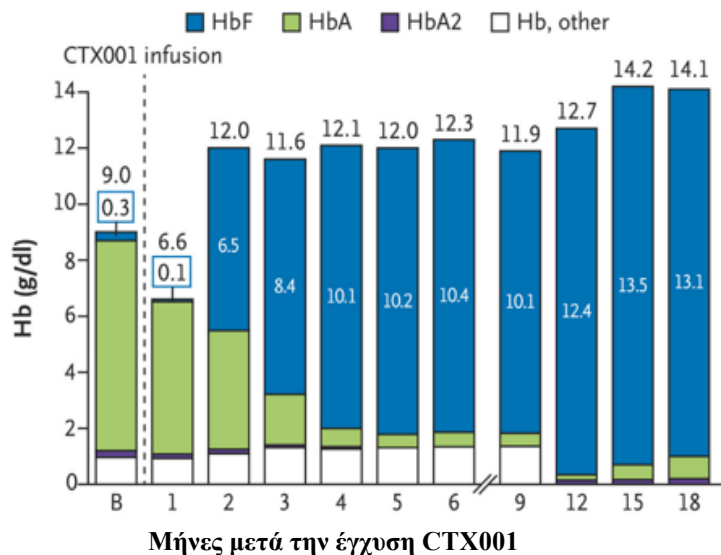
Στα αποτελέσματα και οι δύο ασθενείς είχαν πρώιμες, ουσιαστικές και παρατεταμένες αυξήσεις στα επίπεδα εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης και πάνω από 99% σε πανκυτταρικό επίπεδο κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 12 μηνών. Αυτά τα ευρήματα, τα οποία υποδεικνύουν ότι τα επεξεργασμένα από το CRISPR-Cas9 HSPCs που υποβλήθηκαν σε εμφύτευση διατηρήθηκαν σε βάθος χρόνου, συμβαδίζουν με το αναμενόμενο πλεονέκτημα επιβίωσης των ερυθροκυττάρων με υψηλό επίπεδο εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης. Η κλινική πορεία και των δύο ασθενών υποστηρίζει το συμπέρασμα, ότι το CTX001 μιμείται τον φαινότυπο της κληρονομικής ανοχής των επιπέδων της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Εικόνα 4.3 και Εικόνα 4.4) (Frangoul et al., 2021).

Ωστόσο, οι σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που αναφέρθηκαν και στους δύο ασθενείς μετά την έγχυση CTX001 ήταν, η πνευμονία, παρουσία ουδετεροπενίας, VOD-SOS (αποφρακτικό σύνδρομο των φλεβών του ήπατος), σήψη παρουσία ουδετεροπενίας, χολολιθίαση και κοιλιακό άλγος. Επίσης η μη σοβαρή ανεπιθύμητη ενέργεια της λεμφοπενίας. Ως προϊόν που είναι εμπλουτισμένο με κύτταρα CD34<sup>+</sup>, το CTX001 μπορεί να έχει συμβάλει στην καθυστέρηση της ανάκτησης των λεμφοκυττάρων, παρόμοια με ό,τι έχει παρατηρηθεί μετά από μεταμόσχευση χωρίς να υπάρχουν T-λεμφοκύτταρα στον οργανισμό (Frangoul et al., 2021).

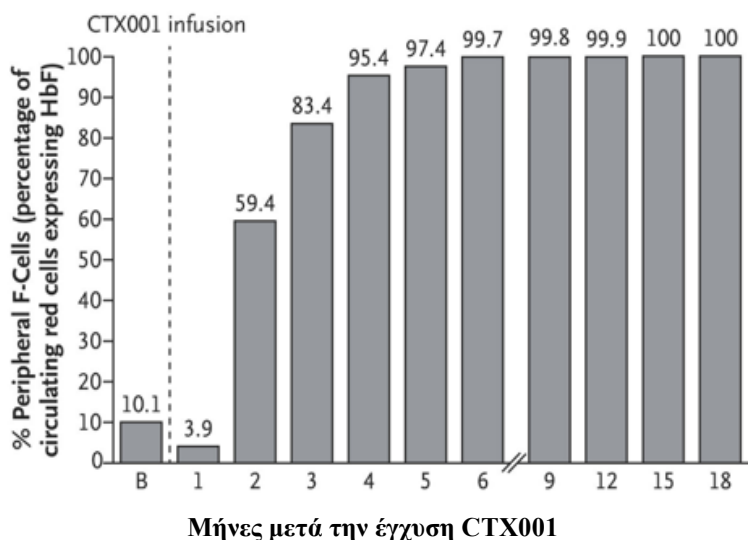


## Ασθενής με TDT

### A. Κλάσματα αιμοσφαιρίνης

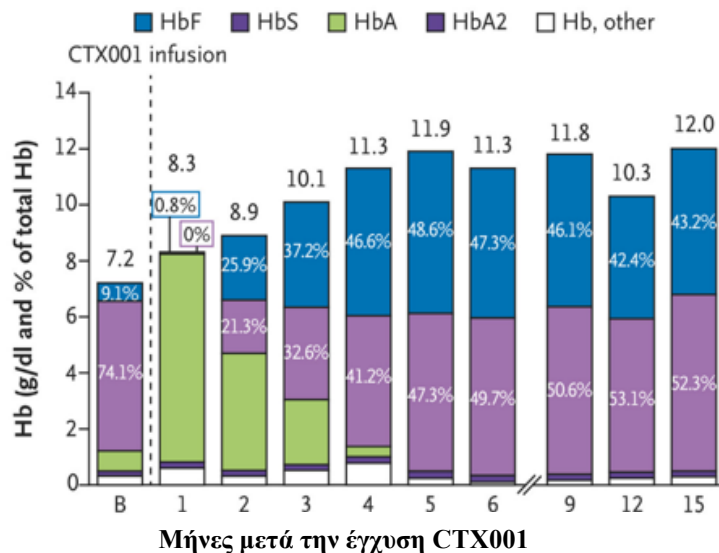


### B. Κύτταρα με F αιμοσφαιρίνη

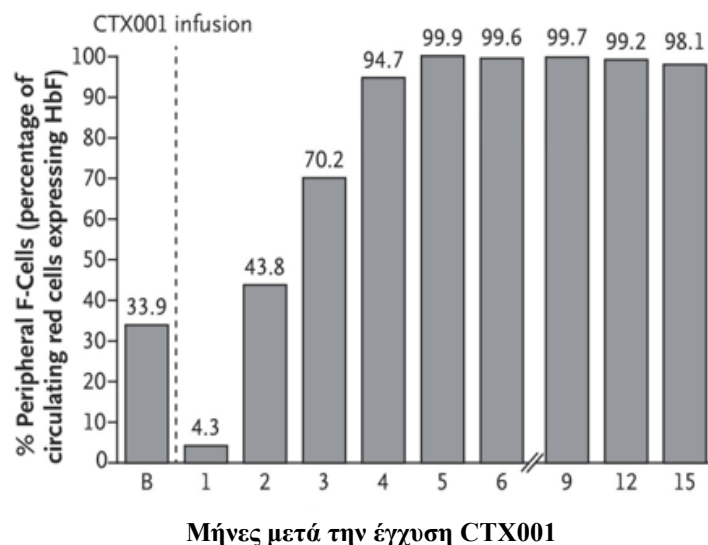


## Ασθενής με SCD

### C. Κλάσματα αιμοσφαιρίνης



### D. Κύτταρα με F αιμοσφαιρίνη



Εικόνα 4.3 Κλαματοποίηση αιμοσφαιρίνης - Ποσοστά των κυττάρων F στους ασθενείς της μελέτης

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Frangoul et al., 2021. Τα επίπεδα κλαματοποίησης της αιμοσφαιρίνης με την πάροδο του χρόνου φαίνονται στον ασθενή 1, ο οποίος υποβλήθηκε σε θεραπεία με CRISPR-Cas9 για β-θαλασσαιμία εξαρτώμενη από μετάγγιση (Πίνακας A) και στον ασθενή 2, ο οποίος υποβλήθηκε σε θεραπεία για δρεπανοκυτταρική αναιμία (Πίνακας C), συμπεριλαμβανομένων σε αναπαράσταση των προϊόντων προσθήκης αιμοσφαιρίνης και άλλων παραλλαγών. Οι αλλαγές στα ποσοστά των F-κυττάρων με την πάροδο του χρόνου εμφανίζονται στον Ασθενή 1 (Πίνακας B) και στον Ασθενή 2 (Πίνακας D).

Επεξεργασία αλληλομόρφων γονιδίων	CTX001 κύτταρα	Κύτταρα του περιφερικού αίματος	
		με πυρήνα	Μυελός των οστών
	Ποσοστό αλληλομόρφων γονιδίων	Ποσοστό αλληλομόρφων γονιδίων	Ποσοστό αλληλομόρφων γονιδίων
<b>Ασθενής με TDT</b>			
<b>Κινητοποίηση 1<sup>ος</sup> κύκλος</b>	<b>68.9</b>		
Mo 1		48.1	
Mo 2		69.7	
Mo 3		66.4	
Mo 4		62.3	
Mo 5		63.2	
Mo 6		60.0	78.1
Mo 9		62.8	
Mo 12		64.3	76.1
Mo 18		62.9	
<b>Ασθενής με SCD</b>			
<b>Κινητοποίηση 1<sup>ος</sup> κύκλος</b>	<b>82.6</b>		
<b>Κινητοποίηση 2<sup>ος</sup> κύκλος</b>	<b>78.7</b>		
Mo 1		48.8	
Mo 2		72.0	
Mo 3		68.8	
Mo 4		72.6	
Mo 5		52.6	
Mo 6		69.4	81.4
Mo 9		64.3	
Mo 12		61.9	80.4

**Εικόνα 4.4** Συχνότητα επεξεργασμένων αλληλομόρφων γονιδίων σε κύτταρα: CTX001, εμπόρηνα του περιφερικού αίματος και του μυελού των οστών

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Frangoul et al., 2021. Τα ποσοστά αφορούν τους δύο ασθενείς της μελέτης. Όπου Mo είναι οι μήνες μετά τη χορήγηση του CTX001. Κάθε κύκλος κινητοποίησης χρησιμοποιείται για την παραγωγή μιας παρτίδας επεξεργασμένων CD34<sup>+</sup> κυττάρων και στον ασθενή με SCD η έγχυση αποτελούνταν από δύο παρτίδες παραγωγής.



Τα αρχικά αποτελέσματα από την παρακολούθηση των δύο πρώτων ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με CTX001 έδειξαν την προσδοκώμενη CRISPR-Cas9 επεξεργασία του BCL11A των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων με ικανότητα αυτοανανέωσης, ισχυρή εμφύτευση, υψηλά επίπεδα έκφρασης της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης HbF και εξάλειψη αγγειοαποφρακτικών επεισοδίων ή ανάγκη για μετάγγιση. Η γενίκευση αυτών των πρώιμων αποτελεσμάτων σε σχέση με άλλους ασθενείς με TDT και SCD παραμένει να προσδιοριστεί. Ωστόσο, αυτά τα προκαταρκτικά αποτελέσματα που έχουν μέχρι τώρα αναφερθεί, υποστηρίζουν την περεταίρω συνέχιση πειραμάτων ελέγχου της γονιδιακής επεξεργασίας με το CRISPR-Cas9 για τη θεραπεία γενετικών ασθενειών (Frangoul et al., 2021a).

Σε άλλη έρευνα των Frangoul et al., 2020, σε 7 ασθενείς, οι 5 με TDT και δύο με SCD στους οποίους χορηγήθηκε θεραπεία με CTX001, έδειξε στο πρώτο τρίμηνο μετά τη θεραπεία παρόμοια αποτελέσματα. Το CTX001 είναι ένα αυτόλογο προϊόν HSPCs, το πρώτο στον άνθρωπο, τροποποιημένο με CRISPR-Cas9, έχει οδηγήσει σε αυξήσεις της HbF και της συνολικής Hb στους 7 ασθενείς που εγχύθηκε. Όλοι οι ασθενείς στους οποίους έγινε η έγχυση CTX001 παρουσίασαν αιμοποιητική εμφύτευση μετά την έγχυση, με προφίλ ασφάλειας γενικά συνεπές της μυελοκαταστολής. Οι 5 ασθενείς με TDT δεν χρειάζονταν μετάγγιση μετά από 2 μήνες, από την έγχυση του CTX001 και σε ότι αφορά τους 2 ασθενείς με σοβαρή SCD, αυτοί δεν είχαν VOCs κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης, μετά την έγχυση του CTX001. Αυτά τα πρώιμα δεδομένα καταδεικνύουν ότι το CTX001 είναι μια πιθανή λειτουργική θεραπεία για τη θεραπεία της TDT και της SCD.

## **4.2 Χρήση Πολυδύναμων Βλαστοκυττάρων στη Γονιδιακή Θεραπεία των Κληρονομικών Αναμιγών**

Η τεχνολογία επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPSC) έχει τη δυνατότητα να παρέχει μια απεριόριστη πηγή κυττάρων για την αναγεννητική ιατρική (Hanna & Jaenisch, 2010; Okita & Yamanaka, 2011). Σε αναφορά έρευνας, φαίνεται επιτυχής η εισαγωγή και έκφραση λεντιών που φέρουν το θεραπευτικό διαγονίδιο της β-σφαιρίνης στα iPSCs, σε β-θαλασσαιμικούς ασθενείς (Papapetrou et al., 2011). Σε άλλες αναφορές, η μετάλλαξη που προκαλεί δρεπανοκυτταρική αναιμία διορθώθηκε στα iPSCs χρησιμοποιώντας ομόλογο ανασυνδυασμό (Wang et al., 2012; Zou et al.,

2011). Σε αυτές τις μελέτες, οι διορθώσεις των γονιδίων αποδείχθηκαν σε γενετικό επίπεδο, σε μη διαφοροποιημένα iPSCs. Επιπλέον, παρουσιάστηκαν στοιχεία ότι η διόρθωση ήταν λειτουργική σε επίπεδο πρωτεΐνης ή mRNA, διαφοροποιώντας τα iPSCs σε ερυθροειδή κύτταρα. Αυτό αποκάλυψε ότι τα διορθωμένα διαγονίδια ή το διορθωμένο γονίδιο, εκφράστηκαν αλλά τα επίπεδα έκφρασης ήταν πολύ χαμηλά, επειδή τα τρέχοντα πρωτόκολλα διαφοροποίησης iPSCs, αποδίδουν ερυθροειδή κύτταρα που εκφράζουν κυρίως εμβρυονικές ( $\zeta 2e2$ ) και εμβρυϊκές αιμοσφαιρίνες ( $\alpha 2\gamma 2$ ) και μόνο ίχνη β-σφαιρίνης για το μεταλλαγμένο γονίδιο, τόσο στη δρεπανοκυτταρική αναιμία όσο και στη β-θαλασσαιμία (Chang et al., 2011).

Οι α-θαλασσαιμίες, οι οποίες προκαλούνται από μεταλλάξεις στο σύμπλεγμα γονιδίων της α-σφαιρίνης, είναι καλά μοντέλα για τη δοκιμή μεθόδων διόρθωσης των γονιδίων της σφαιρίνης στα iPSCs, επειδή τα γονίδια της α-σφαιρίνης εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα στα ερυθροειδή κύτταρα, που μπορεί να παραχθούν από iPSCs (Yi, et al., 2011).

Οι περισσότερες από τις γενετικές μεταλλάξεις στο σύμπλεγμα της α-σφαιρίνης που οδηγούν σε εμβρυϊκό ύδρωπα, προκαλούνται από μεγάλες διαγραφές που περιλαμβάνουν τόσο τα γονίδια  $\alpha 1$  όσο και τα γονίδια  $\alpha 2$  της σφαιρίνης. Η διόρθωση μεγάλων διαγραφών είναι δύσκολο να επιτευχθεί με ομόλογο ανασυνδυασμό και η εισαγωγή διαγονιδίου με τη μεσολάβηση του λεντιού ναι μεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, αλλά σχετίζεται με κίνδυνο δημιουργίας μεταλλαξογένεσης. Οι Papapetrou et al., 2009, έχουν δείξει ότι αυτός ο κίνδυνος μπορεί να μετριαστεί με τον εντοπισμό περιοχών των κλώνων του DNA όπου ο ιός ενσωματώνεται με ασφάλεια. Ωστόσο, η διαδικασία είναι πολύπλοκη και μπορεί να είναι δύσκολο να εφαρμοστεί κλινικά (Papapetrou et al., 2009).

Για τη διόρθωση αυτών των μεγάλων διαγραφών μπορεί να χρησιμοποιηθούν οι νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs), για την ενσωμάτωση των θεραπευτικών διαγονιδίων της σφαιρίνης στην περιοχή AAVS1, που αποτελεί ασφαλής περιοχή ενσωμάτωσης και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19. Η επιλογή της περιοχής AAVS1 για την ενσωμάτωση του αδενο-σχετιζόμενου ιού (AAV) είναι η προτιμώμενη θέση, επειδή αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενσωμάτωση στο γονίδιο PPP1R12C στην περιοχή AAVS1 οδηγεί σε υψηλά επίπεδα έκφρασης (Smith et al., 2008) και επειδή έχει αναπτυχθεί αποτελεσματική ειδική νουκλεάση ZFN για αυτήν την τοποθεσία

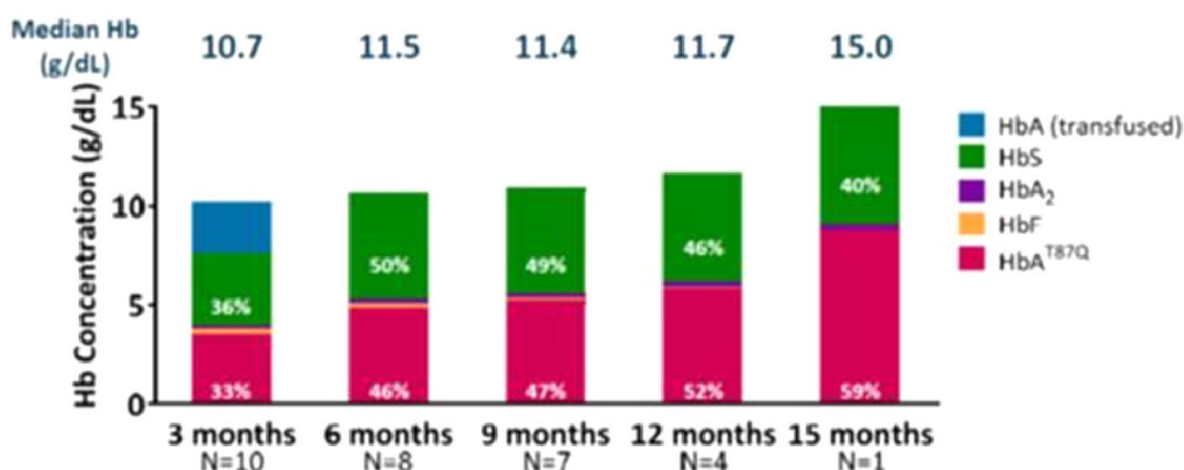
(Hockemeyer et al., 2009), καθώς επίσης, διότι το γονίδιο PPP1R12C δεν έχει καμία γνωστή λειτουργία στα αιμοποιητικά κύτταρα (Chang & Bouhassira, 2012).

### 4.3 Λεντι-αιμοσφαιρίνη στη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία

Το θεραπευτικό σχήμα της λεντι-αιμοσφαιρίνης για τη γονιδιακή θεραπεία για την SCD, περιέχει αυτόλογα CD34<sup>+</sup> αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (HSCs) που κωδικοποιούν τη β-σφαιρίνη με την αντι-δρεπανοκυτταρική μετάλλαξη T87Q (β<sup>A</sup>-T87Q) (Walters et al., 2020).

Σε έρευνα των Walters et al., 2020, αξιολογήθηκε η εξέλιξη, της χορήγησης λεντι-αιμοσφαιρίνης, στη Φάση 1/2 HGB-206 (NCT02140554) σε ασθενείς με SCD. Έτσι, χορηγήθηκε η αιμοσφαιρίνη (HbA<sup>T87Q</sup>) σε 7 αρχικούς ασθενείς (Ομάδα Α) και τα αποτελέσματα αν και δεν ήταν βέλτιστα, ωστόσο διατηρήθηκαν για περισσότερο από τους 30 μήνες κατά την παρακολούθηση μετά τη θεραπεία, υποδηλώνοντας διαγονιδιακή έκφραση διαρκείας. Για να αυξηθεί η παραγωγή της HbA<sup>T87Q</sup>, έγιναν αλλαγές στο πρωτόκολλο και στον τρόπο κατασκευής του φαρμακευτικού προϊόντος, στη Β Ομάδα (2 ασθενείς). Επιπλέον, η συλλογή HSCs με κινητοποίηση και αφαίρεση μετά από χορήγηση plerixafor καθιερώθηκε στη C Ομάδα (Walters et al., 2020). Οι ομάδες των ασθενών αποτελούνταν από ενήλικες με σοβαρή SCD, δηλαδή, συμπεριλαμβανομένης της υποτροπιάζουσας αγγειοαποφρακτικής κρίσης (VOC) και του οξέος θωρακικού συνδρόμου (ACS). Τα CD34<sup>+</sup> HSCs συλλέχθηκαν με αφαίρεση μετά από κινητοποίηση με plerixafor και τροποποιήθηκαν με τον BB305 λεντι-ικό φορέα (LVV). Οι ασθενείς έλαβαν μυελό-κατασταλτική ρύθμιση με busulfan και έλαβαν με έγχυση το φαρμακευτικό προϊόν LentiGlobin. Στη συνέχεια παρακολούθηθηκαν σε ότι αφορά, τις ανεπιθύμητες ενέργειες, τα κλάσματα της Hb και για άλλες παραμέτρους. Η παρουσία λεντι-ικού φορέα (LVV) στα κύτταρα που είχαν υποστεί την μεταγωγή (%LVV+), μετρήθηκε με qPCR μεμονωμένων αποικιών, από δοκιμασίες μονάδας σχηματισμού αποικιών, πριν την έγχυση του φαρμακευτικού προϊόντος και μετά την έγχυση, από τα CD34<sup>+</sup> HSCs του μυελού των οστών και των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) (Walters et al., 2020).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διάμεση τιμή HbS ήταν ≤50% της συνολικής Hb σε άτομα με παρακολούθηση ≥6 μηνών (n=8, Εικόνα 3.3) και η συνολική μη υποστηριζόμενη Hb κατά την τελευταία επίσκεψη σε ασθενείς με ≥6 μήνες παρακολούθησης ήταν 11,5 (10,2-15,0) g/dL, με επίπεδα HbA<sup>T87Q</sup> 5,3 (4,5-8,8) g/dL.



Εικόνα 3.3 Μέση ολική αιμοσφαιρίνη και τα κλάσματα της αιμοσφαιρίνης της Ομάδας C HGB-206

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Walters et al., 2020. Παρουσιάζεται η μέση ολική τιμή της αιμοσφαιρίνης και τα κλάσματά της, σε διαφορετικά χρονικά σημεία και αφορά την Ομάδα C HGB-206.

Στην έρευνα των Walters et al., 2020, έξι από αυτούς τους 8 ασθενείς είχαν ιστορικό VOCs ή ACS με τον ετήσιο ρυθμό VOC+ACS να παρουσιάζει μείωση από 5,3 (3-14) πριν από την επεξεργασία σε 0 (0-2) μετά τη θεραπεία. Επίσης, μια μείωση στους δείκτες αιμόλυσης παρατηρήθηκε μετά τη φαρμακευτική χορήγηση. Οι πιο κοινές μη αιματολογικές παρενέργειες ήταν η εμπύρετη ουδετεροπενία (n=10) και η στοματίτιδα (n=7). Σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες εμφανίστηκαν σε 6 ασθενείς, με τις πιο συχνές να είναι η ναυτία και ο έμετος. Στο χρονικό διάστημα της παρακολούθησης δεν υπήρξαν περιπτώσεις με σοβαρές παρενέργειες που να σχετίζονται με τη χορήγηση του φαρμάκου, αποτυχίας του μοσχεύματος, απόκτηση ικανότητας αντιγραφής του λεντι-ϊικού φορέα ή επικράτησης κλώνων. Οι αποικίες %LVV+ από PBMC στους 9 μήνες και στον μυελό των οστών στους 12 μήνες μετά την έγχυση του φαρμακευτικού προϊόντος (n=5) ήταν 79,2 (67,0-88,4) % και 81,5 (60,6-88,1) %, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας σταθερή μεταμόσχευση κυττάρων από την φαρμακευτική χορήγηση, %LVV+ που ήταν 80 (71-88) %.

Σε μια παρόμοια έρευνα των Kanter et al., 2023, πραγματοποιήθηκε γονιδιακή θεραπεία με το φαρμακευτικό προϊόν Iovo-cel (bb1111), με το οποίο χορηγήθηκε η λεντι-αιμοσφαιρίνη σε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD) και

περιελάμβανε αυτόλογη μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων και αρχέγονων κυττάρων, με μεταγωγή ενός τροποποιημένου γονιδίου της β-σφαιρίνης ( $\beta^{\text{A-T87Q}}$ ), μέσω του λεντι-ικού φορέα BB305, για την παραγωγή αντί-δρεπανοειδούς αιμοσφαιρίνης ( $\text{HbA}^{\text{T87Q}}$ ). Σ' αυτήν την κλινική έρευνα των Kanter et al., 2023, η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του Iovo-cel για SCD αξιολογήθηκε παρακολουθώντας την εξέλιξη της μελέτης, στη φάση 1/2 HGB-206 (ClinicalTrials.gov: NCT02140554). Η εφαρμογή της θεραπευτικής διαδικασίας εξελίχθηκε με την πάροδο του χρόνου, καθώς χρησιμοποιήθηκαν διδάγματα από τα αποτελέσματα στους αρχικούς ασθενείς, με σκοπό τη βελτιστοποίηση του προφίλ οφέλους-κινδύνου του Iovo-cel. Μετά από μέτρια έκφραση του  $\text{HbA}^{\text{T87Q}}$  στους αρχικούς ασθενείς, ομάδα Α, έγιναν αλλαγές στη διαδικασία θεραπείας για τους επόμενους ασθενείς που εντάχθηκαν στη συνέχεια στην Ομάδα Β, συμπεριλαμβανομένων βελτιώσεων στη συλλογή κυττάρων και στην κατασκευή του Iovo-cel. Μετά από 6 μήνες, ο διάμεσος αριθμός αντιγράφων του φορέα στο περιφερικό αίμα της Ομάδας Α ( $\geq 0,08$  c/dg) και τα επίπεδα  $\text{HbA}^{\text{T87Q}}$  ( $\geq 0,46$  g/dL), ήταν ανεπαρκή για ουσιαστική κλινική επίδραση αλλά σταθερά και διατηρήθηκαν για 5,5 χρόνια. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά βελτιώθηκαν σημαντικά στην ομάδα Β (ασθενής B1:  $\geq 0,53$  c/dg και  $\geq 2,69$  g/dL και ο ασθενής B2:  $\geq 2,14$  c/dg και  $\geq 6,40$  g/dL, αντίστοιχα) και δημιούργησαν μια βελτιωμένη βιολογική και κλινική αποτελεσματικότητα για την Β ομάδα, συμπεριλαμβανομένης της υψηλότερης ολικής αιμοσφαιρίνης και της μειωμένης αιμόλυσης. Η ασφάλεια του θεραπευτικού σχήματος Iovo-cel για SCD αντανάκλυνε σε μεγάλο βαθμό τις γνωστές παρενέργειες της συλλογής HSPCs, του θεραπευτικού σχήματος busulfan για την SCD, με την εμφάνιση της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας σε δύο ασθενείς της Ομάδας Α. Όμως, κρίθηκε απίθανο να σχετίζεται με ογκογένεση λόγω του φορέα εισαγωγής. Οι αλλαγές που έγιναν κατά την ανάπτυξη της διαδικασίας θεραπείας με Iovo-cel συσχετίστηκαν με βελτιωμένα αποτελέσματα και παρέχουν μαθήματα για μελλοντικές μελέτες της γονιδιακής θεραπείας στη SCD (Kanter et al., 2023).

## **Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> Εφαρμογή Γονιδιακής Θεραπείας στη β-Θαλασσαιμία και στη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία σε Ελλάδα, Ευρώπη και Η.Π.Α.**

### **5.1 Κλινική Εφαρμογή Γονιδιακής Θεραπείας στη β-Θαλασσαιμία και στη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία στην Ελλάδα**

Σύμφωνα με συνέντευξη που έδωσε στο Αθηναϊκό και Μακεδονικό Πρακτορείο Ειδήσεων (ΑΠΕ-ΜΠΕ) η Πρόεδρος του ΔΣ της Ελληνικής Εταιρείας Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής κα Γιαννάκη, σε ερώτημα πως γίνεται η γονιδιακή θεραπεία, αναφέρθηκε, ότι η γονιδιακή θεραπεία έχει δώσει εξαιρετικά επιτυχημένα αποτελέσματα στη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας με δύο διαφορετικούς τρόπους, που αφορούν το πώς τροποποιούνται γενετικά τα κύτταρα των ασθενών και δείχνει να είναι εξαιρετικά επιτυχείς (Φωτοπούλου, ΑΠΕ-ΜΠΕ 2019).

Στη μία περίπτωση γίνεται η μεταφορά του φυσιολογικού γονιδίου μέσα στα πάσχοντα κύτταρα του ασθενούς. Η άλλη προσέγγιση είναι ότι γίνεται επέμβαση σε κάποιο σημείο στο γονιδίωμα του ασθενούς και εκεί τροποποιείται το σημείο έτσι ώστε ο ασθενής να εκφράζει την εμβρυική αιμοσφαιρίνη, η οποία φυσιολογικά μετά τη γέννησή μας αποσιωπάται. Δηλαδή, γίνεται επανενεργοποίηση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Οι άνθρωποι που έχουν τη μετάλλαξη αυτή και δεν αποσιωπάται η εμβρυική αιμοσφαιρίνη και στην ενήλικη ζωή, έχει βρεθεί ότι ακόμη και να έχουν θαλασσαιμία, δεν χρειάζονται μεταγγίσεις. Έτσι προκύπτει ένας τρόπος θεραπείας της θαλασσαιμίας, με αύξηση της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Στην Ελλάδα δύο ασθενείς έλαβαν με τον πρώτο τρόπο, προϊόν γονιδιακής θεραπείας στο πλαίσιο κλινικής μελέτης και ο ένας είναι εδώ και 5,5 χρόνια χωρίς μεταγγίσεις, ο άλλος είναι 5 χρόνια χωρίς μεταγγίσεις (Φωτοπούλου, ΑΠΕ-ΜΠΕ 2019).

Η διαδικασία της θεραπείας αρχίζει με την λευκαφαίρεση, δηλαδή αφαιρούνται από τον ασθενή αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία τροποποιούνται γενετικά στο εργαστήριο και στη συνέχεια χορηγούνται στον ασθενή ο οποίος έχει προηγουμένως υποβληθεί σε χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία γίνεται για να καταστραφεί ο ενδογενής θαλασσαιμικός ή δρεπανοκυτταρικός μυελός και να δώσει την ευκαιρία στα τροποποιημένα κύτταρα να εγκατασταθούν και να ξεκινήσει η παραγωγή των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος. Αυτή είναι η διαδικασία για τον ασθενή και είναι



ίδια, είτε γίνει γενετική τροποποίηση με την μια περίπτωση να τοποθετείται το φυσιολογικό γονίδιο, είτε με την αύξηση της εμβρυική αιμοσφαιρίνης. Η θεραπεία αυτή γίνεται σε ηλικίες άνω των 12 ετών αλλά θεωρητικά μπορεί να γίνει σε όλες τις ηλικίες αρκεί βέβαια να μπορούν να αντέξουν μια χημειοθεραπεία, καθώς οι ασθενείς επιβαρύνονται πάρα πολύ από τη χρόνια εναπόθεση σιδήρου, οπότε μπορεί να έχουν οργανικά προβλήματα (Φωτοπούλου, ΑΠΕ-ΜΠΕ 2019).

Στην Ελλάδα δεν είναι διαθέσιμη η θεραπεία και αυτό γιατί το οικονομικό κόστος είναι μεγάλο, καθώς αυτές οι θεραπείες κοστίζουν πάνω από δύο εκατομμύρια για έναν ασθενή. Βεβαίως, είναι μια θεραπεία που χορηγείται μία φορά και θεραπεύει οριστικά τον ασθενή αλλά το κόστος είναι τεράστιο, καθώς θα πρέπει να πληρωθεί εφάπαξ και προκαταβολικά για όλους τους ασθενείς (Φωτοπούλου, ΑΠΕ-ΜΠΕ 2019).

Ο ασθενής που υποβλήθηκε στη θεραπεία για τη β-θαλασσαιμία αναφέρει ότι διαγνώστηκε από την ηλικία των 6 μηνών και ξεκίνησε τις μεταγγίσεις μετά τους 18 μήνες, κάποιες φορές κάθε 10 ημέρες και άλλες φορές κάθε 15 ημέρες, ανάλογα με την τιμή του αιματοκρίτη. Στα 33 του χρόνια έγινε μία ερευνητική μελέτη στο Νοσοκομείο Παπανικολάου και του προτάθηκε να συμμετάσχει καθώς πληρούσε τα κριτήρια. Στη διαδικασία, έπρεπε να γίνει μεταμόσχευση και πριν από αυτό χημειοθεραπεία, έτσι ώστε ο οργανισμός να μπορεί να λάβει το νέο μόσχευμα. Μετά τη λήψη του μοσχεύματος ο οργανισμός του σταδιακά άρχισε να επανέρχεται. Η όλη διαδικασία με την παραμονή του σε δωμάτιο εντατικής θεραπείας, κράτησε 35 μέρες. Μετά από διάστημα έξι μηνών ο αιματοκρίτης έφτασε σε επίπεδα ενός φυσιολογικού ανθρώπου και οι μεταγγίσεις σταμάτησαν περίπου 5 με 10 ημέρες αφότου βγήκε από την κλινική. Τον Νοέμβριο του 2018 είχε πλέον θεραπευτεί από τη β-θαλασσαιμία (Φωτοπούλου, ΑΠΕ-ΜΠΕ 2019).

## **5.2 Κλινικές Μελέτες Γονιδιακής Θεραπείας στη β-Θαλασσαιμία και στη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία στην Ευρώπη**

Σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA), στη θεραπεία για τη β-θαλασσαιμία (TDT) και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD), έχει τεθεί σε κλινικές μελέτες το Casgevy, που είναι ένα φαρμακευτικό προϊόν γονιδιακής θεραπείας σε κύτταρα, που χρησιμοποιεί την τεχνολογία CRISPR/Cas9 για την επεξεργασία των βλαστοκυττάρων του αίματος, του ίδιου, του ασθενούς. Είναι μια εξατομικευμένη εφάπαξ θεραπεία, που περιλαμβάνει την κινητοποίηση βλαστοκυττάρων του μυελού

των οστών από το αίμα του ασθενούς. Η γονιδιακή επεξεργασία CRISPR βρίσκει μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA μέσα σε ένα κύτταρο και χρησιμοποιώντας ένα «μοριακό ψαλίδι» για ακριβείς τομές, επιτρέπει την προσθήκη, την αφαίρεση ή την αλλαγή γενετικού υλικού σε αυτή τη συγκεκριμένη θέση του γονιδιώματος των κυττάρων. Με το Casgevy, τα βλαστοκύτταρα επεξεργάζονται στην ειδική για τα ερυθροειδή περιοχή, του ενισχυτή, του γονιδίου BCL11A, που συνήθως εμποδίζει την παραγωγή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF). Αυτά τα τροποποιημένα κύτταρα στη συνέχεια εγχέονται πίσω στον ασθενή και η μείωση της μεταγραφής του γονιδίου BCL11A οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής HbF, παρέχοντας έτσι λειτουργική αιμοσφαιρίνη. Το Casgevy υποστηρίχθηκε μέσω του προγράμματος Φάρμακα Προτεραιότητας (PRIME) του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (ΕΟΦ), το οποίο παρέχει έγκαιρη και ενισχυμένη επιστημονική και κανονιστική υποστήριξη σε φάρμακα, που έχουν ιδιαίτερη δυνατότητα να αντιμετωπίσουν τις ανεκπλήρωτες ιατρικές ανάγκες των ασθενών (EMA, 2023).

Ο Ευρωπαϊκός ΕΟΦ στήριξε τη χορήγησή του Casgevy, σε δύο συνεχείς κλινικές δοκιμές, ενός σκέλους ασθενών, ηλικίας 12 έως 35 ετών. Στην πρώτη δοκιμή, 42 ασθενείς συμπεριλαμβανομένων 13 εφήβων, με β-θαλασσαιμία TDT, έλαβαν μία δόση και συμπεριλήφθηκαν στο πρωτεύον σετ ελέγχου αποτελεσματικότητας. Από αυτούς τους 42 ασθενείς, οι 39 ήταν χωρίς μετάγγιση για τουλάχιστον ένα χρόνο. Στη δεύτερη δοκιμή, επίσης μιας ομάδας ασθενών, 29 ασθενείς συμπεριλαμβανομένων έξι εφήβων, που έπασχαν από σοβαρή SCD, συμπεριλήφθηκαν στο κύριο σετ ελέγχου αποτελεσματικότητας. Από αυτούς τους 29 ασθενείς, οι 28 ήταν ελεύθεροι επεισοδίων και αγγειαποφρακτικών κρίσεων (VOCs) για τουλάχιστον 12 διαδοχικούς μήνες. Η ασφάλεια του Casgevy αξιολογήθηκε στις δύο εν εξελίξει δοκιμές των δύο αυτών ομάδων και επίσης σε μία μακροχρόνια μελέτη παρακολούθησης, στην οποία 97 έφηβοι και ενήλικες ασθενείς με β-θαλασσαιμία TDT ή SCD υποβλήθηκαν σε θεραπεία με το φάρμακο (EMA, 2023).

Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες είναι ο χαμηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, συμπεριλαμβανομένης της εμπύρετης ουδετεροπενίας, τα χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων, η ηπατική νόσος, ναυτία, έμετος, πονοκέφαλος και οι στοματικές πληγές. Αυτά τα συμβάντα οφείλονται στα φάρμακα που απαιτούνται, ώστε τα τροποποιημένα αιμοσφαίρια να μεταμοσχευθούν και να αντικαταστήσουν τα μη τροποποιημένα βλαστοκύτταρα (EMA, 2023).

### 5.2.1 Έλεγχος Αποτελεσματικότητας του Casgevy

Το CASGEVY™ (exagamglogene autotemcel) από τη Vertex Pharmaceuticals Incorporated, συνιστάται για άδεια κυκλοφορίας υπό όρους και είναι ένας από τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τη διευκόλυνση της έγκαιρης πρόσβασης σε φάρμακα που εκπληρώνουν μια ανικανοποίητη ιατρική ανάγκη. Αυτός ο τύπος έγκρισης, επιτρέπει στον Οργανισμό να προτείνει ένα φάρμακο για άδεια κυκλοφορίας με λιγότερο πλήρη δεδομένα από τα συνήθως αναμενόμενα, εάν το όφελος από την άμεση διαθεσιμότητα ενός φαρμάκου στους ασθενείς, υπερτερεί του κινδύνου που ενυπάρχει, παρά το γεγονός ότι δεν είναι ακόμη διαθέσιμα όλα τα δεδομένα (EMA, 2023).

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του Casgevy, η εταιρεία θα πρέπει να υποβάλει τα τελικά αποτελέσματα που θα προκύψουν από τις τρέχουσες βασικές δοκιμές μέχρι τον Αύγουστο του 2026, καθώς και αποτελέσματα από τη συνεχιζόμενη μακροπρόθεσμη μελέτη παρακολούθησης και από άλλες μελέτες που θα διεξαχθούν με το προϊόν. Οι ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με Casgevy θα παρακολουθούνται για 15 χρόνια, ώστε να παρακολουθηθεί η μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα και ασφάλεια αυτής της γονιδιακής θεραπείας. Για να χαρακτηρίσει περαιτέρω τη μακροπρόθεσμη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, η εταιρεία θα πρέπει επίσης να διενεργήσει και να υποβάλει τα αποτελέσματα μιας μελέτης με βάση τα δεδομένα που θα εξαχθούν από ένα μητρώο ασθενών (EMA, 2023).

Στη συνολική αξιολόγηση των διαθέσιμων δεδομένων, η Επιτροπή Προηγμένων Θεραπειών (CAT) και η επιτροπή εμπειρογνομόνων του Ευρωπαϊκού ΕΟΦ για κυτταρικά και γονιδιακά φάρμακα, διαπίστωσε ότι τα οφέλη του Casgevy υπερτερούσαν των πιθανών κινδύνων σε ασθενείς με TDT και SCD. Η Επιτροπή Φαρμακευτικών Προϊόντων για ανθρώπινη χρήση (CHMP) του Ευρωπαϊκού ΕΟΦ, συμφώνησε με την αξιολόγηση και τη θετική γνώμη της CAT και συνέστησε την έγκριση αυτού του φαρμάκου (EMA, 2023).

Η άποψη που υιοθετήθηκε από την CHMP είναι ένα ενδιάμεσο βήμα στην πορεία του Casgevy για την πρόσβασή του από τους ασθενείς. Η άποψη θα σταλεί στην Ευρωπαϊκή Επιτροπή για την έκδοση απόφασης σχετικά με άδεια κυκλοφορίας σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης. Μετά τη χορήγηση της άδειας κυκλοφορίας, οι αποφάσεις σχετικά με την τιμή και την αποζημίωση, θα λαμβάνονται σε επίπεδο κάθε

κράτους μέλους, λαμβάνοντας υπόψη τον πιθανό ρόλο ή τη χρήση αυτού του φαρμάκου, στο πλαίσιο του εθνικού συστήματος υγείας αυτής της χώρας (EMA, 2023).

### **5.3 Έγκριση Γονιδιακών Θεραπειών για τη Δρεπανοκυτταρική Αναιμία από τον Οργανισμό FDA των Η.Π.Α.**

Η δρεπανοκυτταρική αναιμία ανήκει στην ομάδα κληρονομικών αιματολογικών διαταραχών που επηρεάζουν περίπου 100.000 άτομα στις ΗΠΑ. Είναι πιο συχνή στους Αφροαμερικανούς αλλά επίσης, σε μικρότερο βαθμό επηρεάζει και τους Ισπανοαμερικανούς (FDA, 2024).

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ ενέκρινε δύο θεραπείες ορόσημο, το Casgevy και το Lyfgenia, που αντιπροσωπεύουν τις πρώτες γονιδιακές θεραπείες βασισμένες σε κύτταρα για τη θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (SCD) σε ασθενείς 12 ετών και άνω. Επιπλέον, μία από αυτές τις θεραπείες, το Casgevy, είναι η πρώτη εγκεκριμένη από τον FDA θεραπεία που χρησιμοποιεί έναν τύπο νέας τεχνολογίας επεξεργασίας γονιδιώματος, σηματοδοτώντας μια καινοτόμο πρόοδο στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας.

Στις 8 Δεκεμβρίου 2023, ο FDA χορήγησε την έγκριση για το Casgevy στην Vertex Pharmaceuticals Inc., και την έγκριση για το Lyfgenia στην Bluebird Bio Inc, για τη θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας (SCD) σε ασθενείς ηλικίας άνω των 12 ετών (Rahmat et al., 2024).

Το Casgevy, μια γονιδιακή θεραπεία με βάση τα κύτταρα, έχει εγκριθεί για τη θεραπεία της SCD σε ασθενείς ηλικίας 12 ετών και άνω με υποτροπιάζουσες αγγειοαποφρακτικές κρίσεις. Το Casgevy είναι η πρώτη εγκεκριμένη από τον FDA θεραπεία που χρησιμοποιεί το CRISPR/Cas9, το οποίο μπορεί να κατευθυνθεί για να κόψει το DNA σε στοχευμένες περιοχές, επιτρέποντας τη δυνατότητα ακριβούς επεξεργασίας (αφαίρεσης, προσθήκης ή αντικατάστασης) του DNA όπου κόπηκε. Τα τροποποιημένα βλαστοκύτταρα του αίματος με το CRISPR/Cas9, μεταμοσχεύονται πίσω στον ασθενή, όπου ενσωματώνονται (προσκολλώνται και πολλαπλασιάζονται) εντός του μυελού των οστών και αυξάνουν την παραγωγή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) (FDA, 2024).

Η ενσωμάτωση του θεραπευτικού πλαισίου στο Casgevy, αντιπροσωπεύει μια επαναστατική πρόοδο στην ακρίβεια και την αποτελεσματικότητα των τεχνικών επεξεργασίας γονιδίων, που εφαρμόζονται κλινικά. Οι τρέχουσες θεραπείες για τη SCD περιλαμβάνουν υδροξυκαρβαμίδη, L-γλουταμίνη και μεταγγίσεις αίματος, καθεμία από τις οποίες έχει περιορισμούς και διαφορετική αποτελεσματικότητα. Η μεταμόσχευση μυελού των οστών είναι η μόνη θεραπευτική επιλογή, αλλά προορίζεται για σοβαρές περιπτώσεις λόγω της πολυπλοκότητας και των κινδύνων της (Rahmat et al., 2024).

Το Lyfgenia είναι μια γονιδιακή θεραπεία με βάση τα κύτταρα, στην οποία χρησιμοποιείται ένας λεντι-ϊικός φορέας (φορέας παράδοσης γονιδίου) για γενετική τροποποίηση και έχει εγκριθεί για τη θεραπεία ασθενών ηλικίας 12 ετών και άνω με δρεπανοκυτταρική αναιμία και ιστορικό αγγειαποφρακτικών επεισοδίων. Με το Lyfgenia, τα βλαστοκύτταρα του αίματος του ασθενούς τροποποιούνται γενετικά για να παράγουν HbA<sup>T87Q</sup>, μια αιμοσφαιρίνη που προέρχεται από γονιδιακή θεραπεία, που λειτουργεί παρόμοια με την αιμοσφαιρίνη HbA, η οποία είναι η φυσιολογική αιμοσφαιρίνη ενηλίκων και παράγεται σε άτομα που δεν έχουν προσβληθεί από δρεπανοκυτταρική αναιμία. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που περιέχουν HbA<sup>T87Q</sup> έχουν μικρότερο κίνδυνο να υποστούν δρεπάνωση και να εμποδίσουν τη ροή του αίματος. Αυτά τα τροποποιημένα βλαστοκύτταρα εμφυτεύονται στη συνέχεια στον ασθενή (FDA, 2024).

Και τα δύο φαρμακευτικά προϊόντα παρασκευάζονται από βλαστοκύτταρα του αίματος, του ίδιου του ασθενούς, τα οποία τροποποιούνται και επιστρέφονται ως μια εφάπαξ δόση, με εφάπαξ έγχυση, ως μέρος μιας μεταμόσχευσης αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων. Πριν από τη θεραπεία, συλλέγονται τα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα του ίδιου του ασθενούς και στη συνέχεια ο ασθενής πρέπει να υποβληθεί σε προετοιμασία μυελό-καταστολής (χημειοθεραπεία υψηλής δόσης), μια διαδικασία που αφαιρεί τα κύτταρα από τον μυελό των οστών, ώστε να μπορούν να αντικατασταθούν με τα τροποποιημένα κύτταρα από το Casgevy ή το Lyfgenia. Οι ασθενείς που έλαβαν το Casgevy ή το Lyfgenia θα είναι υπό παρακολούθηση, σε μια μακροχρόνια μελέτη, για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του κάθε προϊόντος (FDA, 2024).

Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του Casgevy αξιολογήθηκε σε μια συνεχιζόμενη ενός σκέλους πολυκεντρική κλινική δοκιμή, σε ενήλικες και εφήβους ασθενείς με SCD. Οι ασθενείς είχαν ιστορικό τουλάχιστον δύο καθορισμένων από το πρωτόκολλο σοβαρών VOCs κατά τη διάρκεια καθενός από τα δύο χρόνια πριν από την κλινική χορήγηση. Το πρωταρχικό επιδιωκόμενο αποτέλεσμα ήταν η απαλλαγή από σοβαρά επεισόδια VOCs για τουλάχιστον 12 διαδοχικούς μήνες, κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης των 24 μηνών. Συνολικά 44 ασθενείς έλαβαν θεραπεία με Casgevy. Από τους 31 ασθενείς με επαρκή χρόνο παρακολούθησης ώστε να είναι αξιολογήσιμοι, οι 29 (93,5%) πέτυχαν αυτό το αποτέλεσμα. Όλοι οι ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία πέτυχαν επιτυχή μεταμόσχευση χωρίς να υπάρχει περίπτωση αποτυχίας ή απόρριψης του μοσχεύματος (FDA, 2024).

Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του Lyfgenia βασίζεται στην ανάλυση δεδομένων από μια 24 μηνών πολυκεντρική μελέτη, ενός σκέλους, για ασθενείς με SCD και ιστορικό VOEs, ηλικίας μεταξύ 12 και 50 ετών. Η αποτελεσματικότητα αξιολογήθηκε με βάση την πλήρη υποχώρηση των αγγείο αποφρακτικών επεισοδίων (VOEs-CR) μεταξύ 6 και 18 μηνών μετά την έγχυση με Lyfgenia. Είκοσι οκτώ (88%) από τους τριάντα δύο ασθενείς, πέτυχαν πλήρη υποχώρηση των VOEs κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου, με παρακολούθηση που κυμαίνονταν από 8,5 έως 28,5 μήνες (FDA, 2024; Rahmat et al., 2024).

Μερικές από τις κοινές παρενέργειες και στις δύο δοκιμές περιλαμβάνουν στοματικές πληγές, χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων και λευκών αιμοσφαιρίων και εμπύρετη ουδετεροπενία. Η ναυτία, ο μυοσκελετικός πόνος, ο κοιλιακός πόνος, ο έμετος, ο πονοκέφαλος και ο κνησμός ήταν πρόσθετες ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρήθηκαν σε ασθενείς που έλαβαν Casgevy. Παρόλο που δεν παρατηρήθηκε καμία αιματολογική κακοήθεια στις δοκιμές, τέτοιες κακοήθειες έχουν καταγραφεί σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με Lyfgenia και ως εκ τούτου, οι ασθενείς που λαμβάνουν αυτή τη θεραπεία πρέπει να παρακολουθούνται στενά (FDA, 2024; Rahmat et al., 2024).

Το Casgevy και το Lyfgenia έχουν χαιρετιστεί ως καινοτομίες στον τομέα της ιατρικής, παρέχοντας μια πιθανή θεραπεία για εκατοντάδες χιλιάδες ασθενείς που επηρεάζονται από την SCD. Και οι δύο θεραπείες έχουν εγκριθεί από τον FDA αφού έδειξαν αποτελεσματικότητα σε ξεχωριστές κλινικές δοκιμές. Μέχρι τώρα, δεν έχει



ανακαλυφθεί αποτελεσματική θεραπεία για το SCD εκτός από τη μεταμόσχευση μυελού των οστών, η οποία εμπεριέχει το δικό της σύνολο κινδύνων. Τόσο το Casgevy όσο και το Lyfgenia, προοιωνίζουν ένα πολλά υποσχόμενο μέλλον, για τη θεραπεία της SCD στις Ηνωμένες Πολιτείες και ενδεχομένως παγκοσμίως. Αυτές οι εξελίξεις είναι έτοιμες να επιταχύνουν την έρευνα και την ανάπτυξη στη γονιδιακή θεραπεία, προωθώντας ένα αναπτυσσόμενο πεδίο αφιερωμένο στη βελτίωση των αποτελεσμάτων της θεραπείας και της ποιότητας ζωής, για ασθενείς με γενετικές διαταραχές παγκοσμίως. Αυτή η αξιοσημείωτη εξέλιξη υπογραμμίζει την υπόσχεση των κυτταρικών θεραπειών ως βιώσιμης εναλλακτικής λύσης σε σχέση με τα επί του παρόντος συνταγογραφούμενα τυπικά φάρμακα (Rahmat et al., 2024).

Οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες στο Lyfgenia περιλάμβαναν, στοματίτιδα (στοματικές πληγές των χειλιών, του στόματος και του λαιμού), χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων, λευκών αιμοσφαιρίων, ερυθρών αιμοσφαιρίων και εμπύρετη ουδετεροπενία (πυρετός και χαμηλός αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων), λόγω της χημειοθεραπείας και του υποκείμενου νοσήματος. Επίσης, αιματολογική κακοήθεια (καρκίνος αίματος) έχει εμφανιστεί σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με Lyfgenia. Γι' αυτό το λόγο, υπάρχει στο Lyfgenia μια ετικέτα σε μαύρο πλαίσιο που προειδοποιεί και δίνει πληροφορίες σχετικά με αυτόν τον κίνδυνο. Οι ασθενείς που λαμβάνουν αυτό το προϊόν θα πρέπει να παρακολουθούνται δια βίου για έλεγχο εμφάνισης κακοήθειας (FDA, 2024).

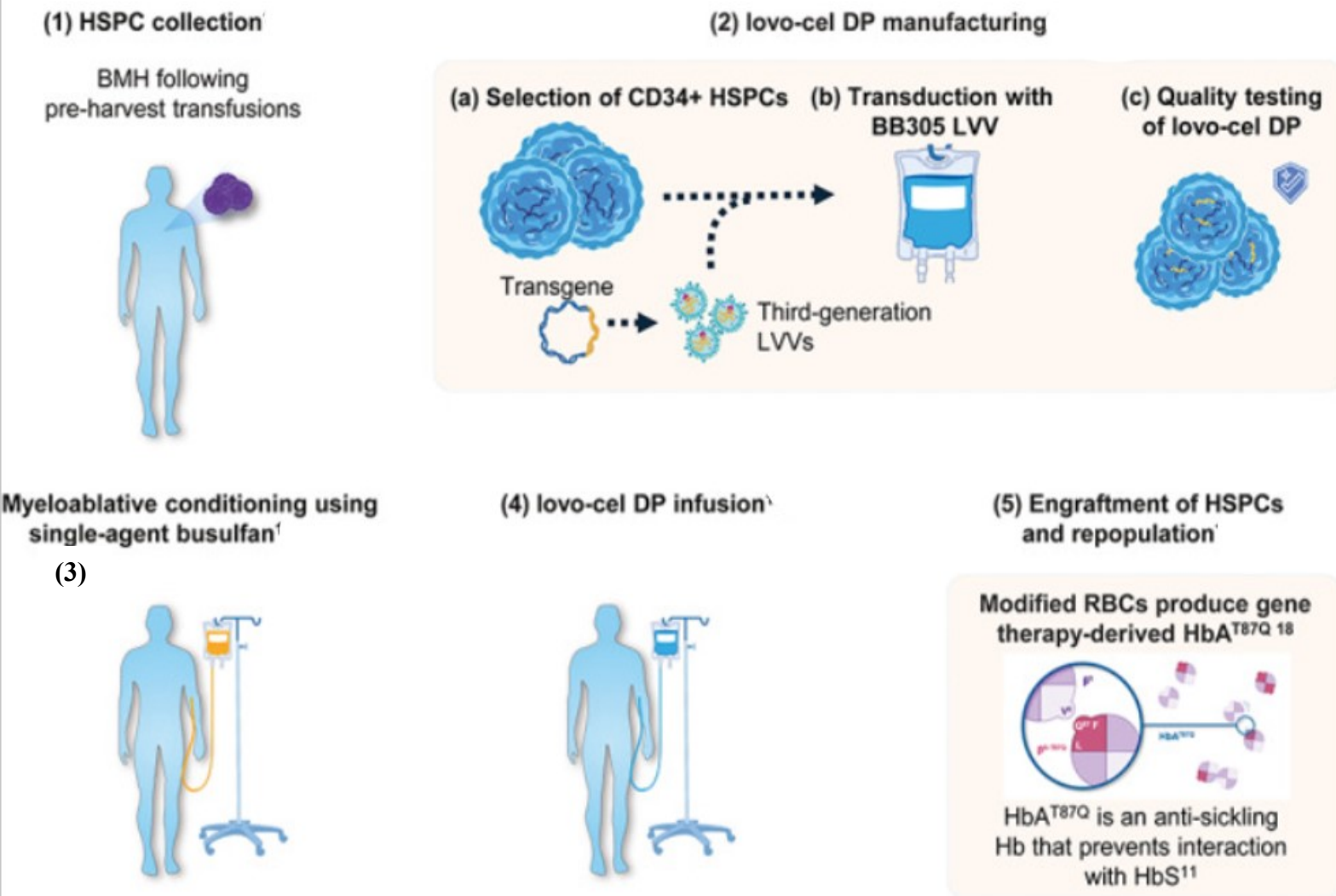
Και οι δύο εφαρμογές των φαρμάκων γονιδιακής θεραπείας Casgevy και Lyfgenia, έλαβαν ονομασίες Προηγμένης Θεραπείας Αναθεώρησης Προτεραιότητας, Ορφανού Φαρμάκου, Γρήγορης Διαδρομής και Αναγεννητικής Ιατρικής (FDA, 2024).

## Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> Το Οικονομικό Κόστος - Όφελος της Γονιδιακής Θεραπείας των Κληρονομικών Αναιμιών

Όπως αναφέρει στο Αθηναϊκό και Μακεδονικό Πρακτορείο Ειδήσεων η Πρόεδρος του ΔΣ της Ελληνικής Εταιρείας Γονιδιακής Θεραπείας και Αναγεννητικής Ιατρικής κα Γιαννάκη, το κόστος της γονιδιακής θεραπείας για τις κληρονομικές αναιμίες, ξεπερνά τα δύο εκατομμύρια ευρώ. Ωστόσο, αυτό μπορεί να μην υπερβαίνει το συνολικό κόστος νοσηλείας και φαρμακοθεραπείας, συμπεριλαμβανομένων των μεταγγίσεων των ασθενών με β-θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία, που ξεκινούν να χρειάζονται μεταγγίσεις, φάρμακα, νοσηλείες, από την βρεφική τους ηλικία μέχρι τον θάνατό τους. Αυτό το κόστος αν το υπολογίσουμε είναι ενδεχομένως πολύ μεγαλύτερο από τα δύο εκατομμύρια (Φωτοπούλου, ΑΠΕ-ΜΠΕ 2019).

Το κοινωνικό όφελος των ασθενών με κληρονομικές αναιμίες είναι μεγάλο, καθώς σε σχετική μελέτη, ομάδα ασθενών που έλαβαν θεραπεία με lono-cel, προβλέφθηκε ότι θα επιβιώσουν κατά μέσο όρο 23,84 περισσότερα χρόνια, με τυπική απόκλιση (SD) 12,80 έναντι της κοινής φροντίδας (προσδόκιμο ζωής, 62,24 έτη έναντι 38,40 έτη), με τον δείκτη του Ποιοτικώς Προσαρμοσμένου Έτους Ζωής (QALY), να δίνει κέρδη 10,20 έτη (SD, 4,10) και παράλληλα να γίνεται αποφυγή του άμεσου κόστους των 1.329.201 \$ (SD, 1.346.446 \$) ανά ασθενή. Τα προβλεπόμενα κοινωνικά οφέλη περιλάμβαναν μείωση των απωλειών QALY από τη χρήση φροντιστή, που έτσι αποφεύχθηκαν 1,19 έτη (SD, 1,38) καθώς και οι έμμεσες δαπάνες που αποφεύχθηκαν, να φτάνουν τα 540.416 \$ (SD, 262.353 \$) ανά ασθενή. Συμπεριλαμβανομένου του κόστους του lono-cel στα 3.282.009 \$ (SD, 29.690 \$) ανά ασθενή, οδήγησε σε αύξηση του λόγου κόστους-αποτελεσματικότητας, σε 191.519 \$ και 124.051 \$ ανά QALY, που εξοικονομήθηκαν από τρίτους πληρωτές και του οικονομικού κοινωνικού οφέλους, αντίστοιχα. Σε αναλύσεις σεναρίων, η προβλεπόμενη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας του lono-cel ήταν επίσης ευαίσθητη από το αρχικό χρονικό σημείο της έρευνας, τη συχνότητα VOEs και το ποσοστό των ασθενών που πέτυχαν και διατήρησαν την πλήρη επίλυση των VOEs (Herring et al., 2024).

Έτσι για παράδειγμα, η εφάπαξ θεραπεία με lono-cel (Εικόνα 6.1), οδηγεί σε παρατεταμένη παραγωγή HbA<sup>T87Q</sup> και εξαλείφει τα VOEs και sVOEs στην πλειονότητα των ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία.



Εικόνα 6.1 Γονιδιακή θεραπεία της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας με lono-cel, χρησιμοποιώντας λεντι-ικό φορέα LVV

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Kanter et al., 2023. Τα στάδια της γονιδιακής θεραπείας με lono-cel (bb1111-LentiGlobin) της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας.

Τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν στις εκ των υστέρων αναλύσεις, επιτρέπουν την πρόβλεψη της πιθανότητας για πλήρη θεραπεία του αγγειοαποφρακτικού επεισοδίου (VOE-CR) και πλήρη θεραπεία σοβαρού αγγειοαποφρακτικού επεισοδίου (sVOE-CR), χρησιμοποιώντας μετρήσεις ήδη 6 μήνες μετά τη θεραπεία (Rifkin-Zenenberg et al., 2024).

Σύμφωνα με την GlobalData, 19 γονιδιακές θεραπείες και γονιδιακά τροποποιημένες κυτταρικές θεραπείες, έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά των ΗΠΑ, από τις οποίες οι 7 έχουν οικονομικό κόστος πάνω από 1 εκατομμύριο δολάρια (Εικόνα 6.2). Μεταξύ αυτών το Casgevy και το Lifgenia που είναι ανταγωνιστικές θεραπείες για τη SCD έχουν μέση τιμή κόστους ανά μονάδα τα 2.200.000 εκατομμύρια δολάρια και τα 3.100.000 εκατομμύρια δολάρια αντίστοιχα κατά την κυκλοφορία τους, με βάση το κόστος απόκτησής τους σε χονδρική τιμή (Watt, 2024).



**Εικόνα 6.2 Κόστος επώνυμης γονιδιακής θεραπείας ανά μονάδα**

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Watt (2024). Η Μέση τιμή σε δολάρια (\$)/Μονάδα κατά την πρώτη κυκλοφορία στο εμπόριο, για επώνυμη γονιδιακή θεραπεία/γονιδιακή τροποποιημένη κυτταρική θεραπεία ανά άτομο στις ΗΠΑ. Τα στοιχεία προέρχονται από άρθρο της GlobalData, Price Intelligence (POLI) service.

Σε έρευνα των Johnson et al., 2023, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα των Truven Health Marketscan, σε μια αναδρομική ομάδα ασθενών με SCD από το 2007 μέχρι το 2018, με παράλληλη σύγκριση αντίστοιχων ασθενών ελέγχου από Έρευνα του Πίνακα Ιατρικών Δαπανών, για τον υπολογισμό του μέσου κόστους του δείγματος Kaplan-Meier, χρησιμοποιώντας παλαιότερες καμπύλες αναφοράς επιβίωσης για SCD και των ατόμων ελέγχου. Στις δύο αυτές ομάδες, τα άτομα με SCD ήταν 20.891 και τα άτομα ελέγχου 33.588. Το δείγμα των ασθενών με SCD είχε μέση ηλικία 25,7 (τυπική απόκλιση, 17,4) έτη και το 58,0% ήταν γυναίκες. Το προσαρμοσμένο ως προς την επιβίωση κόστος της SCD κορυφώθηκε στην ηλικία 13 έως 24 ετών και μειώθηκε σε μεγαλύτερες ηλικίες. Δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στο συνολικό ιατρικό κόστος ή στο κόστος των χρημάτων που δόθηκαν από το εισόδημα των ίδιων των ασθενών, μεταξύ των φύλων. Το συνολικό κόστος ζωής που αποδίδεται σε ασθενείς με SCD

ηλικίας 0 έως 64 ετών υπολογίστηκε σε 1,6 εκατομμύρια \$ (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης, 1,3 εκατομμύρια \$ - 1,9 εκατομμύρια \$) και 1,7 εκατομμύρια \$ (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης, 1,4 εκατομμύρια \$ - 2,1 εκατομμύρια \$), για γυναίκες και άνδρες αντίστοιχα (Εικόνα 6.3), (Πίνακας 6.1).

Κόστος Δρεπανοκυτταρικής Αναιμίας των μη-Ηλικιωμένων (0-64 ετών).				
ΓΥΝΑΙΚΕΣ	Συνολικό Ιατρικό Κόστος	\$1,588,120 (1,262,183-1,914,057)	Κόστος από προσωπικό εισόδημα	\$42,395 (34,756-50,033)
ΑΝΔΡΕΣ		\$1,748,832 (1,420,634-2,077,031)		\$45,091 (36,491-53,691)

Εικόνα 6.3 Κόστος που δαπανάται στη δρεπανοκυτταρική αναιμία από μη-ηλικιωμένους (0-64 ετών)

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Johnson et. al., 2023. Στις Η.Π.Α., το μεγαλύτερο μέρος του οικονομικού κόστους της ιατροφαρμακευτικής υποστήριξης των ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία ηλικίας μέχρι 64 ετών, καλύπτεται από τα ασφαλιστικά τους ταμία.

Οι αντίστοιχες εκτιμήσεις για τα χρήματα που πληρώνουν από το εισόδημά τους οι ασθενείς με SCD, ήταν 42.395 \$ (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης, 34.756\$ - 50.033 \$) για τις γυναίκες και 45.091 \$ (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης, 36.491 \$ - 53.691 \$) για τους άνδρες, που αντιπροσωπεύουν το 2,6% και το 2,7% του συνολικού κόστους, αντίστοιχα. Αυτά αντιπροσωπεύουν αύξηση 907% και 285% στο συνολικό ιατρικό κόστος και το κόστος από προσωπικό εισόδημα, πάνω από το αντίστοιχο της ομάδας ελέγχου. Όταν αφαιρέθηκε η επίδραση της θνησιμότητας (δηλαδή, το αρνητικό κόστος λόγω της αυξημένης θνησιμότητας μεταξύ των ατόμων με SCD), το κόστος που αποδόθηκε στη SCD αντικατοπτρίστηκε στις επιπτώσεις της έντασης, οι οποίες ήταν ελαφρώς υψηλότερες από τις αρχικές εκτιμήσεις. Αν και περιορίζονται στον εμπορικά ασφαλισμένο πληθυσμό, αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η άμεση οικονομική επιβάρυνση από τη SCD είναι σημαντική και κορυφώνεται σε μικρότερες ηλικίες, υποδηλώνοντας την ανάγκη για θεραπευτική αποκατάσταση και εφαρμογή νέων ιατρικών θεραπειών (Johnson et al., 2023).

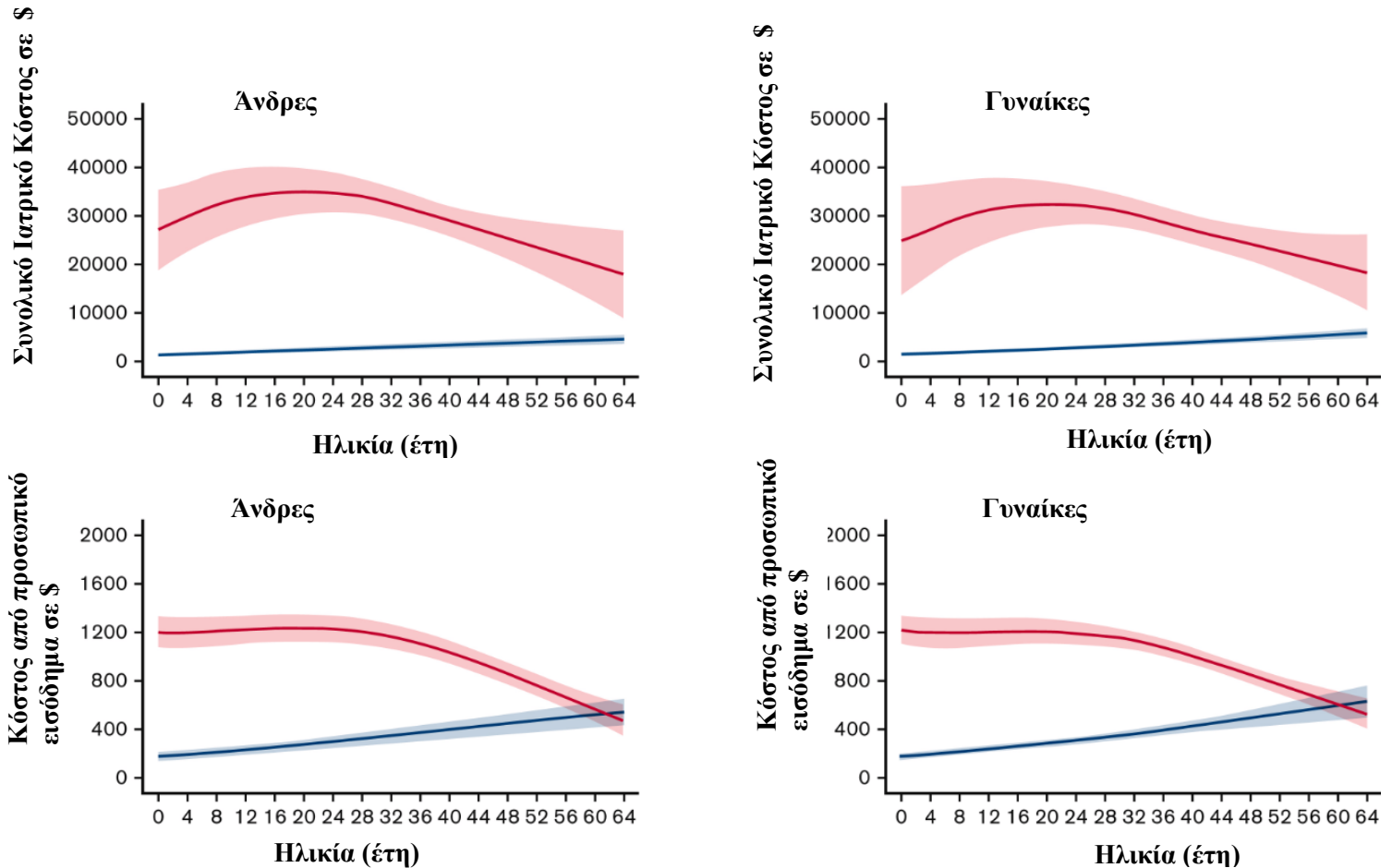
Φύλο	Προσδόκιμο Ζωής (0-64) SCD vs Ομάδα Ελέγχου	Προσαρμοσμένο Κόστος για άτομα με SCD (95% Δ.Ε.)	Προσαρμοσμένο Κόστος για Ομάδα Ελέγχου (95% Δ.Ε.)	Κόστος Δαπάνης για άτομα με SCD (95% Δ.Ε.)	Το ακραίο κόστος δαπάνης στη SCD (95% Δ.Ε.)	Επίδρασης της SCD στο κόστος λόγω θανάτου (95% Δ.Ε.)
<b>Συνολικό κόστος σε \$</b>						
Γυναίκες	51.2 vs 62.3	1.812.743 (1.489.450 έως 2.136.036)	224.623 (191.989 έως 257.256)	1.588.120 (1.262.183 έως 1.914.057)	1.644.900 (1.319.718 έως 1.970.082)	-56.780 (-85.270 έως -28.290)
Ανδρες	50.5 vs 60.3	1.937.966 (1.612.327 έως 2.263.605)	189 133 (154.174 έως 224.093)	1.748.832 (1.420.634 έως 2.077.031)	1.792.774 (1.465.038 έως 2.120.511)	-43.942 (-75.860 έως -12.023)
<b>Δαπάνη από Προσωπικό εισόδημα σε \$</b>						
Γυναίκες	51.2 vs 62.3	67.003 (60.597 έως 73.409)	24.609 (21.084 έως 28.134)	42.395 (34.756 έως 50.033)	48.562 (41.264 έως 55.861)	-6.168 (-9.198 έως -3.138)
Ανδρες	50.5 vs 60.3	67.897 (60.696 έως 75.098)	22.806 (18.479 έως 27.132)	45.091 (36.491 έως 53.691)	50.346 (42.005 έως 58.686)	-5.254 (-9.188 έως -1.320)

**Πίνακας 6.1 Συνολικό οικονομικό κόστος και κόστος δαπάνης προσωπικού εισοδήματος των μη ηλικιωμένων (ηλικία 0-64 ετών) για την αντιμετώπιση της SCD**

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένος πίνακας από Johnson et al., 2023. Στον πίνακα πέρα από το συνολικό οικονομικό κόστος και κόστος δαπάνης προσωπικού εισοδήματος για τη SCD, αναλύεται επίσης και το οικονομικό κόστος στην περίπτωση της έντασης και της θνησιμότητας λόγω της ασθένειας. Δ.Ε.: Διάστημα Εμπιστοσύνης.

Στα αποτελέσματα των Johnson et al., 2023, υπήρχαν σημαντικές τάσεις που σχετίζονται με την ηλικία στο συνολικό ιατρικό κόστος για τα άτομα με SCD. Μεταξύ των επιζώντων, το υψηλότερο συνολικό ετήσιο ιατρικό κόστος και το κόστος δαπάνης προσωπικού εισοδήματος ήταν σε άτομα ηλικίας 55 έως 64 ετών, αντανakλώντας την αυξανόμενη επιβάρυνση του ιατρικού κόστους με την ηλικία, η οποία μπορεί να αποδοθεί σε συσσωρευμένη βλάβη των οργάνων. Ωστόσο, το μέσο προσδόκιμο ζωής για ένα άτομο με SCD ήταν τα 51 χρόνια, πράγμα που σημαίνει ότι οι περισσότεροι ασθενείς δεν επιβιώνουν αρκετά για να υποστούν το υψηλό κόστος της μεγαλύτερης ενηλικίωσης.





Εικόνα 6.4 Ηλικιακό προφίλ του οικονομικού κόστους που δαπανάται στην δρεπανοκυτταρική αναιμία και σε άτομα της ομάδας ελέγχου

**Σημείωση.** Προσαρμοσμένη εικόνα από Johnson et al., 2023. Εξομάλυνση του κόστους δαπάνης στην SCD και στην ομάδα ελέγχου.

Η προσαρμοσμένη αύξηση του συνολικού κόστους σε σχέση με την ηλικία μεταξύ των επιζώντων από SCD σε άνδρες και γυναίκες και το αντίστοιχο συνολικό κόστος στην ομάδα ελέγχου, φαίνεται στην Εικόνα 6.4. Στην έρευνα, το προσαρμοσμένο ως προς την επιβίωση κόστος, κορυφώθηκε στην εφηβεία και στην πρώιμη ενήλικη ζωή λόγω της υψηλής έντασης του ιατρικού κόστους και των χαμηλών ποσοστών θνησιμότητας κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Το ιατρικό κόστος ήταν ιδιαίτερα υψηλό κατά τη μετάβαση από την παιδιατρική στην φροντίδα ενηλίκων, όταν εντοπίστηκαν πολλαπλά εμπόδια στη λήψη της βέλτιστης και σωστής θεραπείας. Αυτά περιλαμβάνουν την έλλειψη πάροχων υπηρεσιών με εξειδίκευση στη SCD, δυσκολίες μετάβασης από παιδιατρικές σε εγκαταστάσεις ενηλίκων, μεροληψία έναντι ατόμων με SCD, ο συχνός ή χρόνιος πόνος, καθώς και τον θεσμικό ρατσισμό. Αυτοί οι παράγοντες μπορεί να συνέβαλαν στα υψηλά ποσοστά επισκέψεων για εντατική φροντίδα που παρατηρήθηκαν στη νεαρή ενήλικη ζωή, κάτι που είναι σύμφωνο με τις

προηγούμενες παρατηρήσεις. Το κόστος δαπάνης προσωπικού εισοδήματος για μη ηλικιωμένους, ήταν σχεδόν 4 φορές μεγαλύτερο από τους αντίστοιχους μάρτυρες και ήταν κατά μέσο όρο 1.324 \$ ετησίως μεταξύ των επιζώντων ατόμων με SCD (Johnson et al., 2023).

Μια ανάλυση που χρηματοδοτήθηκε από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρδιάς, Πνεύμονα και Αίματος (NHLBI), μέρος των Εθνικού Ινστιτούτου Υγείας των Η.Π.Α., δείχνει ότι σε σύγκριση με το ισόβιο κόστος της θεραπείας στη δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD), μια πιθανή εφάπαξ γονιδιακή θεραπεία, θα μειώσει σημαντικά τη νοσηρότητα, θα βελτιώσει την επιβίωση και θα μειώσει το κόστος της περίθαλψης κατά τη διάρκεια της ζωής των ασθενών σε σύγκριση με τη συμβατική περίθαλψη. Η δημοσίευση έγινε στο *Annals of Internal Medicine* και η μελέτη, δείχνει τα αποτελέσματα δύο ανεξάρτητων μοντέλων προσομοίωσης σε υπολογιστή, για να παρέχει τις πιο λεπτομερείς εκτιμήσεις των αρχικών και μεταγενέστερων κλινικών επιπτώσεων του κόστους και των τιμών, που βασίζονται στην αξία των θεραπειών γονιδιακής θεραπείας για SCD μέχρι σήμερα. Και τα δύο μοντέλα προέβλεψαν τεράστια οφέλη για την υγεία των ασθενών και δευτερεύοντα οφέλη για τους φροντιστές τους και την κοινωνία, όσον αφορά τη δυνατότητα παραμονής των ασθενών στο εργατικό δυναμικό. Τα δύο μοντέλα διέφεραν ως προς την τιμή, όπου η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να θεωρηθεί οικονομικά αποδοτική. Το ένα μοντέλο διαπίστωσε ότι απαιτείται ποσό ενός εκατομμυρίου δολαρίων, ενώ το άλλο υπολόγισε ότι ένα ποσό κάτω των δύο εκατομμυρίων δολαρίων ανά ασθενή θα ήταν οικονομικά αποδοτικό. Το ζήτημα της οικονομικής αντοχής για τη θεραπεία της SCD με γονιδιακή θεραπεία, βρίσκεται πλέον στο επίκεντρο μετά την έγκριση των πρώτων γονιδιακών θεραπειών από τον FDA των ΗΠΑ, στα τέλη του 2023. Οι εκτιμήσεις τοποθετούν το τρέχον κόστος της ιατρικής περίθαλψης για ασθενείς με SCD που χρησιμοποιούν συμβατικές θεραπείες, περίπου στα δύο εκατομμύρια δολάρια (Basu et al., 2024).

Οι συμβατικές θεραπείες ή η κοινή φροντίδα για τη δρεπανοκυτταρική αναιμία μπορεί να περιλαμβάνουν τη χρήση υδροξυουρίας και άλλων φαρμάκων, καθώς και συχνές μεταγγίσεις αίματος. Ωστόσο, αυτές οι θεραπείες είναι σε μεγάλο βαθμό προσωρινές και επικεντρώνονται στην ανακούφιση των συμπτωμάτων της νόσου, ιδιαίτερα των επεισοδίων έντονου πόνου, που είναι το χαρακτηριστικό γνώρισμα της SCD. Οι μεταμοσχεύσεις βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών, αν και είναι

θεραπευτικές, περιορίζονται από την έλλειψη γενετικά συμβατών δοτών και άλλων προκλήσεων (Basu et al., 2024).

Οι ερευνητές μόλις πρόσφατα ανέπτυξαν γενετικές θεραπείες για τη δρεπανοκυτταρική αναιμία, παρέχοντας δυνητικά μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής και βελτιωμένη ποιότητα ζωής. Περιλαμβάνουν θεραπείες που ενισχύουν την παραγωγή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, ενός τύπου πρωτεΐνης αίματος που μεταφέρει οξυγόνο που υπάρχει κατά τη γέννηση. Όταν αυξάνεται σε ενήλικες με SCD, η εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη μειώνει τις επιπλοκές που σχετίζονται με τη νόσο, συμπεριλαμβανομένης της απόφραξης των αιμοφόρων αγγείων που μπορεί να προκαλέσει έντονο πόνο και βλάβη οργάνων, ακόμα και εγκεφαλικό. Για τη νέα μελέτη, μέρος της Πρωτοβουλίας Cure Sickle Cell του NHLBI, οι ερευνητές ανέπτυξαν δύο ανεξάρτητα μοντέλα προσομοίωσης κόστους-αποτελεσματικότητας για να διερευνήσουν αυτά τα πραγματικά κόστη, καθώς και τα οφέλη κατά τη διάρκεια της ζωής των ασθενών με SCD. Αυτά περιλάμβαναν το Μοντέλο του Πανεπιστημίου της Ουάσιγκτον για την οικονομική ανάλυση της δρεπανοκυτταρικής θεραπείας (UW-MEASURE) και το Μοντέλο Έρευνας και Οικονομικών Αποτελεσμάτων Δρεπανοκυτταρικής Νόσου του Ινστιτούτου Fred Hutchinson (FH-HISCORE). Και τα δύο μοντέλα, τα οποία διαφέρουν ελαφρώς ως προς τον σχεδιασμό τους, ανέλυσαν δεδομένα αξιώσεων ασφάλισης για άτομα με δρεπανοκυτταρική αναιμία που είχαν εγγραφεί στο Medicaid, το Medicare ή και στα δύο Κέντρα (CMS) μεταξύ 2008 και 2016 (Basu et al., 2024). Οι ερευνητές περιόρισαν την ανάλυσή τους στα δεδομένα CMS σε 4.762 άτομα ηλικίας 12 έως 38 ετών (50% γυναίκες) που ήταν επιλέξιμα για γονιδιακή θεραπεία με βάση τα τρέχοντα κριτήρια επιλογής ασθενών. Οι ερευνητές προσάρμοσαν και τα δύο μοντέλα ώστε να αντικατοπτρίζουν ένα μέσο προσδόκιμο ζωής για τον πληθυσμό των ασθενών με SCD γενικά στα 51 έτη, το οποίο είναι πολύ μικρότερο από το μέσο προσδόκιμο ζωής για τους Αμερικανούς, που γενικά είναι περίπου 77 χρόνια, σύμφωνα με τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων. Εκτός από τις εκτιμήσεις κόστους, τα μοντέλα ανέλυσαν επίσης την αποτελεσματικότητα των θεραπειών με έμφαση στις επιπτώσεις στην υγεία, όπως η ποιότητα ζωής, το προσδόκιμο ζωής και τις μη ιατρικές επιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας χρόνου και της παραγωγικότητας του ασθενούς. Επίσης τις επιπτώσεις στους φροντιστές ή και την οικογένεια του ασθενούς. Και τα δύο μοντέλα συγκρίθηκαν με τη συμβατική περίθαλψη σε όλη τη μέση διάρκεια ζωής ενός ασθενούς με SCD. Το

μοντέλο FH-HISCORE διαπίστωσε ότι οποιαδήποτε τιμή για τη γονιδιακή θεραπεία SCD κάτω του 1 εκατομμυρίου \$ είναι ιδιαίτερα αποδοτική από πλευράς κόστους, ενώ το μοντέλο UW-MEASURE διαπίστωσε ότι οποιαδήποτε τιμή κάτω από 2 εκατομμύρια δολάρια είναι εξαιρετικά οικονομικά αποδοτική. Συλλογικά, τα μοντέλα προτείνουν ότι οποιαδήποτε τιμή κάτω των 2 εκατομμυρίων δολαρίων, αν και υψηλή, θα μπορούσε να αξίζει τον κόπο. Αλλά πάνω από αυτό, σημείωσαν, η εμπιστοσύνη ότι μια τέτοια θεραπεία θα προσφέρει μια αποδεκτή σχέση τιμής-ποιότητας επιδεινώνεται σημαντικά (Basu et al., 2024).

Εκτός από τα οφέλη κόστους σε σχέση με τη συμβατική θεραπεία, και τα δύο μοντέλα έδειξαν και άλλα σημαντικά πλεονεκτήματα στη γονιδιακή θεραπεία SCD, συμπεριλαμβανομένου του κοινωνικού οφέλους. Μεταξύ αυτών, θα μπορούσε να αυξήσει το προσδόκιμο ζωής κατά 17 χρόνια (17,4 για το UW-MEASURE και 17 για το FH-HISCORE), θα μείωνε τον αριθμό των κρίσεων οξέος πόνου κατά τη διάρκεια της ζωής κατά 69 ή 86 συμβάντα, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την κοινή φροντίδα. Επίσης, θα μπορούσε να αυξήσει τις προοπτικές για τη μακροχρόνια απασχόληση του ασθενούς, καθώς και να προσφέρει βελτιώσεις στην ποιότητα ζωής του φροντιστή τους. Επιπλέον, το κόστος της γονιδιακής θεραπείας θα μπορούσε να γίνει φθηνότερο μέσα από την πολιτική προώθηση του ανταγωνισμού μεταξύ των εταιρειών παροχής τέτοιων φαρμακευτικών προϊόντων (Basu et al., 2024).

## Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup> Συμπεράσματα-Προοπτικές της Γονιδιακής Θεραπείας στις Κληρονομικές Αναιμίες

Η βελτίωση των στρατηγικών μεταφοράς γονιδίων είναι τέτοια που υπάρχουν λίγες σοβαρές περιπτώσεις ασθενειών για τις οποίες δεν αναπτύσσονται θεραπείες γονιδιακής μεταφοράς. Όμως, η ανάπτυξη νέων τάξεων θεραπείας διαρκεί συνήθως δύο έως τρεις δεκαετίες, με πρόσφατα παραδείγματα τη δημιουργία των μονοκλωνικών αντισωμάτων και των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Η γονιδιακή θεραπεία, η οποία εισήλθε στις κλινικές δοκιμές στις αρχές της δεκαετίας του 1990, διένυσε την ίδια χρονική πορεία. Τα παραδείγματα κλινικής επιτυχίας είναι πλέον πολλά και οι προσεγγίσεις της γονιδιακής θεραπείας είναι πιθανό να γίνονται όλο και πιο σημαντικές. Ένα κεντρικό ερώτημα είναι η μακροπρόθεσμη ασφάλεια της μεταφοράς γονιδίων, γι' αυτό οι ρυθμιστικοί φορείς έχουν επιβάλει 15ετή παρακολούθηση για άτομα που έχουν εγγραφεί σε πολλές κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας. Η συνειδητοποίηση των θεραπευτικών πλεονεκτημάτων της σύγχρονης μοριακής ιατρικής θα εξαρτηθεί από τη συνεχή πρόοδο στην τεχνολογία μεταφοράς γονιδίων (Anguela & High, 2019).

Η γονιδιακή θεραπεία που γίνεται με γονιδιακή προσθήκη μπορεί να οδηγήσει σε θεραπεία της ασθένειας αλλά το παθολογικό γονίδιο παραμένει στη θέση του. Επομένως, για να γίνει η γονιδιακή θεραπεία επιτυχής στο εκατό της εκατό, θα πρέπει να μπορεί να επιτύχει την *in situ* επιδιόρθωση του ελλαττωματικού γονιδίου. Σε αυτήν την περίπτωση λειτουργούν φυσιολογικά όλοι οι ενδογενείς μηχανισμοί του κυττάρου που διασφαλίζουν τον ορθό και ασφαλή έλεγχο της έκφρασης του διορθωμένου γονιδίου. Έτσι, από τις μέχρι τώρα ερευνητικές προσπάθειες φαίνεται ότι η εφαρμογή των νουκλεασών δακτύλων ZFN για την *in situ* επιδιόρθωση γονιδίων, σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSs) και η ερυθροποιητική διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων, είναι ένα σημαντικό βήμα προς αυτήν την κατεύθυνση και έχει αλλάξει τους σύγχρονους ερευνητικούς στόχους (Chang & Bouhassira, 2012).

Για τους ασθενείς που υποφέρουν από β-θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία και υποβάλλονται σε γονιδιακή θεραπεία, το μεγάλο πρόβλημα που μπορεί να εμφανιστεί είναι η διεισδυτική μεταλλαξογένεση λόγω των φορέων. Όμως τα τελευταία κλινικά αποτελέσματα με τη χορήγηση της λεντι-αιμοσφαιρίνης δείχνει μείωση των επιπλοκών που σχετίζονται με τη SCD και την αιμόλυση, καθώς επίσης

και μακροπρόθεσμη ασφάλεια, καταδεικνύοντας αυτή τη γονιδιακή θεραπεία ασφαλή. Γενικότερα, δείχνει να έχει ένα ισχυρό θεραπευτικό όφελος για τους ασθενείς με SCD (Walters et al., 2020).

Η τεχνολογία των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (iPS) μπορεί να δώσει υψηλές προοπτικές για τη θεραπεία των αιμοσφαιρινοπαθειών. Όμως, πρέπει να αναπτυχθούν εργαλεία και μέθοδοι για την ασφαλή εισαγωγή θεραπευτικών γονιδίων, για τη διόρθωση του γενετικού ελαττώματος. Η εισαγωγή του γονιδίου σε ειδική τοποθεσία είναι μια πολύ ελκυστική μέθοδος για τη γονιδιακή θεραπεία επειδή οι κίνδυνοι δημιουργίας μεταλλαξογένεσης εξαλείφονται. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι ο εντοπισμός μιας ασφαλούς θέσης και η χρήση ενός ενιαίου συνόλου επικυρωμένων κατασκευών, καθώς αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διορθώσουν μεγάλη ποικιλία μεταλλάξεων, με αποτέλεσμα την απλοποίηση κατά την κλινική χρήση (Chang & Bouhassira, 2012).

Σήμερα χρησιμοποιούνται περισσότερο οι προσεγγίσεις της *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας για την εξάλειψη των γενετικών ασθενειών, χρησιμοποιώντας κυρίως τα HSCs, τα αυτό-ανανεωμένα κύτταρα που δημιουργούν όλες τις σειρές των κυττάρων του αίματος. Λόγω των πολλαπλών κυτταρικών διαιρέσεων που υφίστανται αυτά τα κύτταρα, είτε για να αυτο-ανανεωθούν, είτε για να διαφοροποιηθούν σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, θα πρέπει το θεραπευτικό γονίδιο να ενσωματωθεί σταθερά στο γονιδίωμα του ξενιστή, ώστε να υπάρχει σε όλα τα θυγατρικά κύτταρα (Anguela & High, 2019).

Η στοχευμένη ενσωμάτωση των φορέων σε ασφαλή σημεία του γονιδιώματος, μεταξύ αυτών οι θέσεις, AAVS1 (στο χρωμόσωμα 19) και CCR5, καθώς και σε άλλες ασφαλείς ενδογονιδιακές περιοχές, μπορεί να είναι αποδεκτές για ερευνητικές εφαρμογές, όμως χρειάζεται να δοθεί πολύ περισσότερο βάρος στην έρευνα, για την απόδειξη της ασφάλειας τους για κλινικές εφαρμογές (Papapetrou & Schambach, 2016). Ωστόσο, η παράδοση των θεραπευτικών γονιδίων, είναι ένα από τα πιο επείγοντα προβλήματα που εμποδίζουν την *in vivo* γονιδιακή θεραπεία, συμπεριλαμβανομένων των θεραπευτικών προσεγγίσεων της επεξεργασίας του γονιδιώματος. Οι φορείς AAV είναι επί του παρόντος το πιο αποτελεσματικό όχημα μεταφοράς γονιδίων (*in vivo*) και το μόνο όχημα παροχής που έχει εγκριθεί για την εισαγωγή θεραπειών επεξεργασίας γονιδιώματος με βάση το CRISPR, απευθείας στο



ανθρώπινο σώμα. Η κλινική δοκιμή AAV-CRISPR μπορεί να δείξει τα δυνατά και τα αδύνατα σημεία αυτής της προσέγγισης που στη συνέχεια μπορεί να συμβάλει στην περαιτέρω ανάπτυξη και βελτίωση του συστήματος. Τέτοιες βελτιώσεις αναμένεται να προέλθουν τόσο από τις προσπάθειες τροποποίησης των αντιδραστηρίων που βασίζονται στο CRISPR, ώστε να ταιριάζουν στα εγγενή χαρακτηριστικά των φορέων AAV, όσο και από τη συνεχιζόμενη έρευνα της βιολογίας και τεχνολογίας των φορέων AAV. Η συγχώνευση των ευρημάτων από αυτά τα δύο πεδία θα αποφέρει ένα ευρύτερο φάσμα από πλατφόρμες παροχής γονιδίων, που μπορούν να εξυπηρετήσουν καλύτερα τις αναδυόμενες μοριακές θεραπείες (Wang et al., 2020). Ο αδενο-σχετιζόμενος ιός (AAV) έχει αναδειχθεί ως ηγετική πλατφόρμα για τη διανομή γονιδίων για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, λόγω του άριστου προφίλ ασφάλειας και της αποτελεσματικής μεταγωγής που παρουσιάζει, σε διάφορους ιστούς στόχους. Ωστόσο, η μεγάλης κλίμακας παραγωγή και μακροχρόνια αποθήκευση ιικών φορέων δεν είναι αποτελεσματική με επακόλουθο να υπάρχουν χαμηλότερες αποδόσεις, μέτρια καθαρότητα και μικρότερη διάρκεια ζωής, σε σύγκριση με τα θεραπευτικά αποτελέσματα των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Srivastava et al., 2021).

Για την αποφυγή προβλημάτων από την ενσωμάτωση των φορέων εξετάζεται και η εναλλακτική λύση των επισωματικών φορέων οι οποίοι δεν ενσωματώνονται αλλά διαιρούνται ταυτόχρονα με το γονιδίωμα (Sgourou et al., 2009),

Η χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 είναι το ιδανικό εργαλείο του μέλλοντος για τη θεραπεία ασθενειών, διορθώνοντας μόνιμα επιβλαβείς μεταλλάξεις βάσης ή διαταραχές γονιδίων που προκαλούν ασθένειες, με μεγάλη ακρίβεια και αποτελεσματικότητα. Μια ποικιλία αποτελεσματικών παραλλαγών και παραγώγων της Cas9 έχουν αναπτυχθεί για να αντιμετωπίσουν τις περίπλοκες γονιδιωματικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια των ασθενειών. Σε αντίθεση με τα συστήματα νουκλεασών δακτύλων ZFN και νουκλεασών TALEN, τα οποία χρησιμοποιούν πρωτεΐνες για τη στόχευση των κλώνων του DNA, η τεχνολογία CRISPR κατευθύνει τις πρωτεΐνες Cas σε μια καθορισμένη θέση στο γονιδίωμα αλλάζοντας την αλληλουχία βάσης ενός μικρού τμήματος του οδηγού gRNA, βελτιώνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής επεξεργασίας και επεκτείνοντας την εφαρμογή της τεχνολογίας επεξεργασίας γονιδίων. Ωστόσο, οι στρατηγικές για την αποτελεσματική παροχή του συστήματος CRISPR σε

προβληματικά κύτταρα in vivo, που λείπουν επί του παρόντος και οι μη υκοί φορείς με λειτουργίες αναγνώρισης στόχων, μπορούν να αποτελέσουν το επίκεντρο της μελλοντικής έρευνας. Έτσι, οι παθολογικές και φυσιολογικές αλλαγές που προκύπτουν από την έναρξη της νόσου αναμένεται να χρησιμεύσουν ως παράγοντες αναγνώρισης για στοχευμένη παράδοση ή τον στόχο για γονιδιακή επεξεργασία. Οι ασθένειες είναι ποικίλες και πολύπλοκες, επομένως η επιλογή των κατάλληλων μεθόδων γονιδιακής επεξεργασίας και των φορέων παροχής ανάλογα με την ασθένεια, είναι ιδιαίτερα σημαντική (Li et al., 2023).

Με τα σημερινά δεδομένα, το οικονομικό κόστος των γονιδιακών θεραπειών είναι πολύ υψηλό. Έτσι, καθώς το Casgevy και το Lyfgenia συγκαταλέγονται πλέον σε μερικές από τις πιο ακριβές θεραπείες στην αγορά, έχουν προκύψει ερωτήματα σχετικά με το πώς αυτές οι υψηλές τιμές μπορεί να δημιουργήσουν εμπόδια πρόσβασης στους ασθενείς, καθώς στο χώρο της υγείας υπάρχουν ασθένειες που μέχρι σήμερα έχουν περιορισμένες επιλογές θεραπείας. Οι μελλοντικές εγκρίσεις χορήγησης και η βελτιστοποίηση των θεραπειών που θα ακολουθήσει, μπορεί να καθορίζονται όχι μόνο από το πού μπορεί να επιτευχθεί ευελιξία τιμολόγησης, αλλά μπορούν να διευθετηθούν και μέσω επιμερισμού συμφωνιών κινδύνου, καθώς επίσης και από τη διαθεσιμότητα υποδομών που επιτρέπει την κυκλοφορία αυτών των φαρμακευτικών προϊόντων (Watt, 2024).

Πέρα από το οικονομικό κόστος, αυτές οι θεραπείες προσφέρουν σημαντικές δυνατότητες για να μεταμορφώσουν την ιατρική, αλλά εισάγουν ουσιαστικά ηθικά ζητήματα, ιδιαίτερα σχετικά με την επεξεργασία της ανθρώπινης γεννητικής σειράς των βλαστοκυττάρων, η οποία θα μεταβιβάσει αλλαγές στις μελλοντικές γενιές. Οι ερευνητές και οι ειδικοί της βιοηθικής συμφωνούν ότι η επεξεργασία βλαστικών σειρών για αναπαραγωγικούς σκοπούς θα πρέπει να αναβληθεί, έως ότου περαιτέρω έρευνα επιβεβαιώσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά της. Το υψηλό κόστος θεραπειών όπως στο Casgevy και στο Lyfgenia εγείρουν ανησυχίες για την κοινωνική ισότητα και δικαιοσύνη, απαιτώντας ισχυρούς ηθικούς και νομικούς κανονισμούς. Τα βασικά ζητήματα ασφάλειας, συμπεριλαμβανομένων των κινδύνων του μωσαϊκισμού και των επιπτώσεων εκτός στόχου, απαιτούν λεπτομερή εξέταση, με έμφαση στις μακροπρόθεσμες μελέτες ασφάλειας και αποτελεσματικότητας και στην αξιολόγηση συνδυαστικών θεραπειών για ασθένειες όπως η SCD. Η αντιμετώπιση αυτών των ηθικών προκλήσεων απαιτεί συνεχή διεπιστημονική συνεργασία, ηθική επίβλεψη και

δημιουργία πολιτικών για τη διασφάλιση υπεύθυνης έρευνας και εφαρμογής (Rahmat et al., 2024).

Υπάρχουν επί του παρόντος περίπου 2600 κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας παγκοσμίως και τέσσερα εγκεκριμένα προϊόντα γονιδιακής θεραπείας από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), διαθέσιμα στις Η.Π.Α. Η γονιδιακή θεραπεία και ο χειρισμός τους διαφέρουν από άλλα φάρμακα. Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη καθοδήγησης από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NHI), το FDA, τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και τις επαγγελματικές ενώσεις, σχετικά με τη φαρμακευτική τους εφαρμογή. Ελλείψει καθορισμένης καθοδήγησης, τα μεμονωμένα ιδρύματα αναπτύσσουν τις δικές τους πολιτικές και διαδικασίες, οι οποίες συχνά μπορεί να διαφέρουν και να είναι ξεπερασμένες. Για την επίλυση αυτών των προβλημάτων, οι υπεύθυνοι δημιουργίας αυτών των φαρμάκων διαδραματίζουν βασικό ρόλο στον σωστό χειρισμό και τη γενική διαχείριση των θεραπειών γονιδιακής υποκατάστασης, στον εντοπισμό του επιπέδου κινδύνου, στη δημιουργία υποδομών και στην ανάπτυξη κατάλληλων πολιτικών και πρωτοκόλλων, ιδιαίτερα ελλείψει συναινετικών κατευθυντήριων γραμμών για τον χειρισμό και τη μεταφορά θεραπειών γονιδιακής υποκατάστασης (Petrich et al., 2020).

Τα άτομα με SCD συνήθως επιβαρύνονται με υψηλό κόστος υγειονομικής περίθαλψης, με την περίθαλψη σε νοσοκομεία να κατέχει το μεγαλύτερο μερίδιο (Shah et al., 2019). Η συνολική οικονομική επιβάρυνση της ενδονοσοκομειακής περίθαλψης για άτομα με SCD στις Ηνωμένες Πολιτείες ήταν 811 εκατομμύρια \$ μόνο το 2016. Το σχετικό ιατρικό κόστος καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των ατόμων με SCD υπολογίστηκε σε 1,2 εκατομμύρια δολάρια (έτος 2020). Αυτή η εκτίμηση παρ' όλο που προέρχεται από μελέτη σχεδόν 20 ετών, από το πρόγραμμα Medicaid μιας πολιτείας, ωστόσο χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθορισμό του βασικού κόστους της ιατρικής περίθαλψης για τη SCD (DeMartino et al., 2021). Άλλες μελέτες για το βάρος του ιατρικού κόστους περιορίζονται σε περιγραφικές περιλήψεις και καμία δεν παρέχει σαφείς εκτιμήσεις του πρόσθετου ιατρικού κόστους ζωής, που καταβάλλουν οι ασφαλιστές υγείας και κυρίως η επιβάρυνση από δαπάνη του προσωπικού εισοδήματος, που πληρώνουν τα άτομα με SCD συγκρινόμενα με τα άτομα χωρίς την ασθένεια ή διαταραχές του αίματος (Johnson et al., 2023; Shah et al., 2019).

Η κατανόηση της οικονομικής επιβάρυνσης στη SCD για τους ασφαλιστές υγείας και τους ασθενείς, είναι πολύ σημαντική αυτή τη στιγμή. Μια σειρά από πολύ δαπανηρές αλλά δυνητικά αποτελεσματικές θεραπείες για τη SCD φαίνονται στο προσκήνιο. Με περισσότερες από 10 γονιδιακές θεραπείες επί του παρόντος στο στάδιο κλινικών δοκιμών, αυτές οι θεραπείες έχουν τη δυνατότητα να φέρουν επανάσταση στη φροντίδα και οριστική θεραπεία στη SCD. Ωστόσο, με αναμενόμενες τιμές σχεδόν 2 εκατομμυρίων δολαρίων, ζητήματα προσιτότητας και πρόσβασης θα αποτελέσουν σημεία διαμάχης μεταξύ ασθενών, φορέων που πληρώνουν και των υπευθύνων χάραξης πολιτικής (DeMartino et al., 2021; Johnson et al., 2023).

Τα τελευταία χρόνια η τεχνολογία της μεταφοράς γενετικού υλικού έχει βελτιωθεί σημαντικά και αυτό οδηγεί στο να βελτιωθούν περαιτέρω οι τεχνολογίες της γονιδιακής επιδιόρθωσης, με αποτέλεσμα τη θεραπεία των κληρονομικών αναμιγών. Ωστόσο, αν και το κόστος σήμερα είναι πολύ υψηλό, έχοντας ως προϋπόθεση την μακροχρόνια ασφάλεια αυτών των φαρμάκων, οι γονιδιακές θεραπείες θα πρέπει να χρηματοδοτηθούν από τα ασφαλιστικά ταμεία, αφού τα τελευταία χρόνια το κόστος παραγωγής των προϊόντων γονιδιακής θεραπείας γίνεται πιο εξορθολογισμένο και πιο αποτελεσματικό. Πλέον, στο χώρο αυτού του τύπου θεραπείας μπαίνουν και νέες εταιρίες, οπότε υπάρχει ανταγωνισμός. Αυτό αποτελεί σημαντικό παράγοντα που θα μπορούσε να συμβάλει στη μείωση των τιμών της γονιδιακής θεραπείας. Όμως, πέρα απ' όλα αυτά, η εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας θα πρέπει να γίνει διαθέσιμη στο γενικό σύνολο που πληροί τις προϋποθέσεις και μπορεί να την δεχθεί, αφού, με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, οι γονιδιακές θεραπείες μπορούν να σώσουν ανθρώπινες ζωές και να βελτιώσουν την ποιότητα της ζωής των ανθρώπων που υποφέρουν από κληρονομικές και ανίατες ασθένειες.

## Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Acquaye, C., Blanchette-Mackie, E. J., Reindorf, C., Edelstein, S., & Schechter, A. N. (1988). Electron microscopic studies of the intracellular polymerization of sickle hemoglobin. *Blood cells*, 13(3), 359–376.
- Aljurf, M., Ma, L., Angelucci, E., Lucarelli, G., Snyder, L. M., Kiefer, C. R., Yuan, J., & Schrier, S. L. (1996). Abnormal assembly of membrane proteins in erythroid progenitors of patients with beta-thalassemia major. *Blood*, 87(5), 2049–2056.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513(7519), 569–573.  
<https://doi.org/10.1038/nature13579>
- Anderson, G. J., & Frazer, D. M. (2017). Current understanding of iron homeostasis. *The American journal of clinical nutrition*, 106(Suppl 6), 1559S–1566S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155804>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Anguela, X. M., & High, K. A. (2019). Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annual review of medicine*, 70, 273–288.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>
- Aiuti, A., Slavin, S., Aker, M., Ficara, F., Deola, S., Mortellaro, A., Morecki, S., Andolfi, G., Tabucchi, A., Carlucci, F., Marinello, E., Cattaneo, F., Vai, S., Servida, P., Miniero, R., Roncarolo, M. G., & Bordignon, C. (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5577), 2410–2413.  
<https://doi.org/10.1126/science.1070104>
- Aiuti, A., Cattaneo, F., Galimberti, S., Benninghoff, U., Cassani, B., Callegaro, L., Scaramuzza, S., Andolfi, G., Mirolo, M., Brigida, I., Tabucchi, A., Carlucci, F.,

- Eibl, M., Aker, M., Slavin, S., Al-Mousa, H., Al Ghonaïum, A., Ferster, A., Duppenthaler, A., Notarangelo, L., ... Roncarolo, M. G. (2009). Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *The New England journal of medicine*, 360(5), 447–458.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805817>
- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M. P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M. C., Bosticardo, M., Evangelio, C., Assanelli, A., Casiraghi, M., Di Nunzio, S., Callegaro, L., Benati, C., Rizzardi, P., Pellin, D., Di Serio, C., ... Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6148), 1233151.  
<https://doi.org/10.1126/science.1233151>
- 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 molecular medicine*, 9(6), 737–740.  
<https://doi.org/10.15252/emmm.201707573>
- Anurogo, D., Yuli Prasetyo Budi, N., Thi Ngo, M. H., Huang, Y. H., & Pawitan, J. A. (2021). Cell and Gene Therapy for Anemia: Hematopoietic Stem Cells and Gene Editing. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6275.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22126275>
- Ataga, K. I., Kutlar, A., Kanter, J., Liles, D., Cancado, R., Friedrisch, J., Guthrie, T. H., Knight-Madden, J., Alvarez, O. A., Gordeuk, V. R., Gualandro, S., Colella, M. P., Smith, W. R., Rollins, S. A., Stocker, J. W., & Rother, R. P. (2017). Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. *The New England journal of medicine*, 376(5), 429–439.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611770>
- Bainbridge, J. W., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G. E., Stockman, A., Tyler, N., Petersen-Jones, S., Bhattacharya, S. S., Thrasher, A. J., Fitzke, F. W., Carter, B. J., Rubin, G. S., Moore, A. T., & Ali, R. R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in



- Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*, 358(21), 2231–2239. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802268>
- Bauer, D. E., Kamran, S. C., Lessard, S., Xu, J., Fujiwara, Y., Lin, C., Shao, Z., Canver, M. C., Smith, E. C., Pinello, L., Sabo, P. J., Vierstra, J., Voit, R. A., Yuan, G. C., Porteus, M. H., Stamatoyannopoulos, J. A., Lettre, G., & Orkin, S. H. (2013). An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science (New York, N.Y.)*, 342(6155), 253–257. <https://doi.org/10.1126/science.1242088>
- Bauer, D. E., & Orkin, S. H. (2015). Hemoglobin switching's surprise: the versatile transcription factor BCL11A is a master repressor of fetal hemoglobin. *Current opinion in genetics & development*, 33, 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.08.001>
- Basu, A., Winn, A. N., Johnson, K. M., Jiao, B., Devine, B., Hankins, J. S., Arnold, S. D., Bender, M. A., & Ramsey, S. D. (2024). Gene Therapy Versus Common Care for Eligible Individuals With Sickle Cell Disease in the United States : A Cost-Effectiveness Analysis. *Annals of internal medicine*, 177(2), 155–164. <https://doi.org/10.7326/M23-1520>
- Benz E. J., Jr (2023). Introduction to the Thalassemia Syndromes: Molecular Medicine's Index Case. *Hematology/oncology clinics of North America*, 37(2), 245–259. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2022.11.001>
- Biffi, A., Montini, E., Lorioli, L., Cesani, M., Fumagalli, F., Plati, T., Baldoli, C., Martino, S., Calabria, A., Canale, S., Benedicenti, F., Vallanti, G., Biasco, L., Leo, S., Kabbara, N., Zanetti, G., Rizzo, W. B., Mehta, N. A., Cicalese, M. P., Casiraghi, M., ... Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6148), 1233158. <https://doi.org/10.1126/science.1233158>
- Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., Greenblatt, J. J., Rosenberg, S. A., Klein, H., Berger, M., Mullen, C. A., Ramsey, W. J., Muul, L., Morgan, R. A., & Anderson, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5235), 475–480. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>

- Blanco, E., Izotova, N., Booth, C., & Thrasher, A. J. (2020). Immune Reconstitution After Gene Therapy Approaches in Patients With X-Linked Severe Combined Immunodeficiency Disease. *Frontiers in immunology*, *11*, 608653. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608653>
- Boulad, F., Mansilla-Soto, J., Cabriolu, A., Rivière, I., & Sadelain, M. (2018). Gene Therapy and Genome Editing. *Hematology/oncology clinics of North America*, *32*(2), 329–342. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.11.007>
- Boztug, K., Schmidt, M., Schwarzer, A., Banerjee, P. P., Díez, I. A., Dewey, R. A., Böhm, M., Nowrouzi, A., Ball, C. R., Glimm, H., Naundorf, S., Kuhlcke, K., Blasczyk, R., Kondratenko, I., Maródi, L., Orange, J. S., von Kalle, C., & Klein, C. (2010). Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *The New England journal of medicine*, *363*(20), 1918–1927. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003548>
- Brendel, C., Guda, S., Renella, R., Bauer, D. E., Canver, M. C., Kim, Y. J., Heeney, M. M., Klatt, D., Fogel, J., Milsom, M. D., Orkin, S. H., Gregory, R. I., & Williams, D. A. (2016). Lineage-specific BCL11A knockdown circumvents toxicities and reverses sickle phenotype. *The Journal of clinical investigation*, *126*(10), 3868–3878. <https://doi.org/10.1172/JCI87885>
- Brendel, C., Negre, O., Rothe, M., Guda, S., Parsons, G., Harris, C., McGuinness, M., Abriss, D., Tsytsykova, A., Klatt, D., Bentler, M., Pellin, D., Christiansen, L., Schambach, A., Manis, J., Trebeden-Negre, H., Bonner, M., Esrick, E., Veres, G., Armant, M., ... Williams, D. A. (2020). Preclinical Evaluation of a Novel Lentiviral Vector Driving Lineage-Specific BCL11A Knockdown for Sickle Cell Gene Therapy. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, *17*, 589–600. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.03.015>
- Bryant, L. M., Christopher, D. M., Giles, A. R., Hinderer, C., Rodriguez, J. L., Smith, J. B., Traxler, E. A., Tycko, J., Wojno, A. P., & Wilson, J. M. (2013). Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. *Human gene therapy. Clinical development*, *24*(2), 55–64. <https://doi.org/10.1089/humc.2013.087>

- Bortolussi, G., Zentillin, L., Vaníková, J., Bockor, L., Bellarosa, C., Mancarella, A., Vianello, E., Tiribelli, C., Giacca, M., Vitek, L., & Muro, A. F. (2014). Life-long correction of hyperbilirubinemia with a neonatal liver-specific AAV-mediated gene transfer in a lethal mouse model of Crigler-Najjar Syndrome. *Human gene therapy*, 25(9), 844–855. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.233>
- Bot, J. F., van der Oost, J., & Geijssen, N. (2022). The double life of CRISPR-Cas13. *Current opinion in biotechnology*, 78, 102789. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102789>
- Burnett, J. C., Zaia, J. A., & Rossi, J. J. (2012). Creating genetic resistance to HIV. *Current opinion in immunology*, 24(5), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.08.013>
- Bushman F. D. (2020). Retroviral Insertional Mutagenesis in Humans: Evidence for Four Genetic Mechanisms Promoting Expansion of Cell Clones. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 28(2), 352–356. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.12.009>
- Byrne, B. J., Falk, D. J., Clément, N., & Mah, C. S. (2012). Gene therapy approaches for lysosomal storage disease: next-generation treatment. *Human gene therapy*, 23(8), 808–815. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.140>
- Calado, R. T., & Clé, D. V. (2017). Treatment of inherited bone marrow failure syndromes beyond transplantation. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2017(1), 96–101. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.96>
- Candotti, F., Shaw, K. L., Muul, L., Carbonaro, D., Sokolic, R., Choi, C., Schurman, S. H., Garabedian, E., Kesserwan, C., Jagadeesh, G. J., Fu, P. Y., Gschwend, E., Cooper, A., Tisdale, J. F., Weinberg, K. I., Crooks, G. M., Kapoor, N., Shah, A., Abdel-Azim, H., Yu, X. J., ... Kohn, D. B. (2012). Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood*, 120(18), 3635–3646. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-400937>

- Canver, M. C., Smith, E. C., Sher, F., Pinello, L., Sanjana, N. E., Shalem, O., Chen, D. D., Schupp, P. G., Vinjamur, D. S., Garcia, S. P., Luc, S., Kurita, R., Nakamura, Y., Fujiwara, Y., Maeda, T., Yuan, G. C., Zhang, F., Orkin, S. H., & Bauer, D. E. (2015). BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. *Nature*, 527(7577), 192–197.  
<https://doi.org/10.1038/nature15521>
- Canver, M. C., & Orkin, S. H. (2016). Customizing the genome as therapy for the  $\beta$ -hemoglobinopathies. *Blood*, 127(21), 2536–2545.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-678128>
- Cappellini, M. D., Viprakasit, V., Taher, A. T., Georgiev, P., Kuo, K. H. M., Coates, T., Voskaridou, E., Liew, H. K., Pazgal-Kobrowski, I., Forni, G. L., Perrotta, S., Khelif, A., Lal, A., Kattamis, A., Vlachaki, E., Origa, R., Aydinok, Y., Bejaoui, M., Ho, P. J., Chew, L. P., ... BELIEVE Investigators (2020). A Phase 3 Trial of Luspatercept in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. *The New England journal of medicine*, 382(13), 1219–1231.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910182>
- Cattoglio, C., Pellin, D., Rizzi, E., Maruggi, G., Corti, G., Miselli, F., Sartori, D., Guffanti, A., Di Serio, C., Ambrosi, A., De Bellis, G., & Mavilio, F. (2010). High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood*, 116(25), 5507–5517. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-283523>
- Cao, A., & Galanello, R. (2010). Beta-thalassemia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 12(2), 61–76.  
<https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e3181cd68ed>
- Capotondo, A., Milazzo, R., Politi, L. S., Quattrini, A., Palini, A., Plati, T., Merella, S., Nonis, A., di Serio, C., Montini, E., Naldini, L., & Biffi, A. (2012). Brain conditioning is instrumental for successful microglia reconstitution following hematopoietic stem cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), 15018–15023.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1205858109>

- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., Mahlaoui, N., Kiermer, V., Mittelstaedt, D., Bellesme, C., Lahlou, N., Lefrère, F., Blanche, S., Audit, M., Payen, E., Leboulch, P., ... Aubourg, P. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5954), 818–823. <https://doi.org/10.1126/science.1171242>
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., & Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), 669–672. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.669>
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., Cavallese, R., Gillet-Legrand, B., Caccavelli, L., Sgarra, R., Maouche-Chrétien, L., Bernaudin, F., Girot, R., Dorazio, R., Mulder, G. J., Polack, A., ... Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia. *Nature*, 467(7313), 318–322. <https://doi.org/10.1038/nature09328>
- Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., & Aiuti, A. (2012). Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 1. *Current opinion in immunology*, 24(5), 580–584. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.08.008>
- Cavazzana, M., Bushman, F. D., Miccio, A., André-Schmutz, I., & Six, E. (2019). Gene therapy targeting haematopoietic stem cells for inherited diseases: progress and challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 18(6), 447–462. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0020-9>
- Centis, F., Tabellini, L., Lucarelli, G., Buffi, O., Tonucci, P., Persini, B., Annibaldi, M., Emiliani, R., Iliescu, A., Rapa, S., Rossi, R., Ma, L., Angelucci, E., & Schrier, S. L. (2000). The importance of erythroid expansion in determining the extent of apoptosis in erythroid precursors in patients with beta-thalassemia major. *Blood*, 96(10), 3624–3629.

- Chambers, K., Ashraf, M. A., & Sharma, S. (2023). Physiology, Hepcidin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Chan, Y. K., Wang, S. K., Chu, C. J., Copland, D. A., Letizia, A. J., Costa Verdera, H., Chiang, J. J., Sethi, M., Wang, M. K., Neidermyer, W. J., Jr, Chan, Y., Lim, E. T., Graveline, A. R., Sanchez, M., Boyd, R. F., Vihtelic, T. S., Inciong, R. G. C. O., Slain, J. M., Alphonse, P. J., Xue, Y., ... Church, G. M. (2021). Engineering adeno-associated viral vectors to evade innate immune and inflammatory responses. *Science translational medicine*, 13(580), eabd3438. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd3438>
- Chang, C. J., Mitra, K., Koya, M., Velho, M., Desprat, R., Lenz, J., & Bouhassira, E. E. (2011). Production of embryonic and fetal-like red blood cells from human induced pluripotent stem cells. *PloS one*, 6(10), e25761. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025761>
- Chang, C. J., & Bouhassira, E. E. (2012). Zinc-finger nuclease-mediated correction of  $\alpha$ -thalassemia in iPS cells. *Blood*, 120(19), 3906–3914. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-420703>
- Chaparro, C. M., & Suchdev, P. S. (2019). Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1450(1), 15–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.14092>
- Charrier, S., Dupré, L., Scaramuzza, S., Jeanson-Leh, L., Blundell, M. P., Danos, O., Cattaneo, F., Aiuti, A., Eckenberg, R., Thrasher, A. J., Roncarolo, M. G., & Galy, A. (2007). Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients. *Gene therapy*, 14(5), 415–428. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302863>
- Chen, H. C., Martinez, J. P., Zorita, E., Meyerhans, A., & Filion, G. J. (2017). Position effects influence HIV latency reversal. *Nature structural & molecular biology*, 24(1), 47–54. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3328>
- Chen, W., Hu, Y., & Ju, D. (2020). Gene therapy for neurodegenerative disorders: advances, insights and prospects. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 10(8), 1347–1359. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.01.015>



- Chen, P. J., Hussmann, J. A., Yan, J., Knipping, F., Ravisankar, P., Chen, P. F., Chen, C., Nelson, J. W., Newby, G. A., Sahin, M., Osborn, M. J., Weissman, J. S., Adamson, B., & Liu, D. R. (2021). Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*, 184(22), 5635–5652.e29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.018>
- Christakopoulos, G. E., Telange, R., Yen, J., & Weiss, M. J. (2023). Gene Therapy and Gene Editing for  $\beta$ -Thalassemia. *Hematology/oncology clinics of North America*, 37(2), 433–447. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2022.12.012>
- Colella, P., Ronzitti, G., & Mingozzi, F. (2017). Emerging Issues in AAV-Mediated *In Vivo* Gene Therapy. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 8, 87–104. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.11.007>
- Cox, D. B., Platt, R. J., & Zhang, F. (2015). Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature medicine*, 21(2), 121–131. <https://doi.org/10.1038/nm.3793>
- Deichmann A, Brugman MH, Bartholomae CC, Schwarzwaelder K, Verstegen MM, Howe SJ, Arens A, Ott MG, Hoelzer D, Seger R (2011) Insertion sites in engrafted cells cluster within a limited repertoire of genomic areas after gammaretroviral vector gene therapy. *Mol Ther* 19: 2031-2039
- Derse D, Crise B, Li Y, Princler G, Lum N, Stewart C, McGrath CF, Hughes SH, Munroe DJ, Wu X (2007) Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J Virol* 81: 6731-6741
- Dunbar, C. E., High, K. A., Joung, J. K., Kohn, D. B., Ozawa, K., & Sadelain, M. (2018). Gene therapy comes of age. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6372), eaan4672. <https://doi.org/10.1126/science.aan4672>
- Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., & Dick, J. E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell stem cell*, 10(2), 120–136. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>
- Eapen, M., Brazauskas, R., Walters, M. C., Bernaudin, F., Bo-Subait, K., Fitzhugh, C. D., Hankins, J. S., Kanter, J., Meerpohl, J. J., Bolaños-Meade, J., Panepinto, J. A., Rondelli, D., Shenoy, S., Williamson, J., Woolford, T. L., Gluckman, E., Wagner, J. E., & Tisdale, J. F. (2019). Effect of donor type and conditioning

regimen intensity on allogeneic transplantation outcomes in patients with sickle cell disease: a retrospective multicentre, cohort study. *The Lancet. Haematology*, 6(11), e585–e596.

[https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30154-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30154-1)

Ehrhardt, A., Xu, H., & Kay, M. A. (2003). Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo. *Journal of virology*, 77(13), 7689–7695. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.13.7689-7695.2003>

Elsner, M., Terbish, T., Jörns, A., Naujok, O., Wedekind, D., Hedrich, H. J., & Lenzen, S. (2012). Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(5), 918–926. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.8>

Engert, A., Balduini, C., Brand, A., Coiffier, B., Cordonnier, C., Döhner, H., de Wit, T. D., Eichinger, S., Fibbe, W., Green, T., de Haas, F., Iolascon, A., Jaffredo, T., Rodeghiero, F., Salles, G., Schuringa, J. J., & EHA Roadmap for European Hematology Research (2016). The European Hematology Association Roadmap for European Hematology Research: a consensus document. *Haematologica*, 101(2), 115–208. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.136739>

Esrick, E. B., Lehmann, L. E., Biffi, A., Achebe, M., Brendel, C., Ciuculescu, M. F., ... & Williams, D. A. (2021). Post-transcriptional genetic silencing of BCL11A to treat sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 384(3), 205–215.

Felice B, Cattoglio C, Cittaro D, Testa A, Miccio A, Ferrari G, Luzi L, Recchia A, Mavilio F (2009) Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome. *PLoS ONE* 4: e4571

Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., & Cavazzana-Calvo, M. (2013). Gene therapy of primary T cell immunodeficiencies. *Gene*, 525(2), 170–173. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.092>

Frangoul, H., Bobruff, Y., Cappellini, M. D., Corbacioglu, S., Fernandez, C. M., de la Fuente, J., ... Wall, D. (2020). Safety and efficacy of CTX001 in patients with transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia and sickle cell disease: Early results from

the climb THAL-111 and climb SCD-121 studies of autologous CRISPR-CAS9-modified CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 136 (Supplement 1), 3–4. doi:10.1182/blood-2020-139575

Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y. S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kernysky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., de Montalembert, M., Rondelli, D., Sharma, A., ... Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. *The New England journal of medicine*, 384(3), 252–260. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031054>

Frangoul, H., Locatelli, F., Sharma, A., Bhatia, M., Mapara, M., Molinari, L., Wall, D., Liem, R. I., Telfer, P., Shah, A. J., Cavazzana, M., Corbacioglu, S., Rondelli, D., Meisel, R., Dedeken, L., Lobitz, S., de Montalembert, M., Steinberg, M. H., Walters, M. C., Eckrich, M. J., ... CLIMB SCD-121 Study Group (2024). Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease. *The New England journal of medicine*, 390(18), 1649–1662. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2309676>

Φωτοπούλου Α. (2024). 39χρονος Θαλασσαιμικός Απαλλάχθηκε από Μεταγγίσεις με Γονιδιακή Θεραπεία. *Αθηναϊκό-Μακεδονικό Πρακτορείο Ειδήσεων (ΑΠΕ-ΜΠΕ)* <https://www.amna.gr/health/article/813279/39chronos-thalassaimikos-apallachthike-apo-metaggiseis-me-gonidiaki-therapeia>

Gathmann B, Grimbacher B, Beauté J, Dudoit Y, Mahlaoui N, Fischer A, Knerr V, Kindle G. (2009). The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2006–2008. *Clin Exp Immunol* 157: 3-11

Gaspar H. B. (2012). Gene therapy for ADA-SCID: defining the factors for successful outcome. *Blood*, 120(18), 3628–3629. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-446559>

Gaspar, H. B., Swift, S., & Thrasher, A. J. (2013). "Special exemptions": should they be put on trial?. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(2), 261–262. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.1>

- Gluckman, E., Cappelli, B., Bernaudin, F., Labopin, M., Volt, F., Carreras, J., Pinto Simões, B., Ferster, A., Dupont, S., de la Fuente, J., Dalle, J. H., Zecca, M., Walters, M. C., Krishnamurti, L., Bhatia, M., Leung, K., Yanik, G., Kurtzberg, J., Dhedin, N., Kuentz, M., ... Eurocord, the Pediatric Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, and the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (2017). Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 129(11), 1548–1556. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-745711>
- Gonçalves, G. A. R., & Paiva, R. M. A. (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 15(3), 369–375. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024>
- Grossman, M., Raper, S. E., Kozarsky, K., Stein, E. A., Engelhardt, J. F., Muller, D., Lupien, P. J., & Wilson, J. M. (1994). Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nature genetics*, 6(4), 335–341. <https://doi.org/10.1038/ng0494-335>
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J. P., Thrasher, A. J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., Fischer, A., Davies, E. G., Kuis, W., Leiva, L., & Cavazzana-Calvo, M. (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *The New England journal of medicine*, 346(16), 1185–1193. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012616>
- Hacein-Bey-Abina, S., Blondeau, J., Caccavelli, L., Charrier, S., Picard, C., Dal-Cortivo, L., ... & Cavazzana-Calvo, M. (2013, June). Lentiviral Vector-Based Gene Therapy for Wiskott-Aldrich Syndrome: Preliminary Results from the French Center. In *Molecular therapy* (Vol. 21, pp. S117-S118). NATURE PUBLISHING GROUP.
- Hanna, J. H., Saha, K., & Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, 143(4), 508–525. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008>

- Harteveld, C. L., & Higgs, D. R. (2010). Alpha-thalassaemia. *Orphanet journal of rare diseases*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-13>
- Harteveld, C. L., Achour, A., Arkesteijn, S. J. G., Ter Huurne, J., Verschuren, M., Bhagwandien-Bisoen, S., Schaap, R., Vijfhuizen, L., El Idrissi, H., & Koopmann, T. T. (2022). The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics. *International journal of laboratory hematology*, 44 Suppl 1(Suppl 1), 28–36. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13885>
- Hauswirth, W. W., Aleman, T. S., Kaushal, S., Cideciyan, A. V., Schwartz, S. B., Wang, L., Conlon, T. J., Boye, S. L., Flotte, T. R., Byrne, B. J., & Jacobson, S. G. (2008). Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Human gene therapy*, 19(10), 979–990. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.107>
- Herring, W. L., Gallagher, M. E., Shah, N., Morse, K. C., Mladsi, D., Dong, O. M., Chawla, A., Leiding, J. W., Zhang, L., Paramore, C., & Andemariam, B. (2024). Cost-Effectiveness of Lovotibeglogene Autotemcel (Lovo-Cel) Gene Therapy for Patients with Sickle Cell Disease and Recurrent Vaso-Occlusive Events in the United States. *Pharmacoeconomics*, 42(6), 693–714. <https://doi.org/10.1007/s40273-024-01385-9>
- Hönig, M., Albert, M. H., Schulz, A., Sparber-Sauer, M., Schütz, C., Belohradsky, B., Güngör, T., Rojewski, M. T., Bode, H., Pannicke, U., Lippold, D., Schwarz, K., Debatin, K. M., Hershfield, M. S., & Friedrich, W. (2007). Patients with adenosine deaminase deficiency surviving after hematopoietic stem cell transplantation are at high risk of CNS complications. *Blood*, 109(8), 3595–3602. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-034678>
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKolver, R. C., Katibah, G. E., Amora, R., Boydston, E. A., Zeitler, B., Meng, X., Miller, J. C., Zhang, L., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D., & Jaenisch, R. (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*, 27(9), 851–857. <https://doi.org/10.1038/nbt.1562>

- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Ingram V. M. (1956). A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*, 178(4537), 792–794.  
<https://doi.org/10.1038/178792a0>
- Iolascon, A., Andolfo, I., & Russo, R. (2020). Congenital dyserythropoietic anemias. *Blood*, 136(11), 1274–1283.  
<https://doi.org/10.1182/blood.2019000948>
- Irion, S., Luche, H., Gadue, P., Fehling, H. J., Kennedy, M., & Keller, G. (2007). Identification and targeting of the ROSA26 locus in human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 25(12), 1477–1482.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1362>
- Jamal, M., Ullah, A., Ahsan, M., Tyagi, R., Habib, Z., Khan, F. A., & Rehman, K. (2018). Treating Genetic Disorders Using State-Of-The-Art Technology. *Current issues in molecular biology*, 26, 33–46.  
<https://doi.org/10.21775/cimb.026.033>
- Jessup, M., Greenberg, B., Mancini, D., Cappola, T., Pauly, D. F., Jaski, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K. M., Dittrich, H., Hajjar, R. J. (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID) Investigators (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation*, 124(3), 304–313.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.022889>
- Johnson, K. M., Jiao, B., Ramsey, S. D., Bender, M. A., Devine, B., & Basu, A. (2023). Lifetime medical costs attributable to sickle cell disease among nonelderly individuals with commercial insurance. *Blood advances*, 7(3), 365–374.  
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021006281>
- Kalos, M., Levine, B. L., Porter, D. L., Katz, S., Grupp, S. A., Bagg, A., & June, C. H. (2011). T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects



and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Science translational medicine*, 3(95), 95ra73.

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002842>

Kan, Y. W., Schwartz, E., & Nathan, D. G. (1969). Globin chain synthesis in the alpha thalassemia syndromes. *The Journal of clinical investigation*, 47(11), 2512–2522. <https://doi.org/10.1172/JCI105933>

Kan, Y. W., & Nathan, D. G. (1970). Mild thalassemia: the result of interactions of alpha and beta thalassemia genes. *The Journal of clinical investigation*, 49(4), 635–642. <https://doi.org/10.1172/JCI106274>

Kanter, J., Thompson, A. A., Pierciey, F. J., Jr, Hsieh, M., Uchida, N., Leboulch, P., Schmidt, M., Bonner, M., Guo, R., Miller, A., Ribeil, J. A., Davidson, D., Asmal, M., Walters, M. C., & Tisdale, J. F. (2023). Lovo-cel gene therapy for sickle cell disease: Treatment process evolution and outcomes in the initial groups of the HGB-206 study. *American journal of hematology*, 98(1), 11–22. <https://doi.org/10.1002/ajh.26741>

Kaplitt, M. G., Feigin, A., Tang, C., Fitzsimons, H. L., Mattis, P., Lawlor, P. A., Bland, R. J., Young, D., Strybing, K., Eidelberg, D., & During, M. J. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet (London, England)*, 369(9579), 2097–2105. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60982-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60982-9)

Kastelein, J. J., Ross, C. J., & Hayden, M. R. (2013). From mutation identification to therapy: discovery and origins of the first approved gene therapy in the Western world. *Human gene therapy*, 24(5), 472–478. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.063>

Kaufmann, K. B., Büning, H., Galy, A., Schambach, A., & Grez, M. (2013). Gene therapy on the move. *EMBO molecular medicine*, 5(11), 1642–1661. <https://doi.org/10.1002/emmm.201202287>

Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., Tai, S. J., Herzog, R. W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W., & High, K. A. (2000). Evidence for

gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature genetics*, 24(3), 257–261.

<https://doi.org/10.1038/73464>

Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Topkar, V. V., Zheng, Z., & Joung, J. K. (2015). Broadening the targeting range of *Staphylococcus aureus* CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition. *Nature biotechnology*, 33(12), 1293–1298. <https://doi.org/10.1038/nbt.3404>

Larena, M., Regner, M., & Lobigs, M. (2012). The chemokine receptor CCR5, a therapeutic target for HIV/AIDS antagonists, is critical for recovery in a mouse model of Japanese encephalitis. *PloS one*, 7(9), e44834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044834>

Laube B. L. (2015). Aerosolized Medications for Gene and Peptide Therapy. *Respiratory care*, 60(6), 806–824. <https://doi.org/10.4187/respcare.03554>

Lee, G. K., Zeidan, J., Lalezari, J., Mitsuyasu, R., Wang, S., Giedlin, M., ... & Sekaly, R. P. (2013, June). Long term CD4 reconstitution in HIV subjects receiving ZFN CCR5 modified CD4 T-cells (SB-728-T) may be attributed to the sustained durability of the central memory T-cell subset. In *MOLECULAR THERAPY* (Vol. 21, pp. S24-S24). 75 VARICK ST, 9TH FLR, NEW YORK, NY 10013-1917 USA: NATURE PUBLISHING GROUP.

Leone, P., Shera, D., McPhee, S. W., Francis, J. S., Kolodny, E. H., Bilaniuk, L. T., Wang, D. J., Assadi, M., Goldfarb, O., Goldman, H. W., Freese, A., Young, D., During, M. J., Samulski, R. J., & Janson, C. G. (2012). Long-term follow-up after gene therapy for canavan disease. *Science translational medicine*, 4(165), 165ra163. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003454>

LeWitt, P. A., Rezai, A. R., Leehey, M. A., Ojemann, S. G., Flaherty, A. W., Eskandar, E. N., Kostyk, S. K., Thomas, K., Sarkar, A., Siddiqui, M. S., Tatter, S. B., Schwalb, J. M., Poston, K. L., Henderson, J. M., Kurlan, R. M., Richard, I. H., Van Meter, L., Sapan, C. V., During, M. J., Kaplitt, M. G., ... Feigin, A. (2011). AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *The Lancet. Neurology*, 10(4), 309–319. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70039-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70039-4)

- Li, C., & Samulski, R. J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics*, 21(4), 255–272.  
<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0205-4>
- Li, J., Hong, S., Chen, W., Zuo, E., & Yang, H. (2019). Advances in detecting and reducing off-target effects generated by CRISPR-mediated genome editing. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 46(11), 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2019.11.002>
- Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., He, X., Liu, M., Li, P. F., & Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 36. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>
- Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Sun, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., & Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein & cell*, 6(5), 363–372. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>
- Lim, J. K., & Murphy, P. M. (2011). Chemokine control of West Nile virus infection. *Experimental cell research*, 317(5), 569–574.  
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.01.009>
- Liu, R., Paxton, W. A., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S. R., Horuk, R., MacDonald, M. E., Stuhlmann, H., Koup, R. A., & Landau, N. R. (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86(3), 367–377.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80110-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80110-5)
- Maetzig T, Galla M, Baum C, Schambach A (2011) Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. *Viruses* 3: 677-713
- Maguire, A. M., Simonelli, F., Pierce, E. A., Pugh, E. N., Jr, Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K. A., Testa, F., Surace, E. M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V. R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'Osso, L., Hertle, R., Ma, J. X., ... Bennett, J. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*, 358(21), 2240–2248. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802315>

- Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P. K., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J. F., ... Kay, M. A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature medicine*, 12(3), 342–347. <https://doi.org/10.1038/nm1358>
- Masat, E., Pavani, G., & Mingozzi, F. (2013). Humoral immunity to AAV vectors in gene therapy: challenges and potential solutions. *Discovery medicine*, 15(85), 379–389.
- Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., Maruggi, G., Ferrari, G., Provasi, E., Bonini, C., Capurro, S., Conti, A., Magnoni, C., Giannetti, A., & De Luca, M. (2006). Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nature medicine*, 12(12), 1397–1402. <https://doi.org/10.1038/nm1504>
- Marangoni, F., Bosticardo, M., Charrier, S., Draghici, E., Locci, M., Scaramuzza, S., Panaroni, C., Ponzoni, M., Sanvito, F., Doglioni, C., Liabeuf, M., Gjata, B., Montus, M., Siminovitch, K., Aiuti, A., Naldini, L., Dupré, L., Roncarolo, M. G., Galy, A., & Villa, A. (2009). Evidence for long-term efficacy and safety of gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome in preclinical models. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(6), 1073–1082. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.31>
- Mazzolari, E., Forino, C., Guerci, S., Imberti, L., Lanfranchi, A., Porta, F., & Notarangelo, L. D. (2007). Long-term immune reconstitution and clinical outcome after stem cell transplantation for severe T-cell immunodeficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 120(4), 892–899. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.08.007>
- Merten O-W, Charrier S, Laroudie N, Fauchille S, Dugué C, Jenny C, Audit M, Zanta-Boussif M-A, Chautard H, Radrizzani M, *et al* (2011) Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application. *Hum Gene Ther* 22: 343-356

- Mirza, A., Ritsert, M. L., Tao, G., Thakar, H., Lobitz, S., Heine, S., ... & Kulozik, A. (2024). Gene Therapy in Transfusion-Dependent Non- $\beta^0/\beta^0$  Genotype  $\beta$ -Thalassemia: First Real-World Experience of Beti-cel. *Blood advances*, bloodadvances-2024014104.
- Mitchell RS, Beitzel BF, Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD (2004) Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol* 2: E234
- Modlich U, Bohne J, Schmidt M, von Kalle C, Knöss S, Schambach A, Baum C (2006) Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 108: 2545-2553
- Modlich U, Navarro S, Zychlinski D, Maetzig T, Knoess S, Brugman MH, Schambach A, Charrier S, Galy A, Thrasher AJ, *et al* (2009) Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol Ther* 17: 1919 -1928
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., Doglioni, C., von Kalle, C., & Naldini, L. (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nature biotechnology*, 24(6), 687–696.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1216>
- Montini E, Cesana D, Schmidt M, Sanvito F, Bartholomae CC, Ranzani M, Benedicenti F, Sergi LS, Ambrosi A, Ponzoni M, *et al* (2009) The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest* 119: 964-975
- Montini, E., Biffi, A., Calabria, A., Biasco, L., Cesani, M., Benedicenti, F., ... & Naldini, L. (2013). Integration site analysis in a clinical trial of lentiviral vector based hematopoietic stem cell gene therapy for metachromatic Leukodystrophy. An 18 months Follow-Up. In *Molecular Therapy* (Vol. 21, pp. S119-S119).

- Musallam, K. M., Sankaran, V. G., Cappellini, M. D., Duca, L., Nathan, D. G., & Taher, A. T. (2012). Fetal hemoglobin levels and morbidity in untransfused patients with  $\beta$ -thalassemia intermedia. *Blood*, 119(2), 364–367. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-382408>
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., & Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5259), 263–267. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263>
- Naldini L. (2011). Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nature reviews. Genetics*, 12(5), 301–315. <https://doi.org/10.1038/nrg2985>
- Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D. C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A. J., Harrington, C., O'Beirne, J., Smith, K., Pasi, J., Glader, B., Rustagi, P., Ng, C. Y., Kay, M. A., Zhou, J., Spence, Y., Morton, C. L., ... Davidoff, A. M. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *The New England journal of medicine*, 365(25), 2357–2365. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108046>
- Neven, B., Leroy, S., Decaluwe, H., Le Deist, F., Picard, C., Moshous, D., Mahlaoui, N., Debré, M., Casanova, J. L., Dal Cortivo, L., Madec, Y., Hacein-Bey-Abina, S., de Saint Basile, G., de Villartay, J. P., Blanche, S., Cavazzana-Calvo, M., & Fischer, A. (2009). Long-term outcome after hematopoietic stem cell transplantation of a single-center cohort of 90 patients with severe combined immunodeficiency. *Blood*, 113(17), 4114–4124. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-177923>
- Newhall, D. A., Oliver, R., & Lugthart, S. (2020). Anaemia: A disease or symptom. *The Netherlands journal of medicine*, 78(3), 104–110.
- Okita, K., & Yamanaka, S. (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1575), 2198–2207. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0016>
- Ordovás, L., Boon, R., Pistoni, M., Chen, Y., Wolfs, E., Guo, W., Sambathkumar, R., Bobis-Wozowicz, S., Helsen, N., Vanhove, J., Berckmans, P., Cai, Q.,



- Vanuytsel, K., Eggermont, K., Vanslembrouck, V., Schmidt, B. Z., Raitano, S., Van Den Bosch, L., Nahmias, Y., Cathomen, T., ... Verfaillie, C. M. (2015). Efficient Recombinase-Mediated Cassette Exchange in hPSCs to Study the Hepatocyte Lineage Reveals AAVS1 Locus-Mediated Transgene Inhibition. *Stem cell reports*, 5(5), 918–931. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.09.004>
- Ott, M. G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kühlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., Naundorf, S., Brinkmann, A., Deichmann, A., Fischer, M., Ball, C., Pilz, I., Dunbar, C., Du, Y., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., ... Grez, M. (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nature medicine*, 12(4), 401–409. <https://doi.org/10.1038/nm1393>
- Panigrahi, A. K., & Pati, D. (2012). Higher-order orchestration of hematopoiesis: is cohesin a new player?. *Experimental hematology*, 40(12), 967–973. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2012.09.010>
- Papapetrou, E. P., Lee, G., Malani, N., Setty, M., Riviere, I., Tirunagari, L. M., Kadota, K., Roth, S. L., Giardina, P., Viale, A., Leslie, C., Bushman, F. D., Studer, L., & Sadelain, M. (2011). Genomic safe harbors permit high  $\beta$ -globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, 29(1), 73–78. <https://doi.org/10.1038/nbt.1717>
- Pasricha, S. R., & Drakesmith, H. (2018). Hemoglobinopathies in the Fetal Position. *The New England journal of medicine*, 379(17), 1675–1677. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1809628>
- Pavani, G., & Amendola, M. (2021). Targeted Gene Delivery: Where to Land. *Frontiers in genome editing*, 2, 609650. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.609650>
- Pellegrin, S., Severn, C. E., & Toye, A. M. (2021). Towards manufactured red blood cells for the treatment of inherited anemia. *Haematologica*, 106(9), 2304–2311. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.268847>

- Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V. V., Lee, Y. L., Guschin, D. Y., Rupniewski, I., Waite, A. J., Carpenito, C., Carroll, R. G., Orange, J. S., Urnov, F. D., Rebar, E. J., Ando, D., Gregory, P. D., ... June, C. H. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*, 26(7), 808–816. <https://doi.org/10.1038/nbt1410>
- Petrich, J., Marchese, D., Jenkins, C., Storey, M., & Blind, J. (2020). Gene Replacement Therapy: A Primer for the Health-system Pharmacist. *Journal of pharmacy practice*, 33(6), 846–855. <https://doi.org/10.1177/0897190019854962>
- Piel, F. B., Steinberg, M. H., & Rees, D. C. (2017). Sickle Cell Disease. *The New England journal of medicine*, 376(16), 1561–1573. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1510865>
- Platt, O. S., Orkin, S. H., Dover, G., Beardsley, G. P., Miller, B., & Nathan, D. G. (1984). Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. *The Journal of clinical investigation*, 74(2), 652–656. <https://doi.org/10.1172/JCI111464>
- Porter, D. L., Levine, B. L., Kalos, M., Bagg, A., & June, C. H. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *The New England journal of medicine*, 365(8), 725–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal103849>
- Powars, D. R., Chan, L., & Schroeder, W. A. (1989). The influence of fetal hemoglobin on the clinical expression of sickle cell anemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 565, 262–278. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb24174.x>
- Rae, J., Newburger, P. E., Dinanuer, M. C., Noack, D., Hopkins, P. J., Kuruto, R., & Curnutte, J. T. (1998). X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-phox component of respiratory-burst oxidase. *American journal of human genetics*, 62(6), 1320–1331. <https://doi.org/10.1086/301874>
- Rahmat, Z. S., Ali, M. H., Talha, M., & Hasibuzzaman, M. A. (2024). FDA approval of Casgevy and Lyfgenia: a dual breakthrough in gene therapies for sickle cell

disease. *Annals of medicine and surgery* (2012), 86(9), 4966–4968.

<https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000002409>

Railey, M. D., Lokhnygina, Y., & Buckley, R. H. (2009). Long-term clinical outcome of patients with severe combined immunodeficiency who received related donor bone marrow transplants without pretransplant chemotherapy or post-transplant GVHD prophylaxis. *The Journal of pediatrics*, 155(6), 834–840.e1.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.07.049>

Raguram, A., Banskota, S., & Liu, D. R. (2022). Therapeutic in vivo delivery of gene editing agents. *Cell*, 185(15), 2806–2827.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.045>

Ramachandra, C. J., Shahbazi, M., Kwang, T. W., Choudhury, Y., Bak, X. Y., Yang, J., & Wang, S. (2011). Efficient recombinase-mediated cassette exchange at the AAVS1 locus in human embryonic stem cells using baculoviral vectors. *Nucleic acids research*, 39(16), e107.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkr409>

Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Sharp, P. A., & Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 520(7546), 186–191. <https://doi.org/10.1038/nature14299>

Raper, S. E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G. P., Nunes, F., Haskal, Z. J., Furth, E. E., Probert, K. J., Robinson, M. B., Magosin, S., Simoes, H., Speicher, L., Hughes, J., Tazelaar, J., Wivel, N. A., Wilson, J. M., & Batshaw, M. L. (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Human gene therapy*, 13(1), 163–175. <https://doi.org/10.1089/10430340152712719>

Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M., & Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Molecular genetics and metabolism*, 80(1-2), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.08.016>

Ravi, B., Chan-Cortés, M. H., & Sumner, C. J. (2021). Gene-Targeting Therapeutics for Neurological Disease: Lessons Learned from Spinal Muscular

Atrophy. *Annual review of medicine*, 72, 1–14.

<https://doi.org/10.1146/annurev-med-070119-115459>

Rees, H. A., & Liu, D. R. (2018). Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nature reviews. Genetics*, 19(12), 770–788.

<https://doi.org/10.1038/s41576-018-0059-1>

Ribeil, J. A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., Caccavelli, L., Neven, B., Bourget, P., El Nemer, W., Bartolucci, P., Weber, L., Puy, H., Meritet, J. F., Grevent, D., Beuzard, Y., Chrétien, S., Lefebvre, T., Ross, R. W., Negre, O., ... Cavazzana, M. (2017). Gene Therapy in a Patient with Sickle Cell Disease. *The New England journal of medicine*, 376(9), 848–855. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609677>

Rifkin-Zenenberg, S., Kanter, J., Kinney, M. A., Kwiatkowski, J. L., Nickel, R. S., Walters, M. C., ... & Gupta, A. O. (2024). An Update on Lovotibeglogene Autotemcel (Lovo-cel) Clinical Trials for Sickle Cell Disease (SCD) and Analysis of Early Predictors of Response to Lovo-Cel. *Blood*, 144, 511.

Rivat, C., Santilli, G., Gaspar, H. B., & Thrasher, A. J. (2012). Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Human gene therapy*, 23(7), 668–675. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.116>

Rivella S. (2009). Ineffective erythropoiesis and thalassemias. *Current opinion in hematology*, 16(3), 187–194. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832990a4>

Roberts, T. C., Langer, R., & Wood, M. J. A. (2020). Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nature reviews. Drug discovery*, 19(10), 673–694. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0075-7>

Sadelain, M., Papapetrou, E. P., & Bushman, F. D. (2011). Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nature reviews. Cancer*, 12(1), 51–58. <https://doi.org/10.1038/nrc3179>

Sankaran, V. G., & Orkin, S. H. (2013). The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(1), a011643. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011643>

Saraf, S. L., Molokie, R. E., Nouraie, M., Sable, C. A., Luchtman-Jones, L., Ensing, G. J., Campbell, A. D., Rana, S. R., Niu, X. M., Machado, R. F., Gladwin, M. T., & Gordeuk, V. R. (2014). Differences in the clinical and genotypic

presentation of sickle cell disease around the world. *Paediatric respiratory reviews*, 15(1), 4–12.

<https://doi.org/10.1016/j.prrv.2013.11.003>

Shah, F. T., Sayani, F., Trompeter, S., Drasar, E., & Piga, A. (2019). Challenges of blood transfusions in  $\beta$ -thalassemia. *Blood reviews*, 37, 100588.

<https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100588>

Scaramuzza, S., Biasco, L., Ripamonti, A., Castiello, M. C., Loperfido, M., Draghici, E., Hernandez, R. J., Benedicenti, F., Radrizzani, M., Salomoni, M., Ranzani, M., Bartholomae, C. C., Vicenzi, E., Finocchi, A., Bredius, R., Bosticardo, M., Schmidt, M., von Kalle, C., Montini, E., Biffi, A., ... Aiuti, A. (2013). Preclinical safety and efficacy of human CD34(+) cells transduced with lentiviral vector for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(1), 175–184.

<https://doi.org/10.1038/mt.2012.23>

Sgourou, A., Routledge, S., Spathas, D., Athanassiadou, A., & Antoniou, M. N. (2009). Physiological levels of HBB transgene expression from S/MAR element-based replicating episomal vectors. *Journal of biotechnology*, 143(2), 85–94.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.06.018>

Schambach A, Zychlinski D, Ehrnstroem B, Baum C (2013) Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 24: 132-142

Schoenfelder, S., & Fraser, P. (2019). Long-range enhancer-promoter contacts in gene expression control. *Nature reviews. Genetics*, 20(8), 437–455.

<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0128-0>

Schröder, 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.

[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00864-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00864-4)

Sentmanat, M. F., Peters, S. T., Florian, C. P., Connelly, J. P., & Pruett-Miller, S. M. (2018). A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Scientific reports*, 8(1), 888. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>

- Scott L. J. (2015). Alipogene tiparvovec: a review of its use in adults with familial lipoprotein lipase deficiency. *Drugs*, 75(2), 175–182.  
<https://doi.org/10.1007/s40265-014-0339-9>
- Shi, J., & Zheng, D. (2009). An update on gene therapy in China. *Current opinion in molecular therapeutics*, 11(5), 547–553.
- Smith, J. R., Maguire, S., Davis, L. A., Alexander, M., Yang, F., Chandran, S., ffrench-Constant, C., & Pedersen, R. A. (2008). Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(2), 496–504.  
<https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0039>
- Srivastava, A., Mallela, K. M. G., Deorkar, N., & Brophy, G. (2021). Manufacturing Challenges and Rational Formulation Development for AAV Viral Vectors. *Journal of pharmaceutical sciences*, 110(7), 2609–2624.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.03.024>
- Steinberg M. H. (2020). Fetal hemoglobin in sickle cell anemia. *Blood*, 136(21), 2392–2400. <https://doi.org/10.1182/blood.2020007645>
- Sun, J., & Roy, S. (2021). Gene-based therapies for neurodegenerative diseases. *Nature neuroscience*, 24(3), 297–311. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00778-1>
- Titman, P., Pink, E., Skucek, E., O'Hanlon, K., Cole, T. J., Gaspar, J., Xu-Bayford, J., Jones, A., Thrasher, A. J., Davies, E. G., Veys, P. A., & Gaspar, H. B. (2008). Cognitive and behavioral abnormalities in children after hematopoietic stem cell transplantation for severe congenital immunodeficiencies. *Blood*, 112(9), 3907–3913. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-151332>
- Uda, M., Galanello, R., Sanna, S., Lettre, G., Sankaran, V. G., Chen, W., Usala, G., Busonero, F., Maschio, A., Albai, G., Piras, M. G., Sestu, N., Lai, S., Dei, M., Mulas, A., Crisponi, L., Naitza, S., Asunis, I., Deiana, M., Nagaraja, R., ... Cao, A. (2008). Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1620–1625.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0711566105>



- Van Haasteren, J., Hyde, S. C., & Gill, D. R. (2018). Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future. *Expert opinion on biological therapy*, 18(9), 959–972.  
<https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1506761>
- Vansant, G., Chen, H. C., Zorita, E., Trejbalová, K., Miklík, D., Filion, G., & Debyser, Z. (2020). The chromatin landscape at the HIV-1 provirus integration site determines viral expression. *Nucleic acids research*, 48(14), 7801–7817.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa536>
- Walters, M. C., Kanter, J., Kwiatkowski, J. L., Krishnamurti, L., Mapara, M. Y., Schmidt, M., ... & Tisdale, J. F. (2020). Lentiglobin for sickle cell disease (SCD) gene therapy (GT): updated results in group C patients from the phase 1/2 Hgb-206 study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 26(3), S1-S2. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.12.136>
- Wang, D., Zhang, F., & Gao, G. (2020). CRISPR-Based Therapeutic Genome Editing: Strategies and In Vivo Delivery by AAV Vectors. *Cell*, 181(1), 136–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.023>
- Wang, JH., Gessler, D.J., Zhan, W., Gallagher, T.L., & Gao, G. (2024). Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases. *Signal Transduction Targeted Therapy* 9 (78).  
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01780-w>
- Wang, Y., Zheng, C. G., Jiang, Y., Zhang, J., Chen, J., Yao, C., Zhao, Q., Liu, S., Chen, K., Du, J., Yang, Z., & Gao, S. (2012). Genetic correction of  $\beta$ -thalassemia patient-specific iPS cells and its use in improving hemoglobin production in irradiated SCID mice. *Cell research*, 22(4), 637–648.  
<https://doi.org/10.1038/cr.2012.23>
- Ware, R. E., de Montalembert, M., Tshilolo, L., & Abboud, M. R. (2017). Sickle cell disease. *Lancet (London, England)*, 390(10091), 311–323.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30193-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30193-9)
- Watt, A. (2024). Casgevy: Launch sequence and price analysis of the first marketed CRISPR therapy. *GlobalData's Price Intelligence (POLI)*.

<https://www.pharmaceutical-technology.com/analyst-comment/casgevy-launch-crispr-therapy/>

Wattanapanitch, M., Damkham, N., Potirat, P., Trakarnsanga, K., Janan, M., U-Pratya, Y., Kheolamai, P., Klincumhom, N., & Issaragrisil, S. (2018). One-step genetic correction of hemoglobin E/beta-thalassemia patient-derived iPSCs by the CRISPR/Cas9 system. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 46.

<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0779-3>

Weatherall, D. J., & Clegg, J. B. (2008). *The thalassaemia syndromes*. John Wiley & Sons.

Wilkinson, A. C., Dever, D. P., Baik, R., Camarena, J., Hsu, I., Charlesworth, C. T., Morita, C., Nakauchi, H., & Porteus, M. H. (2021). Cas9-AAV6 gene correction of beta-globin in autologous HSCs improves sickle cell disease erythropoiesis in mice. *Nature communications*, 12(1), 686.

<https://doi.org/10.1038/s41467-021-20909-x>

Wilson J. M. (2005). Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Human gene therapy*, 16(9), 1014–1015. <https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.1014>

Wu, Y., Zeng, J., Roscoe, B. P., Liu, P., Yao, Q., Lazzarotto, C. R., Clement, K., Cole, M. A., Luk, K., Baricordi, C., Shen, A. H., Ren, C., Esrick, E. B., Manis, J. P., Dorfman, D. M., Williams, D. A., Biffi, A., Brugnara, C., Biasco, L., Brendel, C., ... Bauer, D. E. (2019). Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nature medicine*, 25(5), 776–783.

<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0401-y>

Yang, L., Soonpaa, M. H., Adler, E. D., Roepke, T. K., Kattman, S. J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G. W., Linden, R. M., Field, L. J., & Keller, G. M. (2008). Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*, 453(7194), 524–528.

<https://doi.org/10.1038/nature06894>

Yi, J. S., Moertel, C. L., & Baker, K. S. (2009). Homozygous alpha-thalassemia treated with intrauterine transfusions and unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *The Journal of pediatrics*, 154(5), 766–768.

<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.11.031>

- Yuan, J., Rubin, E., Aljurf, M., Ma, L., & Schrier, S. L. (1994). Defective assembly of membrane proteins in erythroid precursors of beta-thalassemic mice. *Blood*, 84(2), 632–637.
- Yuan, J., Bunyaratvej, A., Fucharoen, S., Fung, C., Shinar, E., & Schrier, S. L. (1995). The instability of the membrane skeleton in thalassemic red blood cells.
- Zhang, L., Thrasher, A. J., & Gaspar, H. B. (2013). Current progress on gene therapy for primary immunodeficiencies. *Gene therapy*, 20(10), 963–969. <https://doi.org/10.1038/gt.2013.21>
- Zhang, Y., & Wu, Z. Y. (2024). Gene therapy for monogenic disorders: challenges, strategies, and perspectives. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 51(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2023.08.001>
- Zivot, A., Lipton, J. M., Narla, A., & Blanc, L. (2018). Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 24(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0011-z>
- Zou, J., Sweeney, C. L., Chou, B. K., Choi, U., Pan, J., Wang, H., Dowey, S. N., Cheng, L., & Malech, H. L. (2011). Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood*, 117(21), 5561–5572. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-328161>
- Zou, J., Mali, P., Huang, X., Dowey, S. N., & Cheng, L. (2011). Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. *Blood*, 118(17), 4599–4608. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-335554>
- Zychlinski D, Schambach A, Modlich U, Maetzig T, Meyer J, Grassman E, Mishra A, Baum C (2008) Physiological promoters reduce the genotoxic risk of integrating gene vectors. *Mol Ther* 16: 718-725
- Ζώγας, Ν., Καρπώνη, Γ., Ιορδανίδης, Φ., Παρασκευάς, Β., Παπαδοπούλου, Α., Σκούρας, Ζ., Αναγνωστόπουλος, Α., & Γιαννάκη Ε. (2016). Η Ex Vivo Επαγωγή Ανοχής του Toll-like Receptor 7 στα Λεμφοκύτταρα του Δότη ως Μέσο Προφύλαξης της Πειραματικής Οξείας Νόσου του Μοσχεύματος κατά Ξενιστή. *Archives Of Hellenic Medicine*, 33(6):782-795.

## Ιστοσελίδες

National Heart, Lung, and Blood Institute, 2022. *Sickle cell disease*.

<https://www.nhlbi.nih.gov/resources/sickle-cell-disease-fact-sheet>

CRISPR-Cas9 Gene Editing for SCD and TDT

<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMdo005930/full/>

Ελληνική Εταιρεία Ανοσολογίας

[http://www.helsim.gr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5&Itemid=143](http://www.helsim.gr/index.php?option=com_content&view=article&id=5&Itemid=143)

Αθηναϊκό – Μακεδονικό Πρακτορείο Ειδήσεων

<https://www.amna.gr/health/article/813279/39chronos-thalassaimikos-apallachthike-apo-metaggiseis-me-gonidiaki-therapeia>

CASGEVY™ (exagamglogene autotemcel)

<https://www.casgevy.com/>

U.S. Food and Drug Administration

<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-gene-therapies-treat-patients-sickle-cell-disease>

LYFGENIA™ (lovotibeglogene autotemcel)

<https://www.lyfgeniahcp.com/>

<https://www.lyfgeniahcp.com/mechanism-of-action>

LYFGENIA™ Clinical-trial

<https://www.lyfgenia.com/clinical-trial-results>

## Παράρτημα – Γλωσσάριο Βιολογικών Όρων

- **Αλληλουχία επόμενης γενιάς ή Μαζική Παράλληλη Αλληλούχηση του γονιδιώματος:** Χρησιμοποιώντας την Αλληλουχία Επόμενης Γενιάς ένα ολόκληρο ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να προσδιοριστεί μέσα σε μια μέρα. Αντίθετα, η προηγούμενη τεχνολογία αλληλουχίας Sanger, που χρησιμοποιήθηκε για την αποκρυπτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, χρειάστηκε πάνω από μια δεκαετία για να παραδοθεί το τελικό σχέδιο.
- **AAV-GAD:** Είναι γονιδιακή θεραπεία για τη νόσο του Πάρκινσον. Παρέχει το γονίδιο αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD) στον υποθαλαμικό πυρήνα, όπου αυτό το ένζυμο αυξάνει στη συνέχεια την παραγωγή του ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή γ-Αμινο-Βουτυρικό οξύ (GABA). Μια κοινή παρενέργεια της γονιδιακής θεραπείας με τη μεσολάβηση AAV είναι μια παροδική τρανσαμινίτιδα που δεν σχετίζεται με σημαντική ηπατική βλάβη ούτε αλλαγές στην ηπατική λειτουργία (λευκωματίνη και χολερυθρίνη).
- **Αλληλούχηση ολόκληρου του εξώματος (WES):** Θεωρείται ως μια οικονομικά αποδοτική στρατηγική αλληλούχισης για τον εντοπισμό μεταλλάξεων που προκαλούν ασθένειες. Παρ' όλο που τα εξόνια καταλαμβάνουν μόνο περίπου το 1,7% ολόκληρου του γονιδιώματος, αντιπροσωπεύουν άμεσα το προφίλ των συνολικών πρωτεϊνικών λειτουργιών. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, έχει αναφερθεί ότι περισσότερο από το 85% των μεταλλάξεων που σχετίζονται με τη νόσο συμβαίνουν στην λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης. Τα βασικά βήματα που απαιτούνται για την αλληλούχηση του εξώματος περιλαμβάνουν τα εξής: Το γονιδιωματικό DNA τεμαχίζεται σε τυχαία θραύσματα περίπου 300 bp τα οποία στη συνέχεια πλαισιώνονται από προσαρμογείς για να επιτρέψουν τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Ακολουθεί η λήψη εξώματος. Οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν σε εξόνια συλλαμβάνονται με υβριδισμό σε βιοτινυλιωμένα δολώματα DNA ή RNA και στη συνέχεια έλκονται προς τα κάτω με μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα με βιοτίνη-στρεπταβιδίνη. Τελικά αυτό το βήμα ακολουθείται από ενίσχυση και μαζική παράλληλη αλληλούχηση. Οι γραμμωτοί κώδικες που επιτρέπουν την ευρετηρίαση δειγμάτων μπορούν ενδεχομένως να εισαχθούν πριν από τη λήψη ή κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης μετά τη λήψη.

- **Αναιμία Fanconi (FA):** Είναι μια σπάνια, κληρονομική διαταραχή του αίματος, που οδηγεί σε αποτυχία του μυελού των οστών να παράγει φυσιολογικό αριθμό κυττάρων του αίματος. Η FA είναι ένας τύπος απλαστικής αναιμίας, όπου καταστρέφεται ο μυελός των οστών, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η παραγωγή αρκετών νέων αιμοσφαιρίων, ώστε ο οργανισμός να λειτουργεί κανονικά. Η FA μπορεί επίσης, να προκαλέσει στο μυελό των οστών τη δημιουργία πολλών αλλοιωμένων κυττάρων του αίματος και να οδηγήσει σε σοβαρά προβλήματα υγείας, όπως λευχαιμία.
- **Ανάλυση Array (Single Nucleotide Polymorphism Arrays) - Μοριακός Καρυότυπος ή Μικροσυστοιχίες συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (array CGH):** Οι συστοιχίες (microarrays) πολυμορφισμού του απλού νουκλεοτιδίου προσφέρουν αναγνώριση υψηλής ανάλυσης της παραλλαγής του αριθμού των αντιγράφων και της επίκτητης απώλειας, της ουδέτερης αντιγραφής, ετεροζυγωτίας /μονογονικής δισωμίας που συνήθως δεν είναι αναγνωρίσιμες από συμβατική κυτταρογενετική ανάλυση και μελέτες FISH (Fluorescence in situ hybridization). Επίσης, η εισαγωγή των μικροσυστοιχειών συγκριτικού γενομικού υβριδισμού (array CGH) στην κλινική πρακτική στοχεύει να βελτιωθεί το ποσοστό της διάγνωσης γενετικών ανωμαλιών που οδηγούν σε φυσική και λειτουργική ανωμαλία καθώς έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν οποιαδήποτε ποσοτική αλλαγή στο DNA, όπως ανευπλοειδίες, ελλείμματα και διπλασιασμούς, με αναλυτική ευχέρεια κατά πολύ ισχυρότερη (10-10000 φορές) από τον κλασικό καρυότυπο, ανάλογα με το μέγεθος του στόχου και την κάλυψη και τη πυκνότητα των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται.
- **Γονίδιο SUPT5H:** Ενεργοποιεί τις δραστηριότητες δέσμευσης ενζύμων και ετεροδιμερισμού των πρωτεϊνών. Συμμετέχει στη θετική ρύθμιση της μακροαυτοφαγίας, ρυθμίζει τις μεταβολικής διαδικασίας του RNA και την επιμήκυνση κατά τη μεταγραφή από τον προαγωγέα της RNA πολυμεράσης II.
- **HbH:** Η νόσος της αιμοσφαιρίνης H (HbH) είναι μια μορφή άλφα θαλασσαιμίας στην οποία αναπτύσσεται μέτρια έως σοβαρή αναιμία λόγω μειωμένου σχηματισμού αλυσίδων άλφα σφαιρίνης. Σε αυτή την κατάσταση, όπως και στις άλλες μορφές θαλασσαιμίας, υπάρχει μια ανισορροπία των



αλυσίδων σφαιρίνης που απαιτούνται για να σχηματιστεί η αιμοσφαιρίνη. Κανονικά, υπάρχουν τέσσερα γονίδια που παράγουν αλυσίδες άλφα σφαιρίνης. Όταν τρία στα τέσσερα από αυτά τα γονίδια καθίστανται ανενεργά, υπάρχουν πολύ λίγες αλυσίδες άλφα σφαιρίνης για να συνδυαστούν με βήτα αλυσίδες και να δημιουργήσουν φυσιολογική αιμοσφαιρίνη (αιμοσφαιρίνη Α). Οι πλεονάζουσες αλυσίδες βήτα σφαιρίνης στη συνέχεια συνδυάζονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν την αιμοσφαιρίνη Η. Η HbH που προκαλείται από διαγραφή τριών γονιδίων (HbH διαγραφής) είναι λιγότερο σοβαρή από τις περιπτώσεις στις οποίες διαγράφονται δύο γονίδια και το τρίτο γονίδιο έχει σημειακή μετάλλαξη (HbH χωρίς διαγραφή) π.χ. HbH Constant Spring (HCS).

- **LPLD:** Είναι μια σπάνια αυτοσωματική υπολειπόμενη διαταραχή, οδηγεί σε υπερχυλομικροαναιμία και σοβαρή υπερτριγλυκεριδαιμία, οι οποίες με τη σειρά τους συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο κλινικών επιπλοκών, η πιο εξουθενωτική από τις οποίες είναι η υποτροπιάζουσα σοβαρή και δυνητικά απειλητική για τη ζωή παγκρεατίτιδα.
- **Λευκοδυστροφίες:** Ομάδα σπάνιων γενετικών διαταραχών που χαρακτηρίζονται από εκφυλισμό της λευκής ουσίας του εγκεφάλου και του νωτιαίου μυελού και κληρονομούνται με αυτοσωματικό επικρατή/υπολειπόμενο ή και φυλοσύνδετο τρόπο. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 30 μορφές Λευκοδυστροφίας όπως, η Μεταχρωματική Λευκοδυστροφία (MLD), η Αδρενολευκοδυστροφία (ALD), οι νόσοι Canavan και Krabbe και άλλες.
- **Μονογονεϊκή Δισωμία:** Η παρουσία ζεύγους ομολόγων χρωμοσωμάτων σε εμπύρηνα σωματικά κύτταρα, στο οποίο και τα δύο χρωμοσώματα προέρχονται από τον ίδιο γονέα, ενώ φυσιολογικά καθένα θα έπρεπε να προέρχεται από διαφορετικό γονέα. Διακρίνεται σε Ισοδισωμία και Ετεροδισωμία, ανάλογα με το αν τα χρωμοσώματα είναι ίδια ή διαφορετικά αντίστοιχα.
- **Ομόλογη Κατευθυνόμενη Επιδιόρθωση (HDR):** είναι μια διαδικασία κατά την οποία ένα σπάσιμο διπλού κλώνου DNA (DSB) επιδιορθώνεται με ομόλογο ανασυνδυασμό χρησιμοποιώντας ένα πρότυπο DNA. Αυτό το πρότυπο μπορεί να προέρχεται από το κύτταρο κατά τη διάρκεια της ύστερης φάσης S ή φάσης G2 του κυτταρικού κύκλου, όταν οι αδελφές χρωματίδες είναι

διαθέσιμες πριν από την ολοκλήρωση της μίτωσης. Το HDR μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέρος της επεξεργασίας με τη μεσολάβηση CRISPR που αποτελείται από βραχίονες ομολογίας που πλαισιώνουν μια ακολουθία ενδιαφέροντος.

- **QALY** – Ποιοτικώς Προσαρμοσμένο Έτος Ζωής ισούται με 1 έτος ζωής σε τέλεια υγεία. Τα QALY υπολογίζονται από τα έτη ζωής που απομένουν για έναν ασθενή μετά από μια συγκεκριμένη θεραπεία ή παρέμβαση, σταθμίζοντας κάθε χρόνο με βαθμολογία ποιότητας ζωής (σε κλίμακα από 0 έως 1).
- **Συγγενής αμαύρωση του Leber:** Είναι μια σπανιότατη κληρονομική νόσος, κατά την οποία οι φωτοϋποδοχείς του αμφιβληστροειδούς (τα ραβδία και τα κωνία) δεν λειτουργούν, με αποτέλεσμα τα παιδιά με τη νόσο να είναι σχεδόν τυφλά κατά τη γέννηση.
- **T7:** Στην τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA, η πολυμεράση RNA T7 χρησιμοποιείται ως ισχυρό εργαλείο για την οδήγηση υψηλού επιπέδου εκφράσεων κλωνοποιημένων γονιδίων ή/και για την παρασκευή in vitro μεγάλης ποσότητας καθορισμένων RNA μεταγραφών.
- **3PN:** Ο σχηματισμός τριπλοειδών (3PN) ζυγωτών είναι μια απροσδόκητη επιπλοκή της ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection). Τέτοια ζυγωτά έχουν τρία αντίγραφα από κάθε χρωμόσωμα αντί για τα κανονικά δύο αντίγραφα ανά κύτταρο. Κανονικά, μόνο ένα σπερματοζωάριο γονιμοποιεί ένα ωάριο επειδή τα ωοκύτταρα υφίστανται την αντίδραση της ζώνης, η οποία αποτρέπει την πολυσπερμία.
- **Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος που συνδέεται με το X χρωμόσωμα (CGDX):** Πρωτογενής ανοσοανεπάρκεια που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση συμπτωμάτων τους πρώτους μήνες ή χρόνια της ζωής. Οι ασθενείς παρουσιάζουν υποτροπιάζουσες λοιμώξεις, λεμφαδενοπάθεια, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, κοκκιωματώδη κολίτιδα, πυρετό, δερματικές λοιμώξεις, οστεομυελίτιδα και/ή αποστήματα. Η κληρονομική διαταραχή προκαλείται λόγω απουσίας ή μειωμένης δραστηριότητας της οξειδάσης NADPH των φαγοκυττάρων. Η συνδεδεμένη με X μορφή της νόσου προέρχεται από ελαττώματα στο γονίδιο CYBB, το οποίο κωδικοποιεί το συστατικό γλυκοπρωτεΐνης 91-kD (που ονομάζεται “gp91-phox”) της οξειδάσης.

➤ **Φυλοσύνδετη συγγενής Δυσκεράτωση (Dyskeratosis congenita, X-linked)**

– **γονίδιο DKC1**): Στην τυπική της μορφή η νόσος χαρακτηρίζεται από την τριάδα βλεννογόνο-δερματικών εκδηλώσεων, δυστροφικών νυχιών και λευκοπλακίας, κλινικές εκδηλώσεις που εμφανίζονται μετά την ηλικία των 10 ετών. Η μυελική ανεπάρκεια, που συνήθως εμφανίζεται την 3η δεκαετία της ζωής, συνοδεύεται από προδιάθεση για νεοπλασίες (10%) και σοβαρές πνευμονικές επιπλοκές, όπως πνευμονική ίνωση (10-15%). Η νόσος μεταβιβάζεται με τον φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τύπο, αλλά και με αυτοσωμικό επικρατή και υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας και παρουσιάζει μεγάλη κλινική ετερογένεια. Οφείλεται σε διαταραχή διατήρησης του μήκους των τελομερών και το υπεύθυνο γονίδιο είναι το DKC1. Μεταλλάξεις του DKC1 που κωδικοποιεί την δυσκερίνη, πρωτεΐνη που συνδέεται με την τελομεράση, που με τη σειρά της είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση του μήκους των τελομερών, έχουν ενοχοποιηθεί για τη φυλοσύνδετη μορφή της νόσου.

➤ **Wiskott-Aldrich Σύνδρομο**: Γενετική διαταραχή που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και από διαταραχές της πήξης του αίματος. Οι ασθενείς έχουν μειωμένο αριθμό και μέγεθος αιμοπεταλίων, γεγονός που οδηγεί στον συχνή εμφάνιση εκχυμώσεων και σε επεισόδια παρατεταμένης αιμορραγίας μετά από ήσσονος σημασίας τραύματα. Οι πάσχοντες διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης διαφόρων ανοσολογικών και φλεγμονωδών διαταραχών εξαιτίας των μη φυσιολογικών ή μη λειτουργικών λευκών αιμοσφαιρίων τους. Πολλοί ασθενείς εμφανίζουν εκζέματα και αυτοάνοσες επιδράσεις, ενώ έχουν αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης λεμφώματος. Το σύνδρομο Wiskott-Aldrich παρουσιάζει φυλοσύνδετη υπολειπόμενη κληρονομικότητα.

➤ **Χρόνια Κοκκιωματώδης Νόσος (CGD)**: Γενετικά προσδιορισμένη (κληρονομική) νόσος που χαρακτηρίζεται από ανεπάρκεια της οξειδωτικής ικανότητας των φαγοκυττάρων. Αυτό σημαίνει ότι δεν μπορούν να παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και κάποια ακόμα οξειδωτικά μόρια, οπότε δεν μπορούν να σκοτώσουν και να πέσουν ορισμένους μικροοργανισμούς. Ως αποτέλεσμα αυτής της ελαττωματικής φονικής λειτουργίας των

φαγοκυττάρων, οι ασθενείς με CGD έχουν αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις που προκαλούνται από βακτήρια και μύκητες. Η κατάσταση αυτή επίσης συνδέεται με υπερβολική συσσώρευση ανοσοκυττάρων που σχηματίζουν κοκκιώματα (από τα οποία προέρχεται και το όνομα της νόσου) στα σημεία λοίμωξης ή άλλης φλεγμονής.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.