



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΑΣΙΚΕΣ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ»**

**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ  
ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ Β ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ**

**ΓΕΩΡΓΙΑ ΑΛΑΜΠΑΣΗ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:  
ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΜΑΚΗΣ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024**



# Περιεχόμενα

Πρόλογος .....	4
<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή .....</b>	<b>7</b>
1.1 Εισαγωγή στις Αιμοσφαιρίνες .....	7
1.2 Εισαγωγή στις αιμοσφαιρινοπάθειες .....	12
1.3 Εισαγωγή στη β-θαλασσαιμία .....	14
1.3.1 Ανακάλυψη και ιστορία β θαλασσαιμίας .....	15
1.3.2 Επιδημιολογία και παγκόσμιος αντίκτυπος.....	16
1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	21
<b>Κεφάλαιο 2: Μοριακή βάση και τύποι β Θαλασσαιμίας .....</b>	<b>23</b>
2.1 Κατανόηση των μεταλλάξεων του γονιδίου HBB.....	24
2.1.1 ταξινόμηση μεταλλάξεων.....	24
2.2 Παθοφυσιολογία και Κλινικές εκδηλώσεις .....	28
2.3 Τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις στη β θαλασσαιμία .....	34
<b>Κεφάλαιο 3: Επισκόπηση γονιδιακής θεραπείας.....</b>	<b>39</b>
3.1 Ιστορία της Γονιδιακής θεραπείας.....	40
3.2 Μεθοδολογίες Γονιδιακής Θεραπείας .....	42
<b>Κεφάλαιο 4: Προσεγγίσεις Γονιδιακής Θεραπείας για β Θαλασσαιμία .....</b>	<b>51</b>
4.1 Υπερέκφραση β σφαιρίνης με γονιδιακή θεραπεία <i>ex vivo</i> .....	54
4.2 Επαγωγή έκφρασης γ σφαιρίνης μέσω καταστολής BCL11A .....	56
<b>Κεφάλαιο 5: Τρέχουσες θεραπείες, κλινικές δοκιμές και μελλοντικές κατευθύνσεις.....</b>	<b>60</b>
5.1 Εγκεκριμένες γονιδιακές θεραπείες .....	63
5.2 Λοιπές κλινικές δοκιμές .....	66
<b>Κεφάλαιο 6: Ζητήματα ασφάλειας και ηθικές προεκτάσεις .....</b>	<b>70</b>
<b>Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα και η προοπτική της γονιδιακής θεραπείας στη β θαλασσαιμία.....</b>	<b>79</b>
Περίληψη.....	82
Abstract .....	83
Βιβλιογραφία.....	84

## Πρόλογος

Η παρούσα διατριβή μεταπτυχιακής ειδίκευσης εκπονήθηκε στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά το ακαδημαϊκό έτος 2022-2024 στο πλαίσιο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)» υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Αλέξανδρο Μάκη.

Στο ταξίδι αυτό είχα πολλούς συνοδοιπόρους στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για όσα μοιραστήκαν μαζί μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Επιβλέποντά μου, Καθηγητή Παιδιατρικής κ. Αλέξανδρο Μάκη για την τιμή που μου έκανε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να συνεργαστούμε με σκοπό την εκπόνηση αυτής της διατριβής μεταπτυχιακής ειδίκευσης. Τον ευχαριστώ θερμά τόσο για την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας μελέτης, όσο και για την ουσιαστική βοήθειά του στη συγγραφή της διπλωματικής.

Φυσικά δεν μπορώ να παραλείψω να ευχαριστήσω ξεχωριστά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αιματολογίας κα. Ελευθερία Χατζημιχαήλ και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γενικής Βιολογίας κ. Παναγιώτη Κούκλη για τον χρόνο τους, την υπομονή τους, τις συμβουλές τους και την βοήθειά τους.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να εκφράσω την χαρά και την τύχη να έχω δίπλα μου σε αυτό το ταξίδι τους φίλους και ιδιαίτερα την Ραφαέλα, να μου δίνουν απλόχερα την στήριξη και την αγάπη τους κάθε φορά που το είχα ανάγκη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και συγκεκριμένα, τον πατέρα μου, την μητέρα μου, τους αδερφούς μου Θανάση και Χρήστο, την Μελίνα και την Λίζα, για όλη την αγάπη, την εμπιστοσύνη και την δύναμη που μου προσφέρουν σε ό,τι και αν κάνω. Ελπίζω να τους κάνω περήφανους.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## **Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή**

Ένα πολύ σημαντικό βήμα στην πορεία εξέλιξης των ειδών, αποτέλεσε η μετάβαση από την αναερόβια στην αερόβια ζωή, καθώς αποκάλυψε μια πλούσια πηγή ενέργειας: παρουσία οξυγόνου, η ενέργεια που εξάγεται από τη γλυκόζη είναι δεκαπέντε φορές περισσότερη συγκριτικά με την απουσία του. Τα κύτταρα των μονοκύτταρων και άλλων μικρών οργανισμών, μπορούν να απορροφήσουν το οξυγόνο πάραυτα, από τον περιβάλλοντα αέρα ή το νερό. Αντίθετα, τα σπονδυλωτά, εξέλιξαν δύο κύριους μηχανισμούς για την τροφοδοσία των κυττάρων τους με επαρκή ποσότητα οξυγόνου. Ο πρώτος είναι η ανάπτυξη του κυκλοφορικού συστήματος που παρέχει ενεργά οξυγόνο στα κύτταρα σε όλο το σώμα. Ο δεύτερος μηχανισμός στηρίζεται στη λειτουργία των πρωτεϊνών μεταφοράς και αποθήκευσης οξυγόνου, της αιμοσφαιρίνης και μυοσφαιρίνης, αντίστοιχα.

Η αιμοσφαιρίνη που περιέχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, είναι μια πολύ σημαντική πρωτεΐνη, που μεταφέρει αποτελεσματικά οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς ενώ συμβάλλει και στη μεταφορά διοξειδίου του άνθρακα πίσω στους πνεύμονες. Η μυοσφαιρίνη, που εντοπίζεται στα μυϊκά κύτταρα, διευκολύνει τη διάχυση του οξυγόνου και δίνει δυνατότητα εφεδρικής παροχής του, όποτε απαιτηθεί (Berg and Tymoczko 2018).

### **1.1 Εισαγωγή στις Αιμοσφαιρίνες**

Η αιμοσφαιρίνη είναι μια σύνθετη πρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταφορά οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα μέσα στην κυκλοφορία του αίματος. Βρίσκεται στο εσωτερικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, κυττάρων εξειδικευμένων δομικά και λειτουργικά για την ανταλλαγή αερίων διαμέσω

του κυκλοφορικού συστήματος. Η δομή της αιμοσφαιρίνης της επιτρέπει να συνδέεται με το οξυγόνο στους πνεύμονες και να το απελευθερώνει σε ιστούς που έχουν χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου, ενώ ταυτόχρονα διευκολύνει τη μεταφορά ενός ποσοστού του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς πίσω στους πνεύμονες προς εκπνοή και απομάκρυνση του από τον οργανισμό (Schechter 2008, Storz 2018). Η αιμοσφαιρίνη αποτελείται από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες (σφαιρίνες), καθεμία από τις οποίες συνδέεται με μια ομάδα αίμης. Αυτές οι ομάδες αίμης περιέχουν ένα άτομο σιδήρου στα κέντρα τους, όπου δεσμεύεται το οξυγόνο. Οι διάφοροι τύποι αιμοσφαιρίνης προκύπτουν από συνδυασμό διαφορετικών σφαιρινών (Thom, Dickson et al. 2013).

Κάθε τύπος αιμοσφαιρίνης παίζει μοναδικό ρόλο στη μεταφορά οξυγόνου και αντανακλά τις αναπτυξιακές αλλαγές από την εμβρυϊκή ζωή έως την ενηλικίωση. Η διαφορετική συγγένεια για το οξυγόνο που παρατηρείται μεταξύ αυτών των τύπων είναι κρίσιμης σημασίας για την κάλυψη των ποικίλων αναγκών οξυγόνωσης κατά τη διάρκεια διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης και σε διάφορες φυσιολογικές συνθήκες.

Οι τύποι της αιμοσφαιρίνης ποικίλλουν ανάλογα με τη σύνθεση των πολυπεπτιδικών τους αλυσίδων (Storz 2018) και περιλαμβάνουν:

**1. Αιμοσφαιρίνη A (HbA):** Αυτή είναι η επικρατούσα μορφή στους ενήλικες (95%-98% της συνολικής παραγωγής αιμοσφαιρίνης). Αποτελείται από δύο άλφα ( $\alpha$ ) και δύο βήτα ( $\beta$ ) αλυσίδες ( $\alpha_2\beta_2$ ). Η HbA είναι υπεύθυνη για την μεταφορά της πλειονότητας του οξυγόνου στους ιστούς των ενηλίκων.

**2. Αιμοσφαιρίνη A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>):** Αυτός ο τύπος περιλαμβάνει δύο άλφα και δύο δέλτα ( $\delta$ ) αλυσίδες ( $\alpha_2\delta_2$ ). Υπάρχει σε μικρότερες ποσότητες στους ενήλικες και έχει παρόμοια λειτουργία με την HbA.

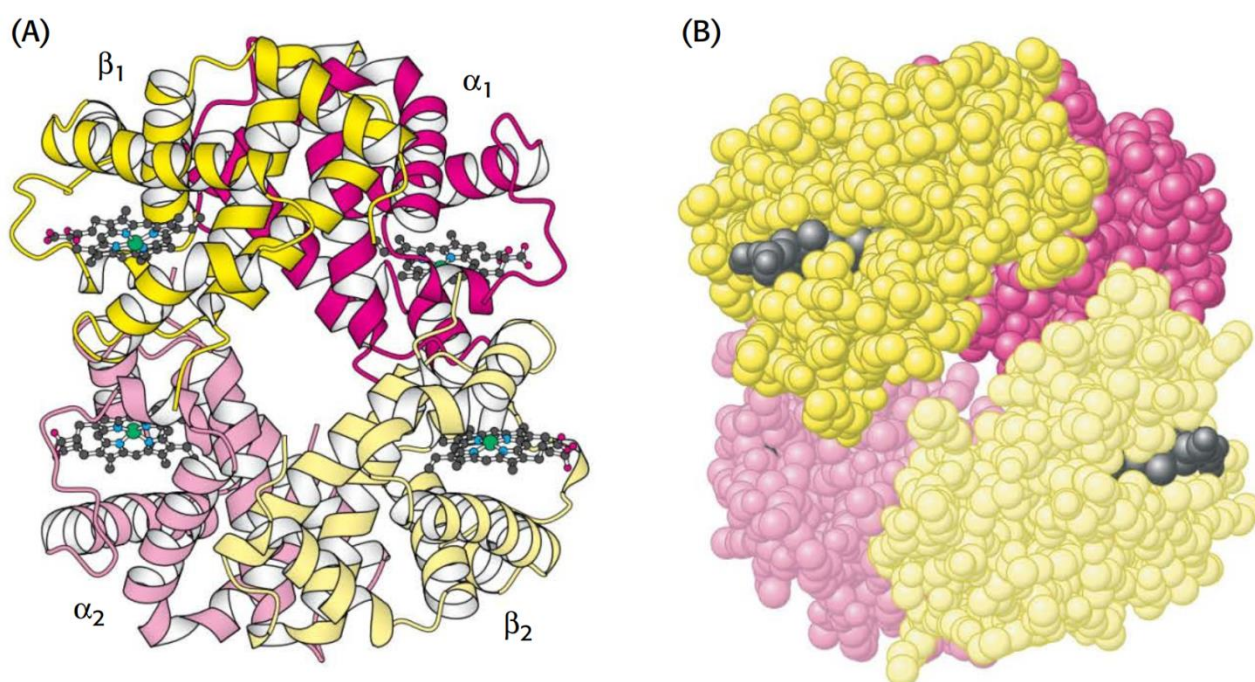
**3. Αιμοσφαιρίνη F (HbF):** Βρίσκεται κυρίως σε έμβρυα και νεογέννητα μωρά, η HbF αποτελείται από δύο άλφα και δύο γάμμα ( $\gamma$ ) αλυσίδες ( $\alpha_2\gamma_2$ ). Αυτή η μορφή έχει υψηλότερη συγγένεια για το οξυγόνο από την αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταφορά οξυγόνου του εμβρύου καθώς το έμβρυο λαμβάνει οξυγόνο από την κυκλοφορία του αίματος της μητέρας.

**4. Παραλλαγές αιμοσφαιρινών:** Πρόκειται για λιγότερο συχνές μορφές που προκύπτουν από γενετικές μεταλλάξεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η

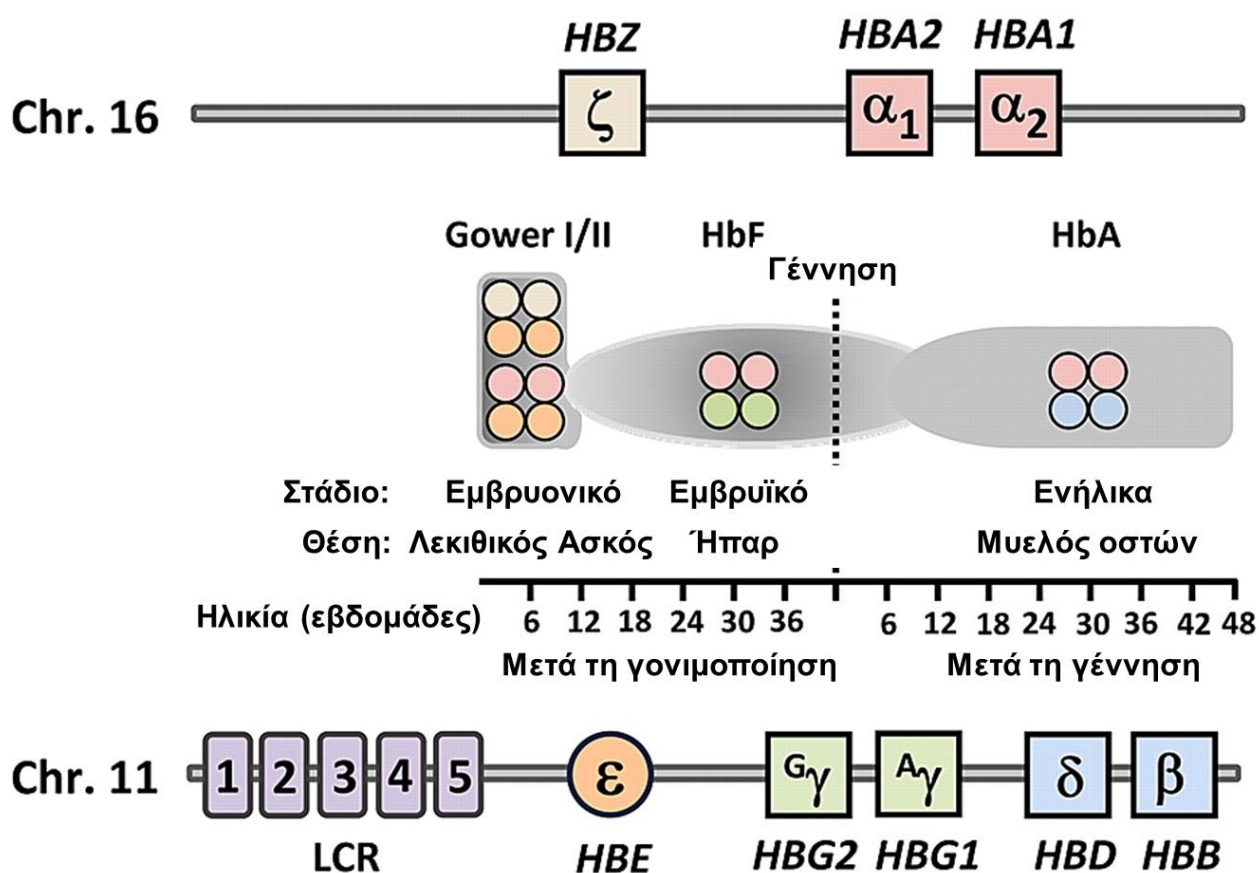


αιμοσφαιρίνη S (HbS) που οδηγεί στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, όπου μια μετάλλαξη στη βήτα αλυσίδα προκαλεί τον πολυμερισμό της αιμοσφαιρίνης υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, οδηγώντας σε δρεπανοειδή ερυθρά αιμοσφαίρια.

**5. Εμβρυονικές αιμοσφαιρίνες:** Εκφράζονται στο ανθρώπινο έμβρυο κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και αντικαθίστανται από HbF καθώς προχωρά η ανάπτυξη. Παραδείγματα περιλαμβάνουν τις αιμοσφαιρίνες Gower-1 ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ), Gower-2 ( $\alpha_2\varepsilon_2$ ) και Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ).



**Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της αιμοσφαιρίνης A (HbA).** (A) αναπαράσταση της τεταρτοταγούς δομής της αιμοσφαιρίνης. (B) χωροπληρωτικό μοντέλο. Η τεταρτοταγής δομή της αιμοσφαιρίνης A περιλαμβάνει, τυπικά, δύο αλφα ( $\alpha$ ) και δύο βήτα ( $\beta$ ) πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Κάθε μία από αυτές τις αλυσίδες περιέχει μια ομάδα αίμης. Κάθε ομάδα αίμης αποτελείται από μια δομή που μοιάζει με δακτύλιο (πορφυρίνη) με ένα άτομο σιδήρου στο κέντρο της. Αυτό το άτομο σιδήρου είναι ζωτικής σημασίας, καθώς εκεί δεσμεύεται το οξυγόνο. Στη δομή της HbA, οι αλυσίδες άλφα και βήτα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τις αντίστοιχες ομάδες αίμης τους για να σχηματίσουν μια λειτουργική μονάδα ικανή να μεταφέρει οξυγόνο, μέσω συνεργειακής πρόσδεσης. Αυτή η πρόσδεση επιτρέπει στην αιμοσφαιρίνη να μεταφέρει αποτελεσματικά οξυγόνο από τους πνεύμονες σε διάφορους ιστούς του σώματος και στη συνέχεια να μεταφέρει το διοξείδιο του άνθρακα πίσω στους πνεύμονες για εκπνοή. [τροποποιημένη από (Berg and Tymoczko 2018)].



*Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των γενετικών θέσεων/γονιδιακών τόπων των ανθρώπινων α-σφαιρίνης και β-σφαιρίνης και χρονική έκφραση των διαφόρων τύπων αιμοσφαιρίνης. Η συστοιχία γονιδίων του γονιδιακού τόπου α-σφαιρίνης εδράζεται στο χρωμόσωμα 16 και του γονιδιακού τόπου β-σφαιρίνης στο χρωμόσωμα 11. Αναφέρονται οι αιμοσφαιρίνες που εκφράζονται σε κάθε χρονικό στάδιο, όπως υποδεικνύεται στη γραμμή χρόνου στο κάτω μέρος. HbF, εμβρυϊκή αιμοσφαιρίνη; και HbA, αιμοσφαιρίνη ενηλίκων. Η Ρυθμιστική Περιοχή Γονιδιακού Τόπου των αιμοσφαιρινών (Locus Control Region - LCR) στη θέση αιμοσφαιρίνης στο χρωμόσωμα 11 είναι ένας ενισχυτής που δρα βασικό ρυθμιστικό στοιχείο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, ιδιαίτερα σημαντικό στο πλαίσιο της ρύθμισης των γονιδίων της αιμοσφαιρίνης. Η LCR είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή έκφραση του συμπλέγματος γονιδίων β-σφαιρίνης, το οποίο περιλαμβάνει αρκετά γονίδια σφαιρίνης που ομοιάζουν με την αλυσίδα β. Τροποποιημένη από (Wilber, Nienhuis et al. 2011).*

Η δομή της κύριας αιμοσφαιρίνης στους ενήλικες, της αιμοσφαιρίνης A (HbA, με σύσταση αλυσίδων  $\alpha_2\beta_2$ ) παρουσιάζεται στην **Εικόνα 1**. Η δομή αυτή επιτρέπει την συνεργιστική δράση των τεσσάρων αλυσίδων για την αποδοτικότερη δέσμευση οξυγόνου.

Συνολικά, οι διαφορετικοί τύποι αιμοσφαιρίνης, με βάση μικρές διαφορές στη λειτουργικότητα αλλά και το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης εξυπηρετούν τη μεταφορά οξυγόνου σε διαφορετικές συνθήκες και αναπτυξιακά στάδια. Η δομική οργάνωση των γονιδίων σφαιρίνης και του προτύπου έκφρασης τους συνοψίζονται στην **εικόνα 2**.

Τα τελευταία 75 έτη, η μελέτη της ανθρώπινης αιμοσφαιρίνης, πιθανώς περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο βιολογικό μόριο, συνέβαλε στην ωρίμανση των κλάδων της Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας αλλά και στη γέννηση της Μοριακής Ιατρικής. Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, το πρωτοποριακό έργο επιστημόνων όπως οι Linus Pauling, Max Perutz, Vernon Ingram, Karl Singer, Herman Lehmann και πολλών άλλων, έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην κατανόησή μας για τη μοριακή βάση της φυσιολογικής λειτουργίας της αιμοσφαιρίνης, των σχέσεων δομής-λειτουργίας των ασθενειών της αλλά και της εν δυνάμει θεραπείας τους που είναι πιθανώς απaráμιλλη στην ιατρική. Οι μελέτες σε αυτό το πεδίο παρείχαν το πρότυπο για τις εξελίξεις σε πολλούς άλλους τομείς έρευνας στην αιματολογία και άλλες υποειδικότητες. Η κατανόηση της παθοφυσιολογίας των αιμοσφαιρινοπαθειών επιτρέπουν το σχεδιασμό εξειδικευμένων θεραπειών, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής θεραπείας, που επιχειρεί τη διόρθωση γενετικών βλαβών που σχετίζονται με αυτές τις ασθένειες (Schechter 2008).

## 1.2 Εισαγωγή στις αιμοσφαιρινοπάθειες

Οι αιμοσφαιρινοπάθειες είναι μια ομάδα κληρονομικών διαταραχών που προκύπτουν από μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες (σφαιρίνες) της αιμοσφαιρίνης και αποτελούν τις πιο κοινές μονογονιδιακές διαταραχές παγκοσμίως (Williams and Weatherall 2012). Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφάνιση αυτής της ομάδας ασθενειών είναι παραλλαγές DNA μέσα ή κοντά στα γονίδια που κωδικοποιούν τις αλυσίδες (Steinberg, Forget et al. 2009). Αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν σε αλλαγές της στερεοδιάταξης στο μόριο της αιμοσφαιρίνης, επηρεάζοντας τη λειτουργία, την έκφραση ή/και τη σταθερότητά του. Οι μοριακοί και βιοχημικοί μηχανισμοί που αποτελούν το υπόβαθρο αυτών των διαταραχών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ευρέως σε δύο κύριους τύπους: α) ποσοτικές αιμοσφαιρινοπάθειες, όπως οι θαλασσαιμίες, στις οποίες υπάρχει μηδενική ή μειωμένη παραγωγή αιμοσφαιρίνης και β) ποιοτικές αιμοσφαιρινοπάθειες, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία, στις οποίες παράγεται παθολογική αιμοσφαιρίνη με ανώμαλη δομή (Clarke and Higgins 2000, Atweh, DeSimone et al. 2003, Steinberg, Forget et al. 2009, Harteveld, Achour et al. 2022).

α) Ποσοτικές αιμοσφαιρινοπάθειες. Οι θαλασσαιμίες προκαλούνται από μεταλλάξεις που οδηγούν σε ποσοτική αλλαγή (μειωμένη σύνθεση ή απουσία) μιας εκ των αλυσίδων σφαιρίνης (α ή β) που αποτελούν βασικό δομικό συστατικό της κύριας αιμοσφαιρίνης των ενηλίκων (HbA). Κατηγοριοποιούνται δε, περαιτέρω, σε α- και β-θαλασσαιμία αντίστοιχα, ανάλογα με την αλυσίδα που επηρεάζεται. Η ποσοτική ανισορροπία στην παραγωγή αλυσίδων σφαιρίνης που αποτελεί κοινή συνιστώσα στις θαλασσαιμίες αυτές, οδηγεί σε αναποτελεσματική ερυθροποίηση (παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων) και συμπτώματα αναιμίας.

Η α-θαλασσαιμία προκύπτει ως αποτέλεσμα σημειακών μεταλλάξεων ή δομικών αλλαγών τύπου έλλειψης, σε ένα ή περισσότερα από τα τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν τη σύνθεση αλυσίδων α. Ως αποτέλεσμα αυτού, παρατηρείται ανισορροπία στην αναλογία α-προς-β αλυσίδων, που οδηγεί σε περίσσεια β αλυσίδων. Το πλεόνασμα των β αλυσίδων σχηματίζει ασταθή τετραμερή (β<sub>4</sub>), γνωστά ως αιμοσφαιρίνη Η (HbH). Η HbH είναι πιο ευαίσθητη σε οξειδωτικές βλάβες και έχει

κακή ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου. Η συγγενεία της με το οξυγόνο είναι δέκα φορές μεγαλύτερη από την HbA. Ως εκ τούτου εμφανίζει μη φυσιολογική καμπύλη διάστασης οξυαιμοσφαιρίνης. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να συνδεθεί με το οξυγόνο, αλλά δεν το απελευθερώνει ικανοποιητικά στους ιστούς (Steinberg, Forget et al. 2009). Αντίστοιχα, η β-θαλασσαιμία προκύπτει κυρίως από σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο β-σφαιρίνης, που οδηγούν σε μειωμένη ή μηδενική παραγωγή της β αλυσίδας και ακόλουθα της HbA. Οι α αλυσίδες, ελλείπει β αλυσίδων για σύζευξη, σχηματίζουν ασταθή συσσωματώματα που επηρεάζουν αρνητικά τη σταθερότητα της πλασματικής μεμβράνης των ερυθρών αιμοσφαιρίων, οδηγώντας σε πρόωμη κυτταρική καταστροφή (αιμόλυση) (Fibach and Rachmilewitz 2017).

β) Ποιοτικές αιμοσφαιρινοπάθειες. Δομικές παραλλαγές της αιμοσφαιρίνης μπορούν να προκαλούνται από σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια των σφαιρινών που μεταβάλλουν την αλληλουχία αμινοξέων στις αλυσίδων τους, οδηγώντας σε αλλαγές στην στερεοδιάταξη και τη διαμόρφωσή τους στο χώρο (Steinberg, Forget et al. 2009). Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι η δρεπανοκυτταρική αναιμία, που προκαλείται από μια μόνο σημειακή μετάλλαξη στο γονίδιο της β-σφαιρίνης. Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί στην αντικατάσταση του υδρόφιλου γλουταμινικού οξέος με την υδρόφοβη βαλίνη στην έκτη θέση της λειτουργικής β αλυσίδας (Lonerган, Cline et al. 2001). Η τροποποιημένη αιμοσφαιρίνη (HbS) πολυμερίζεται υπό συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου, δημιουργώντας ραβδοειδή συσσωματώματα με επακόλουθα τα ερυθρά αιμοσφαίρια να αποκτούν δρεπανοειδές σχήμα. Τα δρεπανοκύτταρα είναι άκαμπτα και λόγω αυτού εμποδίζουν την κυκλοφορία του αίματος σε τριχοειδή αγγεία προκαλώντας επώδυνες κρίσεις, βλάβη οργάνων όπως σπλήνας και πνεύμονες και αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων λόγω μη λειτουργικότητας του σπληνός. Τα δρεπανοκύτταρα έχουν βραχεία διάρκεια ζωής και καταστρέφονται ταχύτερα από τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα, οδηγώντας σε εμφάνιση συμπτωμάτων αναιμίας (Lonerган, Cline et al. 2001). Η δρεπανοκυτταρική αναιμία έχει περιγραφεί ως η πρώτη “μοριακή ασθένεια” από τον πρωτοπόρο Linus Pauling και την ομάδα του (Pauling, Itano et al. 1949). Ποικίλες δομικές αλλαγές στο μόριο της αιμοσφαιρίνης οδηγούν σε παραλλαγές όπως η αιμοσφαιρίνη C, E και D, η καθεμία από τις οποίες προκύπτει από πληθώρα διαφορετικών σημειακών μεταλλάξεων στα γονίδια α ή β σφαιρίνης. Αυτές οι παραλλαγές δύνανται να τροποποιήσουν τη σταθερότητα ή την ικανότητα της

αιμοσφαιρίνης να μεταφέρει οξυγόνο και έχουν μελετηθεί διεξοδικά με ποικίλες μεθόδους (Fucharoen and Weatherall 2012, Rohlfing, Hanson et al. 2021).

Συνολικά, οι αιμοσφαιρινοπάθειες αντιπροσωπεύουν ένα φάσμα διαταραχών με ποικίλες μοριακές και βιοχημικές επιπτώσεις. Η μειωμένη παραγωγή ή οι παθολογικές αιμοσφαιρίνες διαταράσσουν την παροχή οξυγόνου στους ιστούς, οδηγώντας σε αναιμία και συναφή συμπτώματα καθώς μπορούν να αλλάξουν το σχήμα και την ευελιξία των ερυθρών αιμοσφαιρίων, επηρεάζοντας σημαντικά τη λειτουργικότητα και την επιβίωσή τους. Αυτές οι διαταραχές υπογραμμίζουν τη λεπτή ισορροπία που απαιτείται στη δομή και τη λειτουργία της αιμοσφαιρίνης για την αποτελεσματική μεταφορά οξυγόνου (Harteveld, Achour et al. 2022).

### **1.3 Εισαγωγή στη β-θαλασσαιμία**

Η β θαλασσαιμία εμφανίζει κλινικό ενδιαφέρον αφενός διότι αποτελεί εν δυνάμει μία εκ των σοβαρότερων αιμοσφαιρινοπαθειών και αφετέρου διότι παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ετεροζυγωτών-φορέων και ασθενών σε πολλές περιοχές του πλανήτη.

Ειδικότερα στην Ελλάδα, η β-θαλασσαιμία αντιπροσωπεύει μια σημαντική ανησυχία για τη δημόσια υγεία λόγω του υψηλού επιπολασμού της, θέτοντας περίπλοκες προκλήσεις για τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης και τις υπηρεσίες γενετικής συμβουλευτικής. Η εξέχουσα θέση της νόσου στον ελληνικό πληθυσμό αποδίδεται στο επιλεκτικό πλεονέκτημα των φορέων β-θαλασσαιμίας έναντι της ελονοσίας που προσέφερε μια ιστορική πίεση επιλογής όπου η ελονοσία κάποτε ήταν ενδημική στην περιοχή. Κατά συνέπεια, ένα σημαντικό μέρος του ελληνικού πληθυσμού είναι φορείς του γονιδίου της β-θαλασσαιμίας, οδηγώντας σε υψηλότερη επίπτωση της κλινικά σημαντικής νόσου σε σύγκριση με πολλές μη μεσογειακές χώρες. Ως εκ τούτου, το επιστημονικό ενδιαφέρον για τη β-θαλασσαιμία στην Ελλάδα ήταν έντονο, εστιάζοντας σε διάφορες πτυχές όπως η γενετική επιδημιολογία, η παθοφυσιολογία, οι νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις συμπεριλαμβανομένης της

γονιδιακής θεραπείας και της μεταμόσχευσης μυελού των οστών και τα προγράμματα προγεννητικής διάγνωσης και προσυμπτωματικού ελέγχου.

### **1.3.1 Ανακάλυψη και ιστορία β θαλασσαιμίας**

Η β θαλασσαιμία, έχει μια πλούσια ιστορία συνυφασμένη με την ανάπτυξη του ανθρώπινου πολιτισμού ανά τους αιώνες, τη μετανάστευση και τις ιατρικές εξελίξεις (De Sanctis, Kattamis et al. 2017).

Η β θαλασσαιμία πιθανότατα προήλθε πριν από χιλιάδες χρόνια στην περιοχή της Μεσογείου, στη Μέση Ανατολή και στη Νότια Ασία. Αυτές οι περιοχές είχαν ιστορικά υψηλά κρούσματα ελονοσίας και οι φορείς της θαλασσαιμίας είχαν πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι της ελονοσίας, γεγονός που υποστηρίζει τη διάδοση του γενετικού χαρακτηριστικού μέσω της φυσικής επιλογής (Clegg and Weatherall 1999). Οι ανθρώπινες μεταναστεύσεις κατά τη διάρκεια των αιώνων έχουν εξαπλώσει τη β-θαλασσαιμία σε άλλα μέρη του κόσμου (Angastiniotis, Petrou et al. 2021). Το διατλαντικό δουλεμπόριο, για παράδειγμα, φαίνεται ότι εισήγαγε το χαρακτηριστικό στην Αμερική (Lindenau, Wagner et al. 2016).

Αν και κλινικά χαρακτηριστικά της θαλασσαιμίας αναγνωρίστηκαν αρχικά κατά την αρχαιότητα, μόλις τον 20ο αιώνα η πάθηση περιγράφηκε επιστημονικά. Το 1925, ο Thomas Cooley ανέφερε για πρώτη φορά μια μορφή σοβαρής αναιμίας σε παιδιά ιταλικής καταγωγής, η οποία αργότερα έγινε γνωστή ως αναιμία του Cooley ή μείζονα β θαλασσαιμία (TB 1925). Η γενετική βάση της β θαλασσαιμίας αποκαλύφθηκε στα μέσα του 20ου αιώνα. Βρέθηκε ότι προκύπτει από μεταλλάξεις στο γονίδιο HBB το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 11, οδηγώντας σε μειωμένη ή απουσία παραγωγής της αλυσίδας β σφαιρίνης της αιμοσφαιρίνης (Galanello and Origa 2010).

Οι αρχικές θεραπείες ήταν περιορισμένες και επικεντρώθηκαν κυρίως στις μεταγγίσεις αίματος, για να αντιμετωπίσουν την αναιμία. Στα τέλη του 20ου και στις αρχές του 21ου αιώνα σημειώθηκε σημαντική πρόοδος, συμπεριλαμβανομένης της επιτυχημένης θεραπείας με χηλικούς παράγοντες για τη διαχείριση της υπερφόρτωσης σιδήρου (παρενέργεια των συχνών μεταγγίσεων), καθώς και της προοπτικής μεταμόσχευσης μυελού των οστών. Καθώς η β-θαλασσαιμία αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την υγεία ενός πληθυσμού, ιδιαίτερα σε περιοχές όπου το χαρακτηριστικό ήταν ιστορικά διαδεδομένο, όπως η Ελλάδα, ο προσυμπτωματικός έλεγχος νεογνών, η γενετική συμβουλευτική και η προγεννητική διάγνωση αποτελούν μέρος των στρατηγικών για τη διαχείριση και την αντιμετώπιση αυτής της κλινικής κατάστασης (Steinberg, Forget et al. 2009). Πιο πρόσφατα, η γονιδιακή θεραπεία έχει εμφανιστεί ως μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση, με την αντιμετώπιση της αιτίας της ασθένειας και όχι μόνο τον έλεγχο των συμπτωμάτων που αποτελούν αποτέλεσμα των βιοχημικών της εκδηλώσεων (Cao and Galanello 2010).

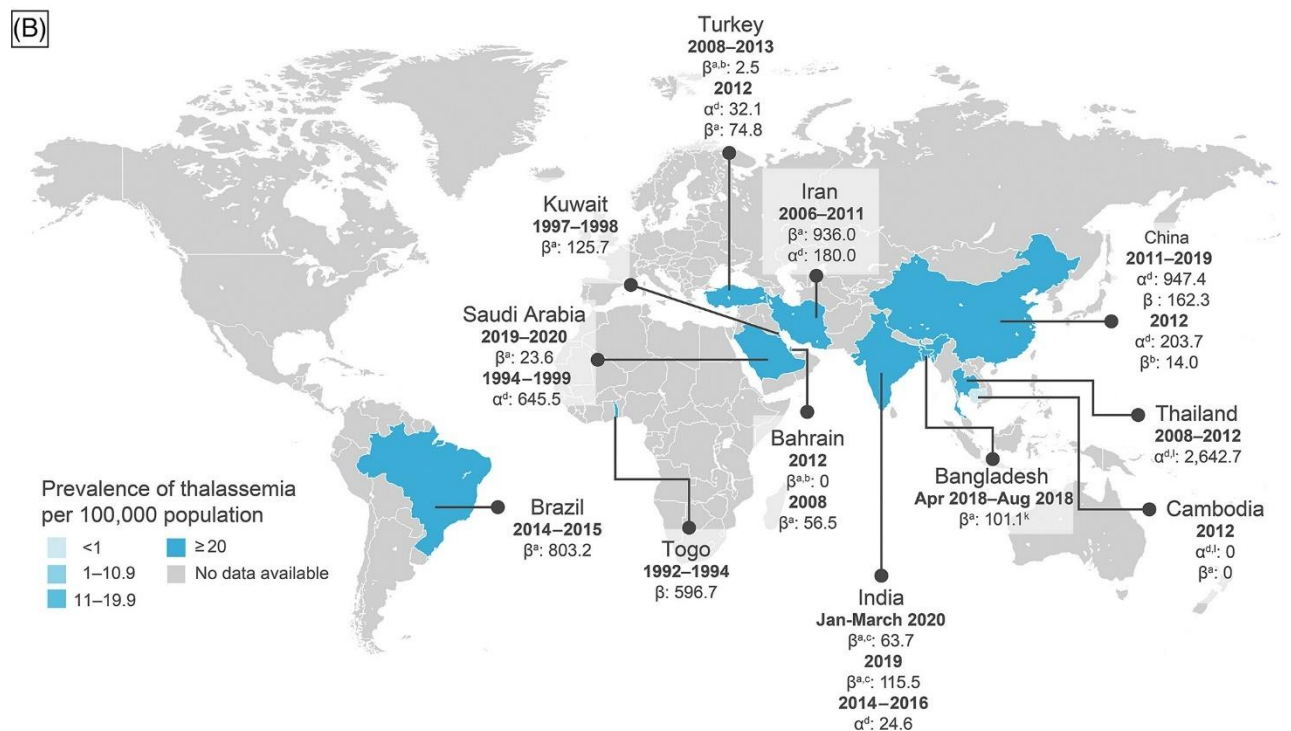
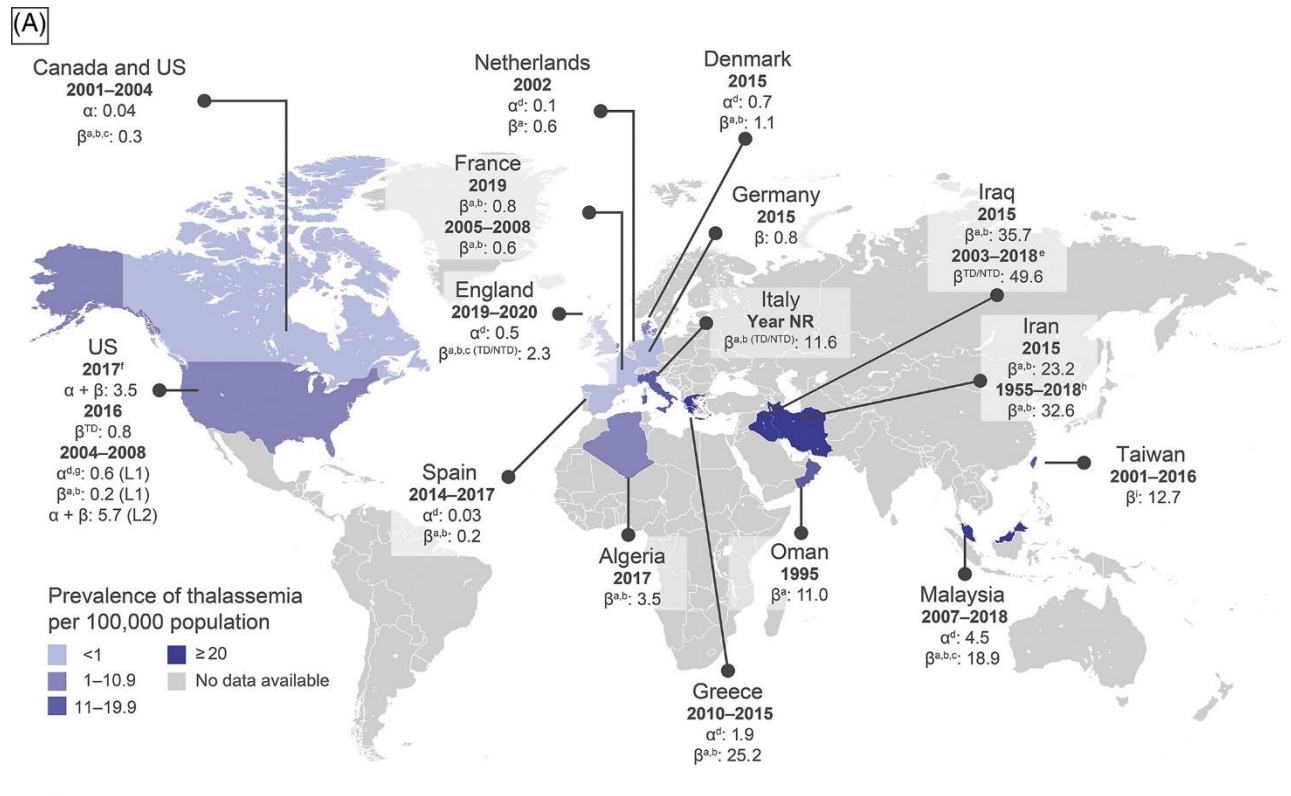
Αυτή η ιστορική προοπτική για τη β-θαλασσαιμία υπογραμμίζει όχι μόνο τις βαθιές ρίζες της ασθένειας στην ανθρώπινη ιστορία, αλλά και το αξιοσημείωτο ταξίδι από την πρώιμη αναγνώρισή της στις προηγμένες θεραπείες που είναι διαθέσιμες σήμερα. Η συνεχιζόμενη έρευνα και οι πρόσφατες εξελίξεις στο τομέα της μοριακής και εξατομικευμένης ιατρικής υπόσχονται ακόμη πιο αποτελεσματική κλινική διαχείριση αυτής της κατάστασης στο μέλλον αλλά και την διαθεσιμότητα αποτελεσματικών θεραπειών για το σύνολο των ασθενών (Fibach and Rachmilewitz 2017).

### **1.3.2 Επιδημιολογία και παγκόσμιος αντίκτυπος**

Η θαλασσαιμία είναι η πιο κοινή μονογονιδιακή κληρονομική νόσος παγκοσμίως. Ιστορικά, προήλθε και εξαπλώθηκε στη Μεσόγειο, τη Μέση Ανατολή και τη Νοτιοανατολική Ασία, παράλληλα με την εμφάνιση της ελονοσίας (οι φορείς των γονιδίων β εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο παράσιτο της ελονοσίας, το πρωτόζωο πλασμώδιο). Ο επιπολασμός της β θαλασσαιμίας παραμένει ιδιαίτερα υψηλός σε περιοχές με ιστορικό γάμων μεταξύ συγγενών, όπως η Μεσόγειος, η Μέση Ανατολή



και μέρη της Ασίας (Clegg and Weatherall 1999). Ωστόσο, με την αυξημένη παγκόσμια μετανάστευση και την ελεύθερη διακίνηση πληθυσμών, η διαταραχή εντοπίζεται πλέον σε πολλά μέρη του κόσμου (Modell and Darlison 2008) και η επίπτωσή τους (Incidence) αυξάνεται σταθερά (Modell and Darlison 2008).



**Εικόνα 3: (Α) Επιπολασμός κλινικά σημαντικής θαλασσαιμίας ανά 100 000 άτομα όπως αναφέρθηκαν σε πληθυσμιακές μελέτες σε όλο τον κόσμο. Για ορισμένες χώρες, αναφέρθηκαν μόνο άλφα-θαλασσαιμία ή βήτα-θαλασσαιμία. Στον χάρτη, ο παρουσιάζεται ο τύπος θαλασσαιμίας που μελετήθηκε καθώς και ο επιπολασμός ανά 100 000 άτομα και ανά χώρα. Εμφανίζονται επίσης ημερομηνίες μελέτης, ενώ για χώρες**

με διαθέσιμα δεδομένα επιπολασμού για πάνω από μία χρονική περίοδο (Αγγλία, Ιράν), τα πιο πρόσφατα δεδομένα είχαν προτεραιότητα στο σχήμα. (B) **Επιπολασμός κλινικά σημαντικής θαλασσαιμίας ανά 100 000 που αναφέρθηκαν σε μη πληθυσμιακές μελέτες σε όλο τον κόσμο.** Για χώρες με διαθέσιμα δεδομένα επιπολασμού για πάνω από μία χρονική περίοδο (Μπαχρέιν, Κίνα, Ινδία, Τουρκία), τα πιο πρόσφατα δεδομένα είχαν προτεραιότητα στο σχήμα. α, άλφα-θαλασσαιμία; β, βήτα-θαλασσαιμία; CLIA, Clinical Laboratory Improvement Amendments; Hb Bart's, αιμοσφαιρίνη Bart's; HbE, αιμοσφαιρίνη E; HbH, αιμοσφαιρίνη H; ICD, Διεθνής Ταξινόμηση Νοσημάτων; NR, δεν αναφέρθηκε. NTD μη εξαρτώμενη από μετάγγιση. RBCT, μετάγγιση ερυθρών αιμοσφαιρίων. TD, εξαρτώμενη από μετάγγιση. TI, ενδιάμεση θαλασσαιμία; TM, μείζων θαλασσαιμία. Τροποποιημένη από (Musallam, Lombard et al. 2023).

Ο επιπολασμός της β θαλασσαιμίας την έχει καταστήσει σημαντικό παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) εκτιμά ότι περίπου το 1,5% του παγκόσμιου πληθυσμού φέρει ένα γενετικό χαρακτηριστικό για τη θαλασσαιμία, με περίπου 60.000 μωρά να γεννιούνται με σοβαρή θαλασσαιμία κάθε χρόνο. Αυτοί οι εξαιρετικά υψηλοί αριθμοί υπογραμμίζουν τη σημασία της εύρεσης αποτελεσματικών θεραπειών για αυτή τη διαταραχή (Kattamis, Forni et al. 2020). Αν και ο συνολικός αριθμός ασθενών με τη νόσο και εκείνων που είναι φορείς είναι γνωστός στις περισσότερες χώρες, σημαντικές διακυμάνσεις προκύπτουν ακόμη και σε μικρές γεωγραφικές περιοχές (Colah, Gorakshakar et al. 2010, De Sanctis, Kattamis et al. 2017).

Μία συστηματική βιβλιογραφική ανασκόπηση που αξιολόγησε τον αντίκτυπο σε παγκόσμιο επίπεδο και το ποσοστό γεννήσεων ατόμων με σημαντικές μορφές α- και β-θαλασσαιμίας αποκαλύπτει σημαντικά επιδημιολογικά στοιχεία (Musallam, Lombard et al. 2023). Τα αποτελέσματα της μελέτης συνοψίζονται στην **Εικόνα 3**.

Η ανασκόπηση καλύπτει μελέτες που δημοσιεύθηκαν μεταξύ 1ης Ιανουαρίου 2000 και 21 Σεπτεμβρίου 2021 και περιελάμβανε αναζήτηση βάσεων δεδομένων όπως το Embase, το MEDLINE και η Βιβλιοθήκη Cochrane. Από 2.093 αναγνωρισμένες εγγραφές, 69 μελέτες σε 70 δημοσιεύσεις κρίθηκαν επιλέξιμες, ενώ άλλες έξι εγγραφές βρέθηκαν μέσω αναζητήσεων βιβλιογραφίας. Η μελέτη αποκάλυψε ότι ο επιπολασμός

της θαλασσαιμίας ποικίλλει πολύ όχι μόνο μεταξύ των διαφόρων χωρών αλλά και εντός αυτών. Ο συνδυασμένος επιπολασμός της α- και β-θαλασσαιμίας ανά 100.000 άτομα κυμαινόταν από 0,2 στην Ισπανία (2014–2017) έως και 25,2 στην Ελλάδα (2010–2015). Μόνο ο επιπολασμός της α-θαλασσαιμίας κυμαινόταν από 0,03 στην Ισπανία έως 4,5 στη Μαλαισία, ενώ ο επιπολασμός της β-θαλασσαιμίας κυμαινόταν από 0,2 στην Ισπανία έως μεταξύ 35,7 και 49,6 στο Ιράκ (Musallam, Lombard et al. 2023).

Πέρα από τις σημαντικές επιπτώσεις στα άτομα και τις οικογένειες τους, τα επιδημιολογικά δεδομένα φανερώνουν ότι η β θαλασσαιμία έχει ευρείες κοινωνικές και οικονομικές συνέπειες, ειδικά σε χώρες με υψηλό αριθμό νοσούντων, όπως η Ελλάδα. Στην ενημερωμένη έκθεση του Εθνικού Μητρώου Αιμοσφαιρινοπαθειών στην Ελλάδα (NRHG), δεδομένα από τριάντα οκτώ μονάδες σε όλη την επικράτεια, που συλλέχθηκαν μεταξύ Ιανουαρίου 2010 και Δεκεμβρίου 2015, παρουσιάζουν ένα αριθμό 4032 ασθενών, με το 52,06% να έχει διαγνωστεί με μείζονα θαλασσαιμία που απαιτεί τακτικές μεταγγίσεις, το 21,65% με ενδιάμεση, και το 25,6% με δρεπανοκυτταρική αναιμία. Αυτό το ολοκληρωμένο σύνολο δεδομένων υπογραμμίζει την εκτεταμένη κάλυψη του μητρώου και τον επιπολασμό των αιμοσφαιρινοπαθειών στον ελληνικό πληθυσμό, παρέχοντας μια θεμελιώδη βάση για προσαρμοσμένες πρωτοβουλίες δημόσιας υγείας και ιατρικές παρεμβάσεις (Voskaridou, Kattamis et al. 2019).

Η διαχείριση της πάθησης συχνά περιλαμβάνει δια βίου ιατρική φροντίδα, συμπεριλαμβανομένων των μεταγγίσεων αίματος και της θεραπείας αποσιδήρωσης, η οποία επιβαρύνει σημαντικά τα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης. Επιπλέον, δεν μπορεί να υποεκτιμηθεί το συναισθηματικό βάρος στα άτομα που επηρεάζονται όπως και στις οικογένειές τους. Οι συνέπειες της ασθένειας επιβάλουν την διερεύνηση νέων προσεγγίσεων θεραπείας, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής θεραπείας.

## 1.4 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Αυτό το δοκίμιο στοχεύει να παρέχει μια ολοκληρωμένη ανασκόπηση της εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας σε άτομα με β θαλασσαιμία. Ενώ οι τρέχουσες θεραπείες όπως οι τακτικές μεταγγίσεις αίματος και η θεραπεία αποσιδήρωσης μπορούν να διαχειριστούν τα συμπτώματα, δεν προσφέρουν οριστική θεραπεία. Η γονιδιακή θεραπεία, ένας ταχέως εξελισσόμενος τομέας της ιατρικής επιστήμης, προσφέρει ελπίδα για μόνιμη θεραπεία που μπορεί να αντιμετωπίσει τη βασική αιτία της διαταραχής, δηλαδή τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με τη μειωμένη σύνθεση της αλυσίδας β.

Το δοκίμιο έχει δομηθεί για να διερευνήσει τις διάφορες πτυχές της β θαλασσαιμίας, από τη μοριακή της βάση και τις κλινικές εκδηλώσεις έως τις τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές και τους περιορισμούς τους, όπως προαναφέρθηκε. Στη συνέχεια εμβαθύνουμε στη γονιδιακή θεραπεία, μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο για την αντιμετώπιση γενετικών και μη-ασθενειών και συζητούμε τις τελευταίες εξελίξεις στον κλάδο. Στα προσεχή κεφάλαια παρουσιάζονται οι δυνατότητες της γονιδιακής θεραπείας για την αντιμετώπιση της β θαλασσαιμίας και οι εν δυνάμει επιπτώσεις.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΚΑΙ ΤΥΠΟΙ Β  
ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑΣ**

## Κεφάλαιο 2: Μοριακή βάση και τύποι β Θαλασσαιμίας

Η β θαλασσαιμία (OMIM #613985) ορίζεται μια ομάδα κληρονομικών διαταραχών του αίματος που χαρακτηρίζονται από μη φυσιολογική παραγωγή αιμοσφαιρίνης A (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ), η οποία προκύπτει από τη μειωμένη σύνθεση των αλυσίδων β σφαιρίνης. Όπως προαναφέρθηκε, αυτή η μείωση της ποσότητας της αλυσίδας β σε σχέση με τις αλυσίδες α-σφαιρίνης προκαλεί ανισορροπία στην παραγωγή αιμοσφαιρίνης και ως εκ τούτου ανώμαλη ερυθροποίηση. Η διαταραχή παρουσιάζει γενετική και κλινική ετερογένεια (Ottolenghi, Lanyon et al. 1975) και προκύπτει συγκεκριμένα κυρίως από σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο HBB, που οδηγεί σε ανεπάρκεια στην παραγωγή αλυσίδας β σφαιρίνης.

Η β θαλασσαιμία είναι μια σύνθετη γενετική διαταραχή με βαθιά επίδραση στους πάσχοντες. Σε αυτό το κεφάλαιο, θα εμβαθύνουμε στις περιπλοκές αυτής της πάθησης, συμπεριλαμβανομένου του ορισμού, των τύπων, της μοριακής βάσης, των κλινικών εκδηλώσεων και των περιορισμών των τρεχουσών θεραπευτικών επιλογών. Η κατανόηση της φύσης της β θαλασσαιμίας είναι απαραίτητη πριν από τη διερεύνηση των δυνατοτήτων της γονιδιακής θεραπείας ως βιώσιμης δια βίου θεραπευτικής επιλογής.

Αυτή η ανεπάρκεια επηρεάζει τη δομή και τη λειτουργία της αιμοσφαιρίνης, με αποτέλεσμα την αναιμία. Οι μεταλλάξεις ταξινομούνται σε αυτές που οδηγούν σε απουσία β σφαιρίνης και ως εκ τούτου προκαλούν την  $\beta^0$  θαλασσαιμία. Αντίστοιχα μεταλλάξεις που οδηγούν σε μειωμένη ποσότητα ανιχνεύσιμης β σφαιρίνης προκαλούν  $\beta^+$  θαλασσαιμία (Amberger, Bocchini et al. 2019).

Για κλινικούς σκοπούς, η β-θαλασσαιμία χωρίζεται σε μείζονα θαλασσαιμία (εξαρτώμενη από μετάγγιση), ενδιάμεση θαλασσαιμία (μέσης βαρύτητας, μη εξαρτώμενη από μετάγγιση) και ελάσσονα θαλασσαιμία (ασυμπτωματική, κατάσταση φορέα) (Olivieri 1999). Στις υποενότητες που ακολουθούν γίνεται ανάλυση των μοριακών μηχανισμών παθογένεσης, των κλινικών συμπτωμάτων, καθώς και των θεραπευτικών επιλογών της ασθένειας.

## 2.1 Κατανόηση των μεταλλάξεων του γονιδίου HBB

Για την πλήρη κατανόηση της β θαλασσαιμίας, είναι απαραίτητο να διερευνηθεί η μοριακή βάση της διαταραχής. Το γονίδιο HBB μπορεί να φέρει μεταλλάξεις οι οποίες να έχουν κληροδοτηθεί από τον έναν ή και τους δύο γονείς, οδηγώντας σε διαφορετικά επίπεδα ανεπάρκειας β σφαιρίνης.

### 2.1.1 ταξινόμηση μεταλλάξεων

Σε μοριακό επίπεδο, η β θαλασσαιμία αποτελεί κυρίως αποτέλεσμα μεταλλάξεων στην γενετική θέση που εδράζεται το γονίδιο HBB, και συγκεκριμένα στο χρωμόσωμα 11 και τη θέση του βραχίονα 11p15.4. Η συγκεκριμένη χρωμοσωμική περιοχή περιέχει επίσης το γονίδιο δ σφαιρίνης, το εμβρυϊκό γονίδιο ε, το εμβρυϊκό Α-γ και G-γ γονίδια και ένα ψευδογονίδιο (B1). Τα γονίδια των πέντε λειτουργικών σφαιρινών είναι διατεταγμένα με τη σειρά της αναπτυξιακής τους έκφρασης (όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2**).

Το γονίδιο HBB έχει μήκος 1,6 Kb και η αλληλουχία του περιλαμβάνει τρία εξώνια, δύο εσώνια καθώς και 5'- 3' αμετάφραστες περιοχές (UTRs). Το HBB ρυθμίζεται από έναν παρακείμενο υποκινητή, που φέρει πλαίσια TATA, CAAT και CACCC. Ένας ισχυρός ενισχυτής που αποτελεί μια σημαντική ρυθμιστική περιοχή, χαρτογραφείται 50 Kb ανοδικά από το γονίδιο βήτα σφαιρίνης (**Εικόνα 2**). Αυτή η περιοχή, ονομάστηκε Ρυθμιστική Περιοχή Γονιδιακού Τόπου των αιμοσφαιρινών (Locus Control Region - LCR) που περιέχει τέσσερις περιοχές (HS-1 έως HS-4) υπερευαίσθησίας σε DNAση (HSs), οι οποίες αποτελούν χαρακτηριστικό γνώρισμα αλληλεπίδραση DNA-πρωτεΐνης. Κάθε θέση HS αποτελείται από πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων οι σημαντικότεροι είναι οι GATA-1, GATA-2, KLF1(Cao and Galanello 2010).



Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων HbVar, που αποτελεί σημείο αναφοράς στη μοριακή μελέτη της ασθένειας, έχουν ταυτοποιηθεί 266 μεταλλάξεις του γονιδίου που σχετίζονται με β θαλασσαιμία (Giardine, Joly et al. 2021), όπως παρουσιάζεται στον **Πίνακα 1**. Τα δεδομένα συμφωνούν με μία βάση δεδομένων που αναπτύχθηκε πρόσφατα, την IthaPhen (Xenophonos, Minaidou et al. 2023). Η βάση δεδομένων IthaPhen περιλαμβάνει φαινοτυπικό χαρακτηρισμό για την πλειοψηφία των μεταλλάξεων που αναφέρονται στην βάση HbVar, επαληθεύοντας την κλινική τους σημασία.

*Πίνακας 1. Σύνοψη μεταλλάξεων του γονιδίου β, ανά κατηγορία θαλασσαιμίας, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων HbVar.*

[πηγή: HbVAR, έκδοση 2023 (Giardine, Joly et al. 2021)].

Τύπος αιμοσφαιρινοπάθειας	Αριθμός μοναδικών αλληλομόρφων
β <sup>0</sup> θαλασσαιμία	166
β <sup>+</sup> θαλασσαιμία	67
β <sup>0</sup> ή β <sup>+</sup> θαλασσαιμία (αδιευκρίνιστη)	34
μη παθογόνες μεταλλάξεις	669
<b>Σύνολο:</b>	<b>953</b>

Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι σημειακές. Για τους δύο τύπους μεταλλάξεων υπάρχουν 3 κύριοι μηχανισμοί:

1. Μεταλλάξεις σε εσώνια / επηρεάζουν την επεξεργασία του mRNA:
  - a. Δημιουργούν ένα νέο σημείο ματίσματος μέσα σε ένα εσώνιο, που οδηγεί σε μη φυσιολογικό μάτισμα σε ένα ποσοστό των mRNA, ωστόσο, τα υπόλοιπα mRNA είναι φυσιολογικά και παράγουν κανονικά β σφαιρίνη. Οι μεταλλάξεις αυτές χαρακτηρίζονται ως β<sup>+</sup> μεταλλάξεις.

- b. Μερικές μεταλλάξεις αυτού του τύπου καταστρέφουν τις φυσιολογικές θέσεις ματίσματος mRNA που εμποδίζουν πλήρως την παραγωγή της σύνθεσης mRNA β σφαιρίνης. Αποτελούν μεταλλάξεις β<sup>0</sup>.
- 2. Μεταλλάξεις περιοχής υποκινητή / επηρεάζουν την μεταγραφή: Μειώνουν τα επίπεδα μεταγραφής ως και 75 - 80%. Δημιουργούνται σημαντικά λιγότερες φυσιολογικές αλυσίδες βήτα σφαιρίνης. Αποτελούν μεταλλάξεις β<sup>+</sup>.
- 3. Μεταλλάξεις στην κωδικεύουσα περιοχή / επηρεάζουν τη μετάφραση:
  - a. Μεταλλάξεις δημιουργίας κωδικονίου τερματισμού, οι οποίες τελικά διακόπτουν πρόωρα τη μετάφραση. Αποτελούν μεταλλάξεις β<sup>0</sup>.
  - b. Μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης αποτρέποντας, τη σύνθεση β σφαιρίνης. Αποτελούν μεταλλάξεις β<sup>0</sup>.

Συνεχώς ανακαλύπτονται νέες μεταλλάξεις που σχετίζονται με φαινότυπους β θαλασσαιμίας, με χαρακτηριστικό ένα πρόσφατο παράδειγμα ατόμων που εμφάνιζαν έλλειψη στην γονιδιακή περιοχή των σφαιρινών β που προκάλεσε ετερόζυγη εγδβ-θαλασσαιμία (εγδβ-thal) σε τρεις γενιές μιας ελληνικής οικογένειας. Η «ελληνική διαγραφή» όπως ονομάστηκε έχει μήκος περίπου 72 kb, εκτείνεται από την υπερευαίσθητη θέση 4 (HS4) στην περιοχή ελέγχου θέσης (LCR) έως το 3' άκρο του γονιδίου της β-σφαιρίνης, περιλαμβάνοντας έτσι ολόκληρο το σύμπλεγμα γονιδίων β-σφαιρίνης. Η διαγραφή προκάλεσε σοβαρή αλλά παροδική νεογνική αναιμία και μια κατάσταση χρόνιας αιμολυτικής αναιμίας που δεν εξαρτάται από τη μετάγγιση αργότερα στη ζωή και μοιάζει με την ήπια ενδιάμεση β-θαλασσαιμία (Makis, Georgiou et al. 2021). Μεταλλάξεις σε γονίδια άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών της αιμοποίησης, όπως ο μεταγραφικός παράγοντας KLF1, μπορούν να οδηγήσουν σε φαινότυπους που παρομοιάζουν τη β θαλασσαιμία (Catapano, Sessa et al. 2023).

Οι πιο κοινές, χαρακτηρισμένες μεταλλάξεις του γονιδίου HBB και ο αντίκτυπος τους συνοψίζονται στον **Πίνακα 2**.

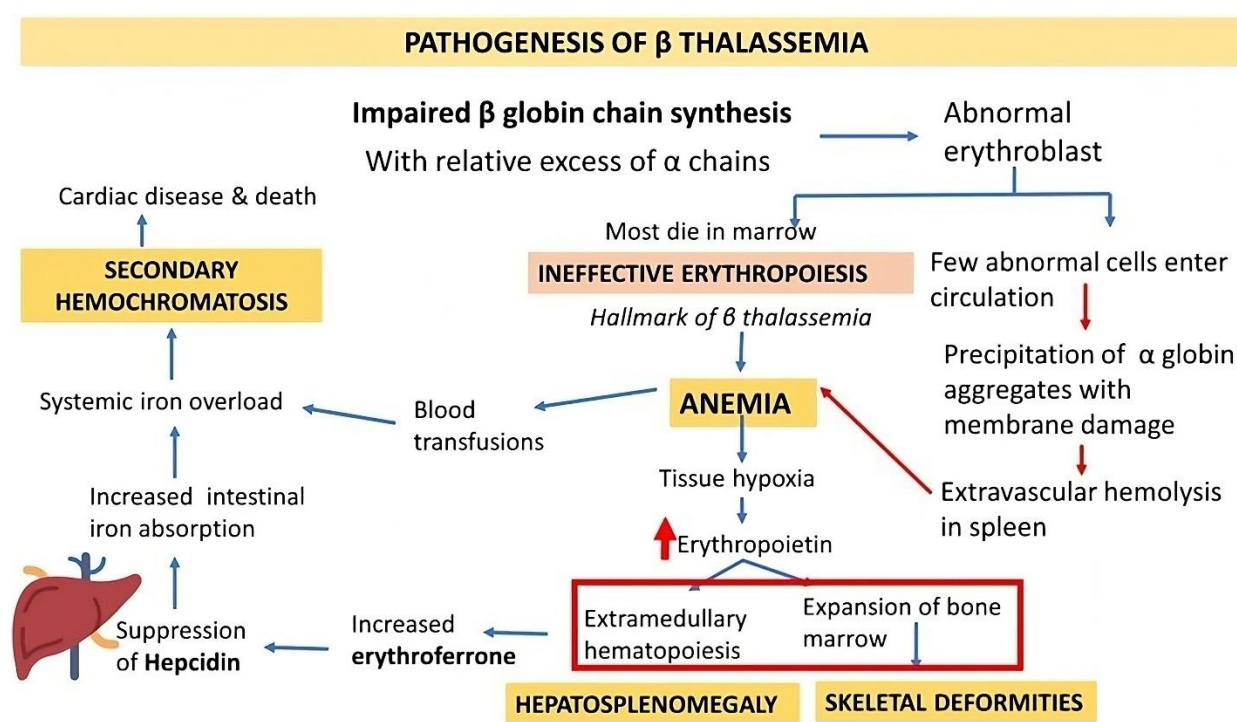
**Πίνακας 2:** κοινές μεταλλάξεις στο γονίδιο *HBB* που προκαλούν β θαλασσαιμία

[τροποποιημένο από (Cao and Galanello 2010)]

Τύπος ή θέση	β <sup>+</sup>	β <sup>0</sup>	
πλαίσιο CACC	-90 C>T	-101 C>T	
	-88 C>T	-92 C>T	
	-88 C>A		
	-87 C>T		
	-87 C>G		
	-87 C>A		
	-86 C>T		
	-86 C>G		
	πλαίσιο TATA	-31 A>G	
		-30 T>A	
-29 A>G			
5' Αμετάφραστη περιοχή	+22 G>A		
	+10-T		
	+33 C>G	+1' A>C	
Εσώνιο/ εναλλακτικό μάτισμα	cd19 A>C (Hb Malay)	cd27 G>T (Hb Knossos)	
	cd24 T>A		
Ομόφωνο μάτισμα	IVS1-6 T>C		
Εσώνιο		IVS2-844 C>G	
3' αμετάφραστη		+6 C>G	
πολυ-A ουρά	AACAAA AATGAA	AATAAG	
Αλλαγή πλαισίου ανάγνωσης	cd6-AA		
	cd8-AA		

## 2.2 Παθοφυσιολογία και Κλινικές εκδηλώσεις

Η παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας παρουσιάζεται στην **Εικόνα 4**.



*Εικόνα 4: Σύνοψη της παθοφυσιολογίας της β θαλασσαιμίας [πηγή: ilovepathology.com].*

Συνοπτικά η παθοφυσιολογία της ασθένειας ακολουθεί μία σειρά από καθορισμένα στάδια. Λόγω των μεταλλάξεων στην αλυσίδα β προκύπτουν πλεονάζουσες αλυσίδες α που κατακρημνίζονται, προκαλώντας βλάβη στη μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων και οδηγώντας σε πρόωρη καταστροφή των ερυθροβλαστών στο μυελό των οστών (αναποτελεσματική ερυθροποίηση) ή/και στα ώριμα ερυθρά αιμοσφαίρια, κυρίως στον σπλήνα (εξωαγγειακή αιμόλυση). Η καταστροφή των ερυθροβλαστών στο μυελό των οστών και η μείωση της διάρκειας ζωής των ερυθρών αιμοσφαιρίων στην κυκλοφορία έχουν ως αποτέλεσμα χρόνια αναιμία.

Σε μοριακό επίπεδο η απουσία ή η μειωμένη παραγωγή της αλυσίδας β-σφαιρίνης, και ανισορροπία α/β-αλυσίδας οδηγεί σε συσσώρευση εξαιρετικά τοξικών ελεύθερων α-αλυσίδων (Makis, Hatzimichael et al. 2016). Η αναποτελεσματική ερυθροποίηση οδηγεί σε αναιμία και, στη συνέχεια, σε ιστική υποξία και υπερέκφραση της ερυθροποιητίνης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση ερυθροβλαστών και την υπερπλασία του μυελού. Ωστόσο, η διαδικασία ωρίμανσης αποτυγχάνει και οι ερυθροβλάστες υποκύπτουν στην απόπτωση (Arlet, Dussiot et al. 2016). Με την πάροδο του χρόνου, ο συνδυασμός ιστικής υποξίας, αυξημένης ερυθροποιητίνης και αναποτελεσματικής ερυθροποίησης δημιουργεί έναν φαύλο κύκλο που τελικά οδηγεί σε μαζική επέκταση των ερυθροβλαστών (Tanno and Miller 2010). Παράλληλα, οι αλυσίδες α-σφαιρίνης απομονώνουν τον μοριακό συνοδό HSP70 στο κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του μεταγραφικού παράγοντα GATA-1 από την κασπάση 3, τελεστή της απόπτωσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διακοπή της ωρίμανσης στο τελικό στάδιο και την απόπτωση στο στάδιο των ερυθροβλαστών (Arlet, Dussiot et al. 2016).

Η χρόνια αναιμία, ως αποτέλεσμα της αδυναμίας διαφοροποίησης και της απόπτωσης των ερυθροβλαστών είναι χαρακτηριστικό της β-θαλασσαιμίας και ενεργοποιεί μια σειρά αντισταθμιστικών μηχανισμών:

1. Αυξημένη ερυθροποίηση: Το σώμα προσπαθεί να αντισταθμίσει την αναιμία αυξάνοντας την παραγωγή ερυθρών αιμοσφαιρίων, η οποία οδηγεί σε επέκταση του μυελού των οστών και μπορεί να προκαλέσει οστικές παραμορφώσεις. Επιπλέον, μπορεί να εμφανιστεί εξωμυελική αιμοποίηση, η οποία είναι η παραγωγή αιμοσφαιρίων εκτός του μυελού των οστών, όπως στον σπλήνα και στο ήπαρ.
2. Υπερφόρτωση σιδήρου: Επειδή ο ανθρώπινος οργανισμός δεν διαθέτει αποτελεσματικό μηχανισμό για την αποβολή της περίσσειας σιδήρου, οδηγούμαστε σε υπερφόρτωση του οργανισμού με σίδηρο. Αυτή η υπερφόρτωση μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε ζωτικά όργανα, συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς, οδηγώντας σε καρδιακές παθήσεις και ενδεχομένως θάνατο.
3. Αυξημένη εντερική απορρόφηση σιδήρου: Το σώμα μπορεί επίσης να αυξήσει την απορρόφηση σιδήρου από το έντερο ως απάντηση στην αναιμία. Αυτό επιδεινώνεται από την καταστολή της επιδίνης - μιας ορμόνης που ρυθμίζει την

απορρόφηση και την απελευθέρωση σιδήρου στο σώμα. Η αυξημένη παραγωγή λόγω αυξημένης ερυθροποίησης καταστέλλει περαιτέρω την εψιδίνη, οδηγώντας σε θετική ανάδραση και μεγαλύτερη απορρόφηση σιδήρου.

Συνολικά, η παθοφυσιολογία της β-θαλασσαιμίας είναι πολύπλοκη και περιλαμβάνει μια πολυσυστημική αλληλεπίδραση μεταξύ της αναποτελεσματικής ερυθροποίησης, της αιμόλυσης, των αντισταθμιστικών αιματοποιητικών αποκρίσεων και του μεταβολισμού του σιδήρου. Οι κλινικές εκδηλώσεις και οι επιπλοκές είναι άμεσο αποτέλεσμα αυτών των παθοφυσιολογικών διεργασιών.

Ακόλουθα, οι κλινικές εκδηλώσεις της β θαλασσαιμίας είναι ποικίλες και μπορεί να κυμαίνονται από ήπιες έως σοβαρές. Τα κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν κόπωση, χλωμό δέρμα, ίκτερο και διευρυμένη σπλήνα. Σε σοβαρές περιπτώσεις, τα άτομα μπορεί να εμφανίσουν πιο απειλητικές για τη ζωή επιπλοκές, όπως καρδιακά προβλήματα, σκελετικές παραμορφώσεις και μειωμένο προσδόκιμο ζωής.

Η βαρύτητα της β θαλασσαιμίας εξαρτάται από τις συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο HBB και τον βαθμό ανεπάρκειας β σφαιρίνης. Όπως προαναφέρθηκε, κλινικά διαχωρίζουμε τη β θαλασσαιμία σε μείζονα και ενδιάμεση, ενώ οι φορείς θεωρούνται μια επιπλέον κατηγορία (Olivieri 1999).

Η μείζων β θαλασσαιμία είναι η πιο σοβαρή μορφή και τυπικά απαιτεί συχνές μεταγγίσεις αίματος, ενώ επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα αλλά και το προσδόκιμο ζωής, που σχετίζονται εν μέρει με την σημαντική υπερφόρτωση σιδήρου. Η ενδιάμεση β θαλασσαιμία είναι λιγότερο σοβαρή και τα άτομα με αυτή τη μορφή μπορεί να μην χρειάζονται μεταγγίσεις, ενώ εμφανίζουν σπανιότερα σημαντική αύξηση σιδήρου. Τέλος, οι φορείς είναι κατά κανόνα ασυμπτωματικοί και εμφανίζουν μόνο κάποια από τα συμπτώματα της ασθένειας.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά της ασθένειας, με βάση την ανωτέρω κλινική ταξινόμηση, παρουσιάζονται στον **πίνακα 3**.

**Πίνακας 3:** Κλινικές εκδηλώσεις β-θαλασσαιμίας

[Πηγή: OMIM (Amberger, Bocchini et al. 2019)].

<b>Μορφή β-θαλασσαιμίας</b>	<b>Κλινικές εκδηλώσεις</b>	<b>Επίπτωση</b>	<b>Αναφορές</b>
<b>Μείζων Θαλασσαιμία</b>	Σοβαρή αναιμία που εμφανίζεται τον πρώτο χρόνο της ζωής. Το επίπεδο της αιμοσφαιρίνης δεν μπορεί να διατηρηθεί πάνω από 5 gm/dl. Προοδευτική ωχρότητα, προβλήματα σίτισης, διάρροια, ευερεθιστότητα, πυρετοί και σπληνομεγαλία.	Με επαρκή μετάγγιση, φυσιολογική ανάπτυξη μέχρι την ηλικία των 10-11 ετών. Στη συνέχεια, κίνδυνος επιπλοκών από υπερφόρτωση σιδήρου. Υψηλό ποσοστό θνησιμότητας πριν από την ηλικία των 35 ετών λόγω μη αποτελεσματικής θεραπείας αποσιδήρωσης (κυρίως πριν το 2000).	(Modell, Khan et al. 2000, Weatherall 2001, Cao and Galanello 2010)
<b>Ενδιάμεση θαλασσαιμία</b>	Ετερογενής κλινική εικόνα. Συμπτώματα περιλαμβάνουν ωχρότητα, ίκτερο, χολολιθίαση, διόγκωση ήπατος και σπλήνα, σκελετικές αλλαγές, έλκη στα πόδια, εξωμυελικές μάζες μυελού των οστών, οστεοπενία και οστεοπόρωση, θρομβωτικές επιπλοκές.	Συνήθως δεν απαιτούνται μεταγγίσεις. Υπερφόρτωση σιδήρου κυρίως από αυξημένη εντερική απορρόφηση λόγω αναποτελεσματικής ερυθροποίησης.	(Camaschella, Bertero et al. 1987, Cao and Moi 2000, Premawardhena, Fisher et al. 2005, Cao and Galanello 2010)
<b>Φορέας β-θαλασσαιμίας</b>	Κλινικά ασυμπτωματικό άτομο.	Χαρακτηρίζεται συνήθως από μικροκυττάρωση, υποχρωμία, αυξημένο επίπεδο HbA <sub>2</sub> , μη	(Camaschella, Bertero et al. 1987, Kulozik, Thein et al. 1987,

ισορροπημένη σύνθεση αλυσίδας α/μη α σφαιρίνης. Περιβαλλοντικοί ή γενετικοί παράγοντες μπορούν να τροποποιήσουν τον φαινότυπο.	Cao and Moi 2000)
--	-------------------

Η αξιοσημείωτη φαινοτυπική ετερογένεια των β-θαλασσαιμιών αντανακλά την ποικιλία των μεταλλάξεων στη θέση του γονιδίου HBB, υπεύθυνου για την παραγωγή της β αλυσίδας, τη δράση πολλών δευτερογενών και τριτογενών κλινικών επιπτώσεων, -που αφορούν στις πρόσθετες επιπλοκές και συνέπειες που προκύπτουν από την πρωτοπαθή διαταραχή- αλλά και ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι δευτερογενείς επιπτώσεις περιλαμβάνουν καταστάσεις όπως την υπερφόρτωση σιδήρου, οστικές παραμορφώσεις και τον αυξημένο κίνδυνο λοιμώξεων. Αντίστοιχα, τριτογενείς παράγοντες στη β-θαλασσαιμία είναι οι μακροπρόθεσμες συνέπειες της νόσου και της θεραπείας της, όπως: καρδιακές παθήσεις, ενδοκρινικές Διαταραχές και ηπατική νόσο. Η διαχείριση των επιπτώσεων αυτών περιλαμβάνει τακτική παρακολούθηση, θεραπεία αποσιδήρωσης και άλλες υποστηρικτικές θεραπείες για τον μετριασμό των επιπλοκών. Οι επιπτώσεις συνοψίζονται στον **Πίνακα 4**.



**Πίνακας 4: β θαλασσαιμία: Δευτερογενείς και Τριτογενείς επιπτώσεις**

[Πηγή: OMIM (Amberger, Bocchini et al. 2019)].

<b>Τύπος επίπτωσης</b>	<b>Επίπτωση</b>	<b>Περιγραφή</b>
<b>Δευτερογενής</b>	Υπερφόρτωση σιδήρου	Προκαλείται από συχνές μεταγγίσεις αίματος, που οδηγεί σε περίσσεια σιδήρου στο σώμα, ιδιαίτερα σε ζωτικά όργανα.
	Παραμορφώσεις οστών	Διόγκωση του μυελού των οστών λόγω αναποτελεσματικής ερυθροποίησης, με συνέπεια οστικές παραμορφώσεις και κατάγματα.
<b>Τριτογενής</b>	Αυξημένες λοιμώξεις	Υψηλότερος κίνδυνος λοιμώξεων λόγω σπληνομεγαλίας και μεταγγίσεων.
	Καρδιακή ασθένεια	Καρδιακές επιπλοκές, συμπεριλαμβανομένης της καρδιακής ανεπάρκειας λόγω χρόνιας υπερφόρτωσης σιδήρου.
	Ενδοκρινικές Διαταραχές	Διαταραχές όπως ο διαβήτης και οι δυσλειτουργίες του θυρεοειδούς λόγω εναπόθεσης σιδήρου στους ενδοκρινείς αδένες.
	Ηπατική νόσος	Κίνδυνος κίρρωσης του ήπατος και καρκίνου από υπερφόρτωση σιδήρου και πιθανή μετάδοση ηπατίτιδας.

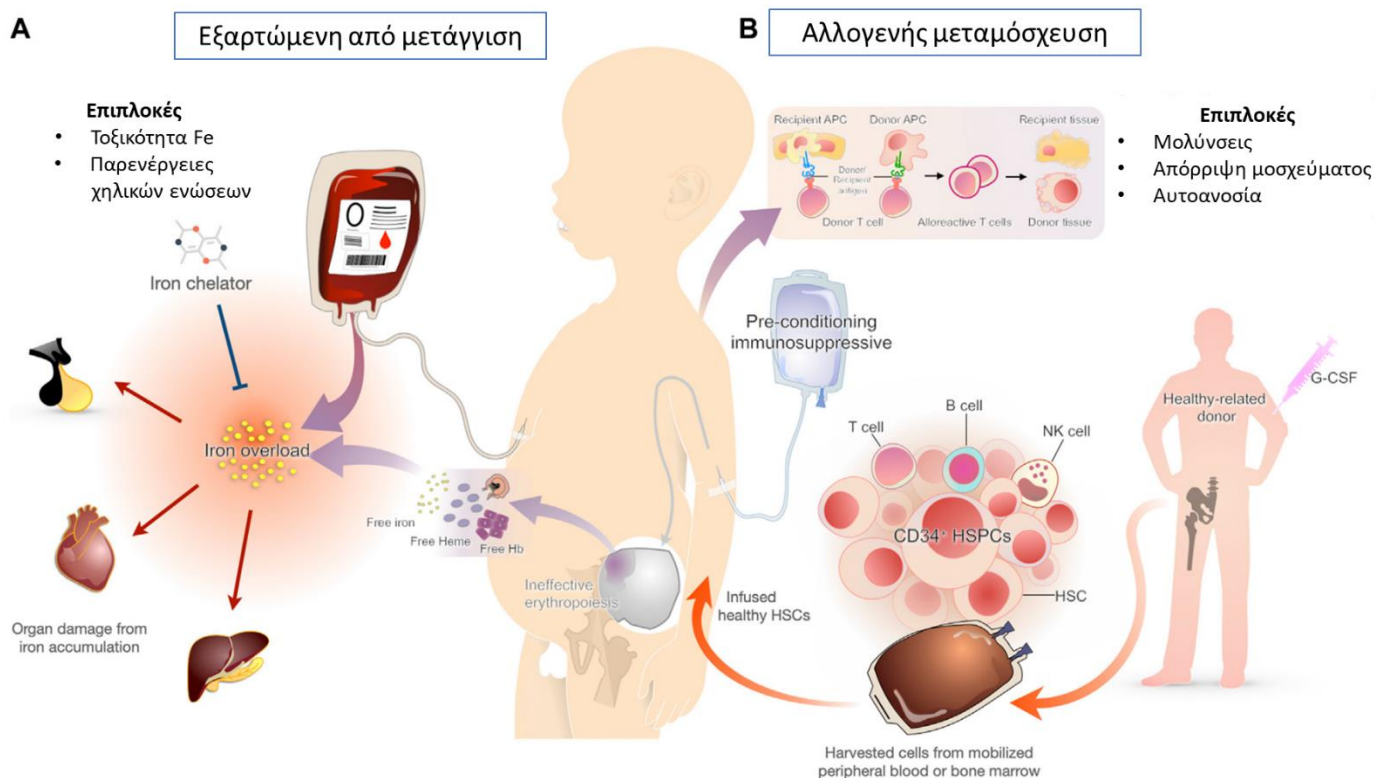
## 2.3 Τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις στη β θαλασσαιμία

Οι τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές για τη β θαλασσαιμία εστιάζονται κυρίως στη διαχείριση των συμπτωμάτων παρά στην αντιμετώπιση της βασικής αιτίας. Οι τακτικές μεταγγίσεις αίματος είναι συχνά απαραίτητες για την παροχή των αλυσίδων βήτα σφαιρίνης που λείπουν και τη βελτίωση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης του ασθενούς. Η θεραπεία χηλίωσης σιδήρου χρησιμοποιείται επίσης για τη διαχείριση της υπερφόρτωσης σιδήρου που προκύπτει από συχνές μεταγγίσεις. Ενώ αυτές οι θεραπείες μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των ατόμων με β θαλασσαιμία, συνοδεύονται από περιορισμούς. Η ανάγκη για ισόβιες μεταγγίσεις αίματος μπορεί να οδηγήσει σε επιπλοκές όπως η υπερφόρτωση σιδήρου και ο κίνδυνος λοιμώξεων. Επιπλέον, αυτές οι θεραπείες απαιτούν συνεχή ιατρική φροντίδα και σημαντική οικονομική επιβάρυνση.

Η μετάγγιση αποτελεί βασική θεραπευτική προσέγγιση σε ασθενείς με θαλασσαιμία (Εικόνα 5). Η μετάγγιση αίματος χρησιμεύει για την παροχή φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων και την καταστολή του αναποτελεσματικού πολλαπλασιασμού των ερυθροκυττάρων, ο οποίος αποτρέπει σημαντικές παθοφυσιολογικές συνέπειες (Cazzola, Stefano et al. 1995). Σε αυτή την κατεύθυνση αναπτύσσονται θεραπείες αντιμετώπισης της αναιμίας, όπως η ερυθροποιητίνη (Chaidos, Makis et al. 2004) . Ένα πιο πρόσφατο παράδειγμα θεραπείας είναι το Luspatercept, παλαιότερα γνωστό ως ACE-536, που αποτελεί μια πρωτεΐνη σύντηξης που συνδυάζει έναν τροποποιημένο υποδοχέα ακτιβίνης ΠΒ (ActRIIB), μέλος της υπερικογένειας του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β), με τον τομέα Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης G (IgG1). Έχει δείξει αποτελεσματικότητα στη θεραπεία της αναιμίας που οφείλεται σε β θαλασσαιμία, και πρόσφατα έλαβε έγκριση από τον Ομοσπονδιακό Οργανισμό Φαρμάκων (FDA) των ΗΠΑ και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) για ασθενείς με β- θαλασσαιμία (Hatzimichael, Timotheatou et al. 2022).

Με τις εξελίξεις στη θεραπεία μετάγγισης και χηλικής θεραπείας σιδήρου τις τελευταίες δεκαετίες, το προσδόκιμο ζωής των εξαρτώμενων από μετάγγιση ασθενών β-θαλασσαιμίας έχει βελτιωθεί σημαντικά κυρίως σε χώρες με ανεπτυγμένα συστήματα υγείας (Borgna-Pignatti, Rugolotto et al. 2004, Ladis, Chouliaras et al. 2011). Ωστόσο, παρά τις βελτιώσεις στην επιβίωση, η ποιότητα ζωής σε ασθενείς με θαλασσαιμία που υποβάλλονται σε συμβατική, μη θεραπευτική αντιμετώπιση παραμένει περιορισμένη σε σύγκριση με άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις (Caocci, Vacca et al. 2016, Badawy, Beg et al. 2021). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα τακτικά σχήματα μετάγγισης απαιτούν αποχή από καθημερινές ενέργειες για 1 ημέρα κάθε 3-4 εβδομάδες καθώς και ότι υπάρχει κίνδυνος επιπλοκών από τις μεταγγίσεις και τις θεραπείες αποσιδήρωσης, καθίσταται προφανές ότι οι μεταγγίσεις μπορεί να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τις δραστηριότητες του ασθενούς. Η δεφερασιρόξη ή η δεφεριπρόνη αποτελούν ασφαλείς και αποτελεσματικές επιλογές (Taher, Porter et al. 2013). (Makis, Chaliasos et al. 2011, Makis, Chaliasos et al. 2013).

Η εμπειρία στη χώρα μας, που αποτελεί περιοχή με υψηλό ποσοστό φορέων, περιγράφεται στο Εθνικό Αρχείο Καταγραφής για τη β θαλασσαιμία (Voskaridou, Kattamis et al. 2019). Σύμφωνα με τα πρόσφατα στοιχεία, είναι εμφανής η μείωση του συνολικού αριθμού όλων των αιμοσφαιρινοπαθειών εκτός από την αιμοσφαιρινοπάθεια «H». Ο συνολικός αριθμός των γεννήσεων ασθενών ατόμων μειώθηκε επίσης. Τα περισσότερα από αυτά τα περιστατικά οφείλονταν σε διαγνωστικά σφάλματα και έλλειψη επίγνωσης. Οι περισσότεροι ασθενείς είχαν χαμηλές ή μέτριες τιμές συγκέντρωσης σιδήρου στο ήπαρ (LIC), ένα μη αμελητέο ποσοστό ασθενών είχε υψηλό LIC. Οι επιπλοκές που σχετίζονται με την καρδιά και το ήπαρ είναι οι κύριες αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας. Από το 2000 έως το 2015, παρατηρήθηκε μείωση των θανάτων που σχετίζονται με την καρδιά μαζί με αύξηση των θανάτων που σχετίζονται με το ήπαρ. Το Ελληνικό Πρόγραμμα Πρόληψης μαζί με τις εξελίξεις στα σχήματα αποσιδήρωσης και την παρακολούθηση της συγκέντρωσης του σιδήρου έχουν οδηγήσει σε βελτιωμένα αποτελέσματα των ασθενών. Το Εθνικό Αρχείο Καταγραφής δίνει πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα των προγραμμάτων πρόληψης, τη θεραπευτική διαχείριση των αιμοσφαιρινοπαθειών και τα σχετικά αποτελέσματα (Voskaridou, Kattamis et al. 2019).



**Εικόνα 5. Συμβατικές θεραπευτικές προσεγγίσεις για ασθενείς με β-θαλασσαιμία και οι επιπλοκές τους (A) Η χρόνια μετάγγιση αίματος είναι το πρότυπο φροντίδας για ασθενείς με β-θαλασσαιμία για τη διατήρηση επαρκών επιπέδων αιμοσφαιρίνης για αποτελεσματική καρδιαγγειακή κατάσταση. Μία από τις σημαντικότερες επιπλοκές από μια μετάγγιση αίματος είναι η υπερφόρτωση σιδήρου. Καθώς το μεταγγιζόμενο αίμα περιέχει σίδηρο και το ανθρώπινο σώμα δεν διαθέτει λειτουργικό μηχανισμό απέκκρισης σιδήρου, όλα τα άτομα που υποβάλλονται σε θεραπεία με χρόνια μετάγγιση αναπτύσσουν υπερφόρτωση σιδήρου, η οποία οδηγεί σε βλάβη οργάνων από οξειδωτικούς τραυματισμούς. Οι χηλικές ουσίες σιδήρου, αν και εμφανίζουν παρενέργειες είναι απαραίτητες στην εξαρτώμενη από μετάγγιση β-θαλασσαιμία για την πρόληψη των επιπλοκών της υπερφόρτωσης σιδήρου από μετάγγιση (B). Η μεταμόσχευση αιμοποιητικών βλαστικών κυττάρων (HSCs) χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες ως θεραπευτική προσέγγιση για ασθενείς με β-θαλασσαιμία. Η αντικατάσταση των HSCs υποκαθιστά τα αναποτελεσματικά αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα με αποτελεσματικά κύτταρα από έναν υγιή δότη. Ακόμη και με τη βελτίωση των τεχνολογιών μεταμόσχευσης κατά την τελευταία δεκαετία, παρατηρούνται περιστασιακά σοβαρές επιπλοκές όπως λοιμώξεις, αυτοανοσία (μοσχεύματος έναντι ξενιστή) και απόρριψη μοσχεύματος.**

Ελλείπει μεταγγίσεων αίματος, οι περισσότεροι ασθενείς με μείζονα β-θαλασσαιμία πεθαίνουν μέσα στα πρώτα 5 χρόνια από τη γέννηση (Rachmilewitz and Giardina 2011). Για το λόγο αυτό, συνιστώνται τακτικές μεταγγίσεις αίματος στην πρώιμη παιδική ηλικία, μόλις εμφανιστούν τα πρώτα κλινικά συμπτώματα. Καθώς δεν υπάρχει ελεγχόμενος μηχανισμός για την απέκκριση σιδήρου στο ανθρώπινο σώμα, η χηλική-σιδηροδεσμευτική θεραπεία συνήθως απαιτείται εντός 1 έτους από την έναρξη του σχήματος μετάγγισης (Franchini, Forni et al. 2017, Shah, Sayani et al. 2019).

Η έρευνα σε τομείς όπως η γονιδιακή θεραπεία προσφέρει μία σημαντική εναλλακτική προσέγγιση, που προσφέρει την προοπτική μόνιμης θεραπείας. Η βελτίωση των μεθοδολογιών γενετικής τροποποίησης σε συνδυασμό με την διάθεση γονιδιακών θεραπειών σε μεγάλο ποσοστό ασθενών αποτελούν κρίσιμες παράμετρους για την αντιμετώπιση της ασθένειας στην εποχή της μοριακής Ιατρικής (Rattananon, Anurathapan et al. 2021).

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ**

## Κεφάλαιο 3: Επισκόπηση γονιδιακής θεραπείας

Η γονιδιακή θεραπεία ορίζεται ως η ιατρική τεχνολογία που στοχεύει να θεραπεύσει μία ασθένεια μέσω του χειρισμού της γονιδιακής πληροφορίας, ή της έκφρασης της ή μέσω της αλλαγής των ιδιοτήτων των κυττάρων (Wirth, Parker et al. 2013). Υπάρχουν διάφορες ερμηνείες του ανωτέρω ορισμού, με δύο από τις πιο δημοφιλείς να είναι οι εξής:

1. Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) ορίζει ότι ένα φαρμακευτικό προϊόν γονιδιακής θεραπείας είναι: «ένα βιολογικό φάρμακο που πληροί τα ακόλουθα δύο χαρακτηριστικά: (α) περιέχει μια δραστική ουσία που περιέχει ή αποτελείται από ένα ανασυνδυασμένο νουκλεϊκό οξύ που χρησιμοποιείται ή χορηγείται σε ανθρώπους με σκοπό τη ρύθμιση, την επιδιόρθωση, την αντικατάσταση, την προσθήκη ή τη διαγραφή μιας γενετικής αλληλουχίας, και (β) το θεραπευτικό, προφυλακτικό ή διαγνωστικό του αποτελέσμα σχετίζεται άμεσα με την ανασυνδυασμένη αλληλουχία νουκλεϊκού οξέος που περιέχει ή με το προϊόν της γενετικής έκφρασης αυτής της αλληλουχίας. Τα φαρμακευτικά προϊόντα γονιδιακής θεραπείας δεν περιλαμβάνουν εμβόλια κατά μολυσματικών ασθενειών.» (Wirth, Parker et al. 2013).
2. Ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) ορίζει τη γονιδιακή θεραπεία ως: προϊόντα «που μεσολαβούν τα αποτελέσματά τους με μεταγραφή ή/και μετάφραση μεταφερόμενου γενετικού υλικού ή/και ενσωματώνοντας στο γονιδίωμα του ξενιστή και που χορηγούνται ως νουκλεϊκά οξέα, ιοί ή γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς. Τα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την τροποποίηση κυττάρων *in vivo* ή να μεταφερθούν σε κύτταρα *ex vivo* πριν από τη χορήγηση στον δέκτη». (Wirth, Parker et al. 2013).

Η γονιδιακή θεραπεία έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη οδός για τη θεραπεία μιας σειράς γενετικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της β θαλασσαιμίας. Αυτό το κεφάλαιο συζητά τις θεωρητικές αρχές της γονιδιακής θεραπείας, τους μηχανισμούς και τις διάφορες τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε αυτή την επαναστατική θεραπευτική προσέγγιση.

Όπως προαναφέρθηκε, η διαδικασία της γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνει την εισαγωγή, την αφαίρεση ή την αντικατάσταση γενετικού υλικού μέσα στα κύτταρα ενός ατόμου για τη θεραπεία ή την πρόληψη ασθενειών. Η ιδέα, αν και απλή, απαιτεί περίπλοκες τεχνολογικές εξελίξεις για να αξιοποιήσει πλήρως τις δυνατότητές της. Τις τελευταίες δεκαετίες, υπήρξαν σημαντικές ανακαλύψεις που μετέτρεψαν τη γονιδιακή θεραπεία από μια θεωρητική ιδέα σε κλινική πραγματικότητα.

### **3.1 Ιστορία της Γονιδιακής Θεραπείας**

Η τεχνολογία της γονιδιακής θεραπείας αναπτύχθηκε με την εξέλιξη του κλάδου της μοριακής βιολογίας, μερικώς ως αποτέλεσμα της ανακάλυψης του μοντέλου της διπλής έλικας και της διατύπωσης του κεντρικού δόγματος (Watson and Crick 1953, Crick 1970). Μια αρχική πρόταση για την τροποποίηση της γενετικής πληροφορίας μέσω μεταφοράς γονιδίων διατυπώθηκε το 1968, όταν ο ιός της μωσαϊκής του καπνού χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για την εισαγωγή μιας πολυαδενυλικής αλληλουχίας στο ικό RNA (Rogers and Pfunderer 1968).

Τη δεκαετία του 1980, ο Martin Cline έγινε ο πρώτος που επιχείρησε γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο DNA. Πριν από αυτό, είχε ήδη επιτύχει πειραματικά, να εισάγει ξένα γονίδια σε βλαστοκύτταρα μυελού των οστών ποντικού (Mercola, Bar-Eli et al. 1982). Επιπλέον, μπόρεσε να αποδείξει ότι αυτά τα τροποποιημένα κύτταρα ήταν σε θέση να επαναφέρουν εν μέρει τη λειτουργικότητα στο μυελό των οστών άλλων ποντικών (Mercola, Bar-Eli et al. 1982). Με βάση αυτά τα αποτελέσματα, ο Cline στόχευσε στη δοκιμή αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης σε ανθρώπους. Αιτήθηκε άδεια από την επιτροπή Ανθρώπινων Υποκειμένων του UCLA ώστε να εφαρμόσει την ίδια προσέγγιση για τη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από β-θαλασσαιμία. Ο Cline ξεκίνησε τη μελέτη και εξήγαγε κύτταρα μυελού των οστών από δύο ασθενείς με β-θαλασσαιμία: ένας νοσηλεύοταν στην Ιταλία και ένας στο Ισραήλ. Ωστόσο, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε χωρίς να του έχει χορηγηθεί άδεια να πραγματοποιήσει αυτές τις μελέτες από το Συμβούλιο Θεσμικής



Αναθεώρησης του UCLA. Επιπλέον, το Διοικητικό Συμβούλιο είχε σαφείς ανησυχίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα αυτής της θεραπείας αλλά και την ασφάλεια χρήσης ιϊκών φορέων, οπότε η πρόμη αυτή προσπάθεια εγκαταλείφθηκε (Beutler 2001).

Στις 14 Σεπτεμβρίου 1990 ο FDA ενέκρινε για πρώτη φορά την εφαρμογή γονιδιακής θεραπείας σε ανθρώπους για την αποτελεσματική αντιμετώπιση γενετικών ασθενειών. Ο Michael R. Blaese ήταν ο πρώτος που διεξήγαγε μια δοκιμή χρησιμοποιώντας ένα θεραπευτικό γονίδιο (Blaese, Culver et al. 1995). Δύο παιδιά που έπασχαν από βαριά συνδυασμένη ανοσολογική ανεπάρκεια, μια μονογονιδιακή ασθένεια που προκαλείται από έλλειψη του ενζύμου απαμινάσης αδενοσίνης (ADA-SCID), υποβλήθηκαν σε θεραπεία. Προς αυτή την κατεύθυνση, λευκά αιμοσφαίρια ελήφθησαν από το αίμα αυτών των ασθενών σε κυτταροκαλλιέργεια και τροποποιήθηκαν *ex vivo* ώστε να εκφράσουν το φυσιολογικό γονίδιο για την παραγωγή απαμινάσης αδενοσίνης. Μόνο η μία ασθενής, η Ashanti DeSilva, εμφάνισε μια προσωρινή ανταπόκριση (Blaese, Culver et al. 1995). Λίγο αργότερα ξεκίνησε και η δοκιμή ADA-SCID στην ΕΕ (Bordignon, Notarangelo et al. 1995) και επεκτάθηκε σε περαιτέρω δοκιμές μεταφοράς γονιδίων για αρκετές ασθένειες. Η πρώτη μεταφορά γονιδίου στη Σκανδιναβία έγινε το 1995, οπότε προέκυψαν και τα πρώτα σαφή αποτελέσματα ότι μπορεί να επιτευχθεί αποτελεσματική μεταφορά γονιδίου στον ανθρώπινο εγκέφαλο μετά από άμεση *in vivo* εισαγωγή φυσιολογικού γονιδίου (Puumalainen, Varalahti et al. 1998).

Παρόλο που οι πρώτες μελέτες δεν κατέληξαν στα αναμενόμενα αποτελέσματα, η γονιδιακή θεραπεία γνώρισε σημαντική άνθηση τη δεκαετία του 1990, μέχρι που το 1999, το χειρότερο σενάριο για τη γονιδιακή θεραπεία έγινε πραγματικότητα με το θάνατο του 18χρονου Jesse Gelsinger (Stolberg 1999). Ο νεαρός συμμετείχε σε κλινική δοκιμή γονιδιακής θεραπείας, καθώς υπέφερε από μερική ανεπάρκεια τρανσκαρβαμυλάσης της ορνιθίνης (OTC), ενός ηπατικού ενζύμου που απαιτείται για την απομάκρυνση του αζώτου από τα αμινοξέα και τις πρωτεΐνες. Το ανοσοποιητικό σύστημα του Gelsinger εμφάνισε οξεία ανοσοαπόκριση σε υψηλή δόση αδενοϊού και πέθανε τέσσερις ημέρες αργότερα λόγω πολυοργανικής ανεπάρκειας (Stolberg 1999). Κατ' αυτόν τον τρόπο, έγινε ο πρώτος ασθενής στον οποίο ο θάνατος συνδέθηκε άμεσα με ιικό φορέα που χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία. Ως αποτέλεσμα, προέκυψαν σημαντικά ηθικά διλήμματα για τη χρήση της γονιδιακής θεραπείας και το προσεχές

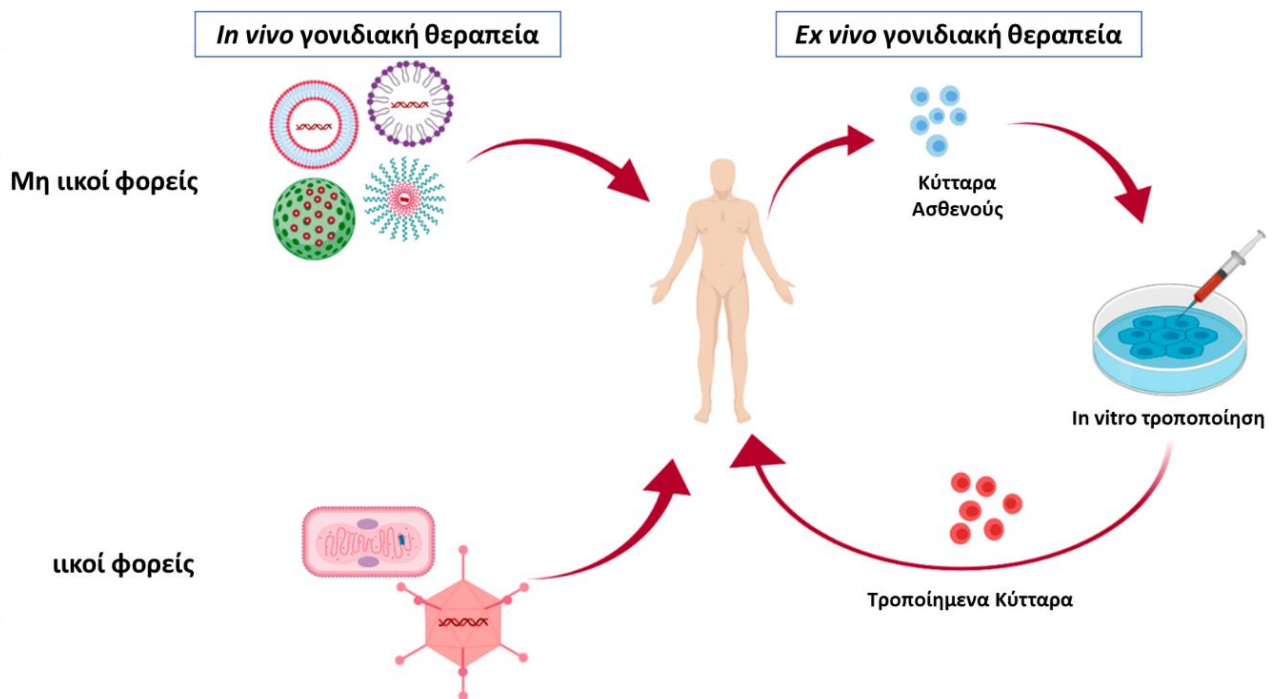
διάστημα έγιναν πολλαπλές μελέτες για το σχεδιασμό φορέων και μεθοδολογιών που θα είναι πιο ασφαλείς και αποτελεσματικές (Wirth, Parker et al. 2013).

Την επόμενη δεκαετία, πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας, αναζωπύρωσαν το ενδιαφέρον για την τεχνολογία. Ενδιαφέροντα αποτελέσματα έδειξαν κλινικές μελέτες για γενετικές ασθένειες όπως αυτές της συγγενούς αμαύρωσης του Leber (Maguire, High et al. 2009), της β-θαλασσαιμίας (Cavazzana-Calvo, Payen et al. 2010, Jessup, Greenberg et al. 2011) X-συνδεδεμένη σοβαρή συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID-X1) (Hacein-Bey-Abina, Hauer et al. 2010) και ADA-SCID (Aiuti, Cattaneo et al. 2009), αιμορροφιλία B (Jessup, Greenberg et al. 2011) και σύνδρομο Wiskott-Aldrich (Boztug, Schmidt et al. 2010).

Πρόσφατα, η εξέλιξη τεχνολογιών όπως τα microRNA και η παρεμβολή RNA (Zhang and Farwell 2008), νουκλεάσες που μοιάζουν με ενεργοποιητές μεταγραφής/TALENs (Ramalingam, Annaluru et al. 2014) και η τεχνολογία επεξεργασίας γονιδιώματος CRISPR-Cas9 (Barrangou and Doudna 2016, Uddin, Rudin et al. 2020) αποτελούν πολλά υποσχόμενες καινοτομίες που συνεισφέρουν στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της γονιδιακής θεραπείας και την ασφαλή κλινική της εφαρμογή.

### **3.2 Μεθοδολογίες Γονιδιακής Θεραπείας**

Οι μέθοδοι γονιδιακής θεραπείας ταξινομούνται σε μία σειρά από υποκατηγορίες. Μία σύνοψη προσεγγίσεων των δύο βασικών κατηγοριών, που είναι η *ex vivo* και η *in vivo* γονιδιακή θεραπεία παρουσιάζεται στην **εικόνα 6**.



**Εικόνα 6. Σύνοψη μεθόδων γονιδιακής θεραπείας.** Η *in vivo* γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει την άμεση τροποποίηση των κυττάρων εντός του σώματος του ασθενούς. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τη θεραπεία ασθενειών όπου τα κύτταρα δεν αφαιρούνται, όπως σε ένα συμπαγές όργανο. Αντίθετα, η *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία συνεπάγεται την εξαγωγή κυττάρων από τον ασθενή, τη γενετική τροποποίηση σε ελεγχόμενο εργαστηριακό περιβάλλον και την επακόλουθη επανέγχυση στον ασθενή. Αυτή η τεχνική είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για ασθένειες όπου ένας συγκεκριμένος τύπος κυττάρου μπορεί να απομονωθεί, να τροποποιηθεί και στη συνέχεια να επανεισαχθεί με θεραπευτικά οφέλη, βρίσκοντας εφαρμογή στις αιματολογικές διαταραχές. Οι φορείς γονιδίων τόσο σε θεραπείες *in vivo* όσο και σε *ex vivo* μπορεί να ταξινομούνται σε ιικούς είτε μη ιικούς φορείς. Οι ιικοί φορείς αξιοποιούν τη φυσική ικανότητα των ιών να εισέρχονται στα κύτταρα και να παραδίδουν γενετικό υλικό, αφού αφαιρεθεί η ικανότητά να είναι μολυσματικοί - διατηρώντας παράλληλα την αποτελεσματικότητά τους στη μεταφορά γονιδίων. Είναι εξαιρετικά αποτελεσματικοί, αλλά συνοδεύονται από ανησυχίες για πιθανές ανοσολογικές αποκρίσεις και ενθετική μεταλλαξιγένεση. Οι μη ιικοί φορείς, όπως τα λιποσώματα ή τα νανοσωματίδια, προσφέρουν ένα ασφαλέστερο προφίλ με χαμηλότερο κίνδυνο ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού και μπορούν να κατασκευαστούν πιο εύκολα. Ωστόσο, η σχετικά χαμηλότερη αποτελεσματικότητά τους

στη μεταφορά γενετικού υλικού στα κύτταρα αποτελεί μια σημαντική πρόκληση, που συχνά απαιτεί την ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων για την ενίσχυση της διανομής και της σταθεροποίησης της γονιδιακής έκφρασης. [τροποποιημένη από (Reghuraty and Sarkar 2019)].

Η πρώτη ταξινόμηση αφορά τον τρόπο με τον οποίο διαχειριζόμαστε τον ιστό που πάσχει. Έτσι διακρίνουμε τις προσεγγίσεις *In Vivo* και *Ex Vivo*:

1. **Γονιδιακή θεραπεία *In Vivo***: Περιλαμβάνει την απευθείας εισαγωγή γενετικού υλικού στο σώμα του ασθενούς. Χρησιμοποιείται συνήθως για ασθένειες όπου τα κύτταρα-στόχοι είναι εύκολα προσβάσιμα, όπως ασθένειες του ήπατος ή των πνευμόνων. Οι μέθοδοι *in vivo* είναι λιγότερο επεμβατικές, αλλά δημιουργούν προκλήσεις στη στόχευση των σωστών κυττάρων και στην αποφυγή ανεπιθύμητων επιπτώσεων σε άλλα κύτταρα ή την μη ειδική δράση της θεραπείας.
2. **Γονιδιακή θεραπεία *Ex Vivo***: Αυτή η προσέγγιση είναι ιδιαίτερα σημαντική για αιματολογικές ασθένειες και περιλαμβάνει την εξαγωγή κυττάρων από τον ασθενή, τη γενετική τροποποίηση τους στο εργαστήριο και στη συνέχεια την επανεισαγωγή τους στην κυκλοφορία του αίματος του ασθενούς (ή το μυελό των οστών). Αυτή η μέθοδος επιτρέπει πιο ακριβή έλεγχο της διαδικασίας γενετικής τροποποίησης και μειώνει τον κίνδυνο ακούσιων επιπτώσεων σε κύτταρα που δεν αποτελούν στόχους. Παρόλα αυτά, η αυξημένη πολυπλοκότητα της διαδικασίας απαιτεί αυστηρό έλεγχο των σταδίων τροποποίησης.

Τα χαρακτηριστικά των δύο τύπων γονιδιακής θεραπείας συνοψίζονται στον **πίνακα 5**.

**Πίνακας 5:** Χαρακτηριστικά τύπων γονιδιακής θεραπείας.

Τύπος Θεραπείας	Χαρακτηριστικά	Αναφορές
<i>In Vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Άμεση εισαγωγή γενετικού υλικού στο σώμα του ασθενούς.</li> <li>Χρησιμοποιείται για ασθένειες όπου υπάρχει εύκολη πρόσβαση στα κύτταρα-στόχους.</li> <li>Λιγότερο επεμβατική</li> <li>προκλήσεις στη στόχευση των σωστών κυττάρων και στην αποφυγή ανεπιθύμητων επιπτώσεων</li> </ul>	(Dunbar, High et al. 2018)
<i>Ex Vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Τα κύτταρα εξάγονται από τον ασθενή</li> <li>Γενετική τροποποίηση στο εργαστήριο και επανεισαγωγή στον οργανισμό του ασθενή.</li> <li>Πιο πολύπλοκη διαδικασία, με πολλαπλά βήματα</li> <li>Επιτρέπει πιο ακριβή έλεγχο της διαδικασίας γενετικής τροποποίησης</li> <li>Μειώνει τον κίνδυνο ανεπιθύμητων επιπτώσεων σε κύτταρα μη-στόχους</li> </ul>	(Dunbar, High et al. 2018)

Για να είναι αποτελεσματική η γονιδιακή θεραπεία, το γενετικό υλικό πρέπει να παραδίδεται στα κύτταρα-στόχους που εμφανίζουν τη βλάβη. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ειδικούς φορείς που μπορούν να μεταφέρουν αποτελεσματικά τα επιθυμητά γονίδια στα κύτταρα. Οι δύο σημαντικότερες κατηγορίες περιλαμβάνουν:

1. **Ίκους φορείς:** γενετικά τροποποιημένοι ιοί που καθίστανται μη μολυσματικοί χρησιμοποιούνται συχνά λόγω της αποτελεσματικότητάς τους να εισέρχονται στα κύτταρα.
2. **Μη ικούς φορείς:** περιλαμβάνουν συνήθως λιπίδια και νανοσωματίδια που βασίζονται σε λιπίδια, τα οποία μπορεί να είναι ασφαλέστερα αλλά λιγότερο αποτελεσματικά από τους ικούς φορείς.

Ο τομέας της γονιδιακής θεραπείας έχει φέρει επανάσταση με την ανάπτυξη διαφόρων συστημάτων φορέων, το καθένα με τα μοναδικά του πλεονεκτήματα και περιορισμούς. Η επιλογή του φορέα είναι κρίσιμη, καθώς επηρεάζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια και τη δυνατότητα εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας. Οι βασικές κατηγορίες φορέων που έχουν χρησιμοποιηθεί για γονιδιακή θεραπεία συνοψίζονται στον **πίνακα 6**.

**Πίνακας 6.** Βασικά χαρακτηριστικά δημοφιλών φορέων στη γονιδιακή θεραπεία

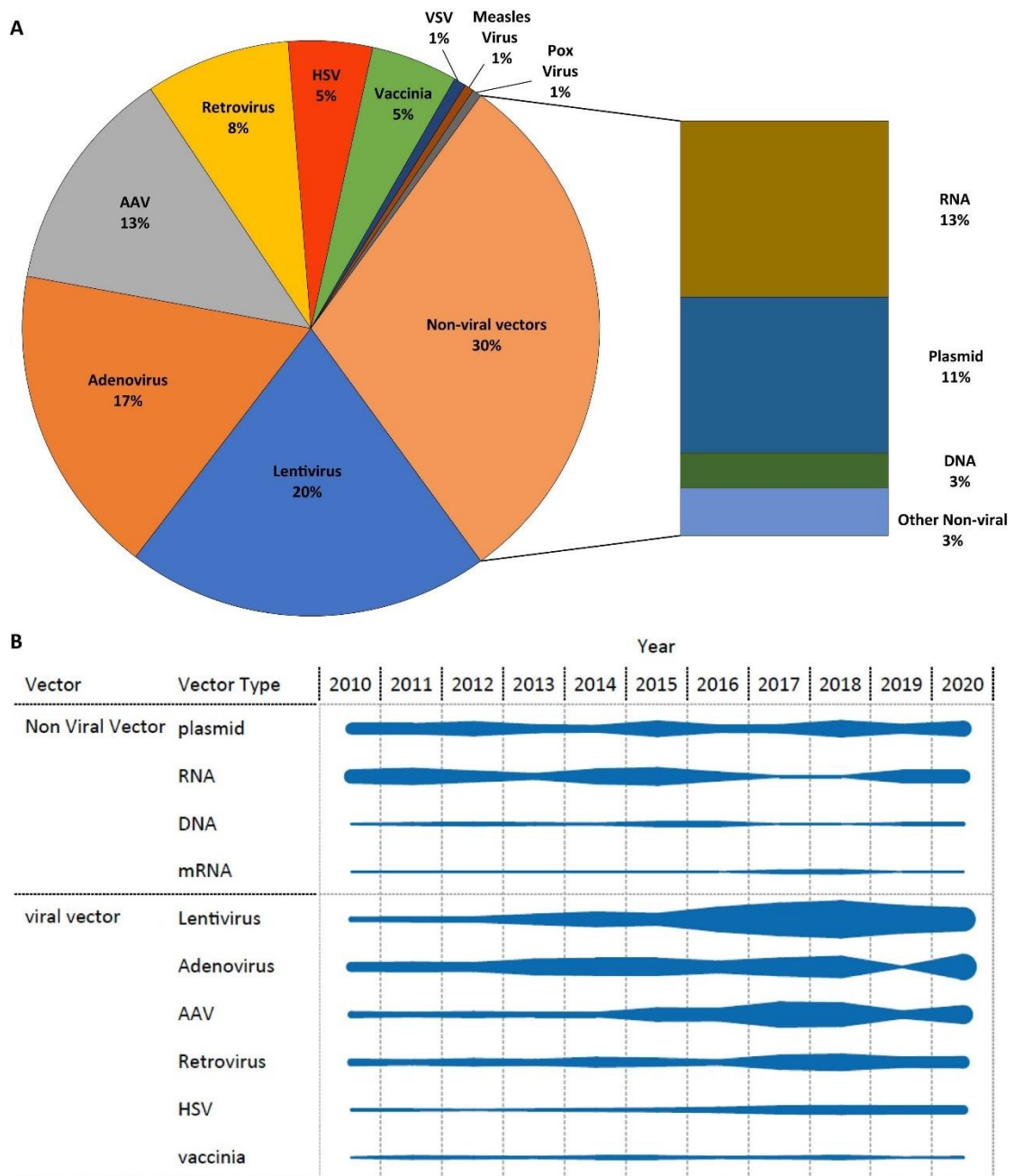
[πηγή: (Thorne, Takeya et al. 2018)]

<b>Κατηγορία</b>	<b>Βασικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα</b>
<b>Ιικοί φορείς</b>	
Lentivirus	Πλεονεκτήματα: Υψηλή απόδοση, σταθερή ενσωμάτωση στο γονιδίωμα Μειονεκτήματα: Δυνατότητα μεταλλαξιγένεσης παρεμβολής, πολυπλοκότητα παραγωγής
Αδενοϊός	Πλεονεκτήματα: Υψηλά ποσοστά μεταγωγής, ευρύ φάσμα ξενιστή Μειονεκτήματα: Παροδική έκφραση, δυνατότητα ανοσοαπόκρισης
AAV (αδενο-σχετιζόμενος ιός)	Πλεονεκτήματα: Σταθερή έκφραση, χαμηλή ανοσογονικότητα Μειονεκτήματα: Μικρή γενετική ικανότητα, προκλήσεις παραγωγής
Ρετροϊός	Πλεονεκτήματα: Σταθερή ενσωμάτωση, μακροπρόθεσμη έκφραση Μειονεκτήματα: Μολύνει μόνο τα διαιρούμενα κύτταρα, πιθανή μεταλλαξιγένεση με ένθεση
HSV (ιός απλού έρπητα)	Πλεονεκτήματα: Μεγάλη γενετική ικανότητα, ευρύ φάσμα ξενιστών Μειονεκτήματα: Πολύπλοκος κύκλος ζωής, πιθανότητα τοξικότητας
Vaccinia	Πλεονεκτήματα: Μεγάλη ικανότητα για ξένο DNA, ισχυρή πρόκληση ανοσοαπόκρισης Μειονεκτήματα: Δυνατότητα ανεπιθύμητων ενεργειών
<b>Μη ιικοί φορείς</b>	
Πλασμίδιο	Πλεονεκτήματα: Εύκολη παραγωγή, χωρίς κίνδυνο μόλυνσης Μειονεκτήματα: Χαμηλότερη απόδοση, αυξημένο ποσοστό παροδικής έκφρασης
RNA	Πλεονεκτήματα: Χωρίς κίνδυνο ενσωμάτωσης στο γονιδίωμα, άμεση έκφραση Μειονεκτήματα: Παροδικό, ασταθές, μπορεί να προκαλέσει ανοσοαπόκριση
DNA	Πλεονεκτήματα: Μπορεί να φέρει μεγάλα γονίδια, χωρίς ικά γονίδια Μειονεκτήματα: Χαμηλή απόδοση, δυνατότητα ανοσοαπόκρισης
mRNA	Πλεονεκτήματα: Δεν ενσωματώνεται στο γονιδίωμα, δεν υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης Μειονεκτήματα: Ασταθής, μπορεί να ενεργοποιήσει το ανοσοποιητικό σύστημα

Τα ποσοστά χρήσης των διάφορων φορέων μέχρι το έτος 2022, σύμφωνα με (Arabi, Mansouri et al. 2022), παρουσιάζονται στην **εικόνα 7**.

Οι ιικοί φορείς είναι οι δημοφιλέστεροι και χρησιμοποιήθηκαν περίπου στο 70% των δοκιμών γονιδιακής θεραπείας. Μεταξύ των ιικών φορέων, οι λεντιϊοί

(lentiviruses) κατέχουν εξέχουσα θέση (20% του συνόλου των δοκιμών) λόγω της υψηλής αποτελεσματικότητάς τους και της σταθερής ενσωμάτωσής τους στο γονιδίωμα του ξενιστή, κάτι που είναι κρίσιμο για μακροπρόθεσμα θεραπευτικά αποτελέσματα (Naldini 2015). Ωστόσο, η χρήση τους μπορεί να προκαλέσει εισαγωγική μεταλλαξιγένεση και να οδηγήσει σε ακούσια ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων (Montini, Cesana et al. 2006). Οι αδενοϊοί (17%) είναι αξιοσημείωτοι φορείς διακρινόμενοι για τα υψηλά ποσοστά ενσωμάτωσης και το ευρύ φάσμα ξενιστών, τους καθιστά κατάλληλους για διάφορους τύπους κυττάρων. Παρά αυτά τα πλεονεκτήματα, μπορεί να προκαλούν παροδική έκφραση και, πιθανώς, έντονες ανοσολογικές αποκρίσεις σε μια υποομάδα ασθενών, γεγονότα που περιορίζουν την καθολική εφαρμογή τους (Crystal 1995). Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί / AAV (13%) αποτελούν αποτέλεσμα πειραμάτων γενετικής μηχανικής με βάση το γονιδίωμα του αδενοϊού. Οι AAV ξεχωρίζουν για τη σταθερή έκφραση και τη χαμηλή ανοσογονικότητά τους. Ωστόσο, η ικανότητα να ενσωματώνουν μικρότερου μεγέθους αλληλουχίες και οι προκλήσεις παραγωγής τους, περιορίζουν τη χρήση τους για την εισαγωγή μεγαλύτερων γονιδίων (Wu, Asokan et al. 2006), παρόλο που η περαιτέρω εξέλιξη τους ενδέχεται να οδηγήσει σε νέα γενεάς, βελτιωμένους AAV. Οι ρετροϊοί (8%) είναι αποτελεσματικοί για σταθερή μεταφορά γονιδίων, αλλά περιορίζονται στη μόλυνση των διαιρούμενων κυττάρων, θέτοντας έναν σημαντικό περιορισμό για τη στόχευση μη διαιρούμενων κυττάρων, ενώ εμφανίζουν και τα μειονεκτήματα των λεντι-ϊών (Thomas, Ehrhardt et al. 2003). Οι φορείς του ιού του απλού έρπητα / HSV (5%) προσφέρουν μεγάλη γενετική ικανότητα, αλλά ο πολύπλοκος κύκλος ζωής τους και η πιθανότητα τοξικότητας εγείρουν ανησυχίες για την ασφάλεια τους (Epstein, Marconi et al. 2005). Οι φορείς δαμαλίτιδας χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά (~1%), αλλά είναι αξιοσημείωτοι για την ικανότητα μεταφοράς μεγάλων αλληλουχιών ξένου DNA. Η πιθανότητα ανεπιθύμητων ενεργειών, ωστόσο, εγείρει ζητήματα ασφάλειας (Moss 2007). Άλλοι ιικοί φορείς - καθένας προσαρμοσμένος για συγκεκριμένες εφαρμογές- καταδεικνύουν την ποικιλομορφία στο πεδίο, αλλά η ποικίλη φύση τους απαιτεί αξιολόγηση ανά περίπτωση.



**Εικόνα 7. Εκπροσώπηση διαφορετικών φορέων σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας.** (A) Το μέρος συνεισφοράς των ιικών και μη ιικών φορέων και οι τύποι τους σε κλινικές δοκιμές από το 2010 έως το 2020. Οι ιικοί φορείς έπαιξαν τον κύριο ρόλο στη μεταφορά του γενετικού υλικού, ωστόσο, τα χαρακτηριστικά κάθε φορέα τους έκαναν ιδανικούς υποψήφιους για συγκεκριμένες χρήσεις (π.χ., φακοϊός και ρετροϊός για *ex-vivo* γονιδιακή θεραπεία, AAV για *in-vivo* γονιδιακή θεραπεία ή RNA για αλλαγές απόλειας λειτουργίας.). Τα RNA και τα πλασμίδια ήταν οι πιο συνηθισμένοι μη ιικοί φορείς. (B) Η χρονική τάση των κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας με χρήση διαφορετικών φορέων. [πηγή (Arabi, Mansouri et al. 2022)].



Οι μη ιικοί φορείς περιλαμβάνουν πλασμίδια (11%) που είναι από τους πιο επιτυχημένους φορείς στη γενετική μηχανική. Τα πλασμίδια είναι απλά και ασφαλή, αλλά η χαμηλότερη αποτελεσματικότητά τους και η παροδική έκφρασή τους τα καθιστούν λιγότερο κατάλληλα για θεραπείες που απαιτούν μακροπρόθεσμη έκφραση γονιδίου (Wolff, Malone et al. 1990). Οι φορείς που βασίζονται σε RNA (13%) προσφέρουν άμεση έκφραση χωρίς τον κίνδυνο τροποποίησης του γονιδιώματος. Η παροδική φύση και η αστάθειά τους, μαζί με τις πιθανές ανοσολογικές αποκρίσεις, περιορίζουν την κλινική τους χρησιμότητα (Sahin, Karikó et al. 2014). Οι φορείς DNA (3%) αποφεύγουν τη χρήση ιικών γονιδίων, μειώνοντας τον κίνδυνο ανοσοαπόκρισης. Ωστόσο, η χαμηλή τους αποτελεσματικότητα στη μεταφορά γονιδίων είναι ένα σημαντικό εμπόδιο (Li and Huang 2007). Οι φορείς mRNA (<3%) έχουν πρόσφατα κερδίσει την προσοχή, ιδιαίτερα πρόσφατα για την ανάπτυξη εμβολίων, λόγω του προφίλ ασφαλείας τους. Ωστόσο, η αστάθεια και η πιθανότητα να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα δημιουργούν προκλήσεις σε μακροχρόνια χρήση για γονιδιακή θεραπεία (Pardi, Hogan et al. 2018). Άλλες μη ιογενείς μέθοδοι βρίσκονται υπό ανάπτυξη και προσφέρουν τη δυνατότητα προσαρμογής σε συγκεκριμένες ανάγκες, αλλά η αποτελεσματικότητά τους ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τη μέθοδο χορήγησης και την εφαρμογή (Zu and Gao 2021).

Συμπερασματικά, τόσο οι ιικοί όσο και οι μη ιικοί φορείς έχουν αντίστοιχα τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Η επιλογή του φορέα εξαρτάται από τις ειδικές απαιτήσεις της γονιδιακής θεραπείας, όπως ο ιστός, η επιθυμητή διάρκεια έκφρασης και το μέγεθος του θεραπευτικού γονιδίου.

Η συνεχιζόμενη έρευνα και ανάπτυξη στην τεχνολογία φορέων στοχεύει να ξεπεράσει τους τρέχοντες περιορισμούς, ανοίγοντας το δρόμο για ασφαλέστερες, πιο αποτελεσματικές και προσβάσιμες γονιδιακές θεραπείες. Ο τομέας της γονιδιακής θεραπείας αναπτύσσεται συνεχώς, ως μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία διαφόρων γενετικών ασθενειών, ιδιαίτερα εκείνων με γνωστή γενετική αιτία, όπως η β θαλασσαιμία.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΓΙΑ Β ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ**

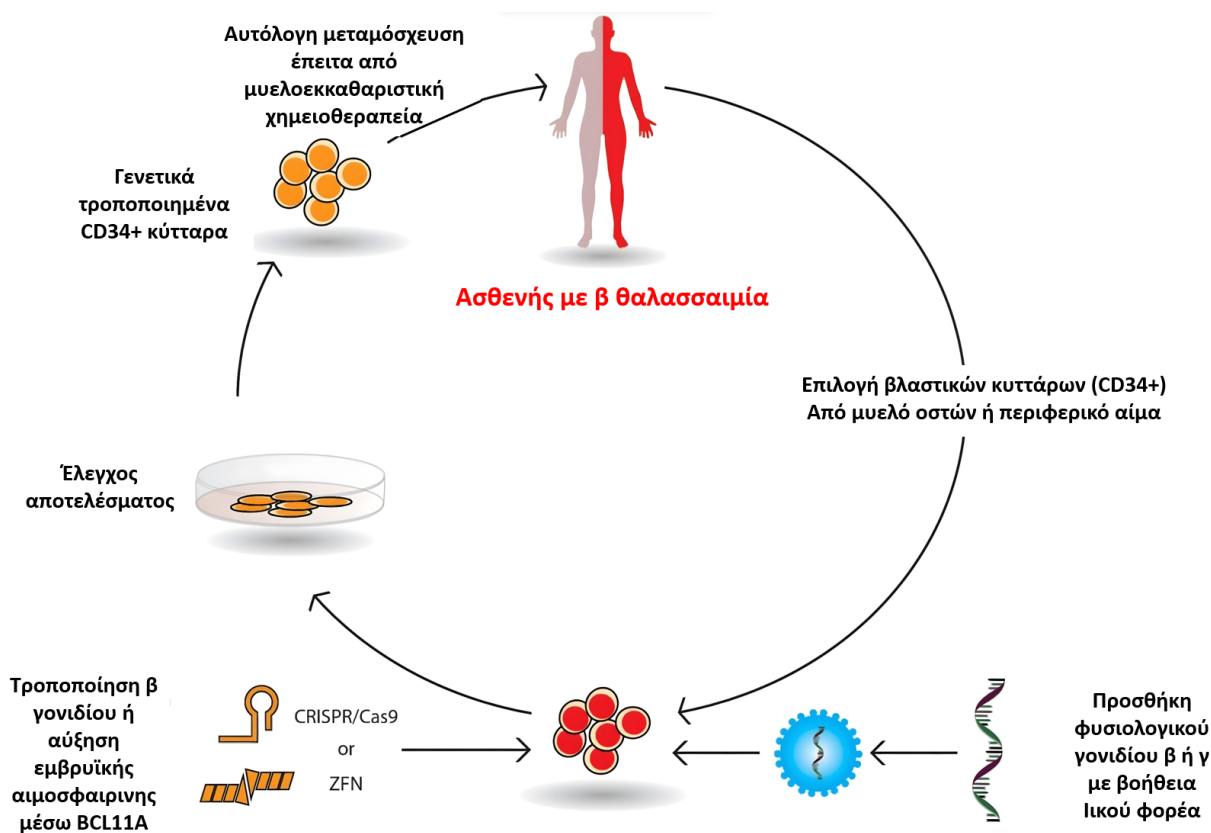
## Κεφάλαιο 4: Προσεγγίσεις Γονιδιακής Θεραπείας για β Θαλασσαιμία

Η κατανόηση της μοριακής βάσης της β θαλασσαιμίας παρέχει ουσιαστικές γνώσεις για πιθανούς στόχους για γονιδιακή θεραπεία. Ο πρωταρχικός στόχος της γονιδιακής θεραπείας για τη β θαλασσαιμία είναι να αποκαταστήσει την ισορροπημένη παραγωγή αλυσίδων άλφα και βήτα σφαιρίνης, επιτρέποντας το σχηματισμό λειτουργικής αιμοσφαιρίνης και ανακουφίζοντας τα συμπτώματα της νόσου .

Η β θαλασσαιμία έχει υπάρξει διαχρονικά αντικείμενο έρευνας στο πεδίο της γονιδιακής θεραπείας. Ιστορικά, όπως προαναφέρθηκε, η πρώιμη προσπάθεια του Martin Cline στόχευε στη θεραπεία ασθενών που πάσχουν από β-θαλασσαιμία (Beutler 2001).

Στον τομέα των γενετικών διαταραχών, η β θαλασσαιμία αποτελεί κατάλληλη νόσο για γονιδιακή θεραπεία λόγω της κατανοητής μοριακής της βάσης. Καθώς οι ερευνητές μελετούν τις δυνατότητες της γονιδιακής θεραπείας για αυτήν την πάθηση, έχουν προκύψει διάφορες προσεγγίσεις αντιμετώπισης (Makis, Voskaridou et al. 2021). Αυτό το κεφάλαιο διευκρινίζει στρατηγικές που έχουν υιοθετηθεί, εστιάζοντας στις μεθοδολογίες, την πρόοδο και τις προκλήσεις τους.

Αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζει μια λεπτομερή εξερεύνηση των στρατηγικών γονιδιακής θεραπείας που επινοήθηκαν για την καταπολέμηση της β θαλασσαιμίας. Κάθε προσέγγιση, από την προσθήκη γονιδίων έως την επεξεργασία γονιδίων, προσφέρει ελπίδα αλλά παρουσιάζει και μοναδικές προκλήσεις. Καθώς η επιστημονική κοινότητα προχωρά, η τελειοποίηση αυτών των στρατηγικών και η διασφάλιση της ασφάλειάς τους θα είναι πρωταρχικής σημασίας για την αξιοποίηση του πλήρους δυναμικού της γονιδιακής θεραπείας για τη β-θαλασσαιμία. Οι στρατηγικές συνοψίζονται στην **εικόνα 8**, όπου απεικονίζονται επίσης και τα βασικά βήματα της ex vivo γονιδιακής θεραπείας για τη νόσο.



**Εικόνα 8. Διαδικασία γονιδιακής θεραπείας με προσθήκη γονιδίου ή με γονιδιακή επεξεργασία στη β-θαλασσαιμία.** Τα επιλεγμένα CD34+ προγονικά κύτταρα (μυελός των οστών ή κύτταρα από περιφερικό αίμα) του ασθενούς τροποποιούνται γενετικά είτε με την προσθήκη ιικού φορέα ενός φυσιολογικού γονιδίου β ή γ είτε με γονιδιακή επεξεργασία με νουκλεάσες (Crisp/Cas9 ή ZFN), που επιδιορθώνουν τη μετάλλαξη της β σφαιρίνης ή οδηγούν σε διαγραφή γονιδιωματικών περιοχών του γονιδίου BCL11A προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή εμβρυϊκής Hb (HbF). Τα γενετικά τροποποιημένα CD34+ προγονικά κύτταρα προετοιμάζονται για αυτόλογη μεταμόσχευση μετά από αυστηρές διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου. Ο ασθενής λαμβάνει την κατάλληλη μυελοεκαθαριστική χημειοθεραπεία και στη συνέχεια τα προγονικά κύτταρα εγχύονται στον ασθενή. [τροποποιημένη από (Makis, Voskaridou et al. 2021)]

Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπισή της μέσω γονιδιακής θεραπείας μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με διάφορους τρόπους. Όσον αφορά το μηχανισμό γονιδιακής θεραπείας, έχουν επικρατήσει δύο προσεγγίσεις: γονιδιακή προσθήκη και γονιδιακή επεξεργασία.

Η προσέγγιση προσθήκης γονιδίου περιλαμβάνει την εισαγωγή ενός λειτουργικού γονιδίου β-σφαιρίνης σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα (HSCs) του ασθενούς χρησιμοποιώντας ικούς φορείς, τυπικά λεντιούς. Η επιτυχία αυτής της μεθόδου εξαρτάται από τη σταθερή ενσωμάτωση και τη διαρκή έκφραση του θεραπευτικού γονιδίου. Ενώ οι κλινικές δοκιμές έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα στη βελτίωση των συμπτωμάτων της β θαλασσαιμίας (Cavazzana-Calvo, Payen et al. 2010), εγείρονται ανησυχίες σχετικά με τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις και την πιθανή γονοτοξικότητα λόγω της τυχαίας ενσωμάτωσης του ικού φορέα στο γονιδίωμα του ξενιστή. Αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε εισαγωγική μεταλλαξιγένεση και αυξημένο κίνδυνο ογκογένεσης (Howe, Mansour et al. 2008).

Η γονιδιακή επεξεργασία αποτελεί μία από τις πιο πρόσφατες εξελίξεις που έχουν επικεντρωθεί στην άμεση διόρθωση της μετάλλαξης του γονιδίου της β-σφαιρίνης στα HSC του ίδιου του ασθενούς χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR-Cas. Αυτή η μέθοδος προσφέρει δυναμική θεραπεία, αντιμετωπίζοντας τη διαταραχή στη γενετική της υπόβαθρο, αντικαθιστώντας τα μεταλλαγμένα τμήματα στα παθολογικά αλληλόμορφα, με φυσιολογικά.

Πρώιμες μελέτες και δοκιμές έχουν δείξει τη σκοπιμότητα αυτής της προσέγγισης (Dever, Bak et al. 2016). Ωστόσο, τα δεδομένα είναι ακόμη πρώιμα και η αποτελεσματικότητα της επιδιόρθωσης με ομόλογο ανασυνδυασμό (HDR) σε HSC, οι εν δυνάμει ενσωματώσεις "εκτός στόχου" (off-target) και οι προκλήσεις στην ασφαλή και αποτελεσματική μεταφορά του συστήματος CRISPR-Cas9 στα HSC, είναι κρίσιμα ζητήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν πριν την ευρεία κλινική χρήση της μεθόδου. Ακολουθεί ανάλυση προσεγγίσεων που έχουν προταθεί και επαληθευθεί για την αντιμετώπιση της νόσου.

#### 4.1 Υπερέκφραση β σφαιρίνης με γονιδιακή θεραπεία *ex vivo*

Μία από τις πιο άμεσες μεθόδους γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνει την εισαγωγή μιας λειτουργικής εκδοχής του γονιδίου HBB στα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα του ασθενούς (HSCs). Η διαδικασία ξεκινά με τη συλλογή HSCs από τον ασθενή, συνήθως μέσω της επιλογής κυττάρων που εκφράζουν ειδικούς φαινοτυπικούς δείκτες όπως είναι ο CD34 (Greaves, Brown et al. 1992). Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια τροποποιούνται γενετικά για να φέρουν ένα λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου HBB. Αυτή η τροποποίηση μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας ιικούς φορείς όπως οι λεντιοί, οι οποίοι έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν αποτελεσματικά το σωστό γονίδιο στα HSCs (Nienhuis, Dunbar et al. 2006).

Πριν επανεισαχθούν τα τροποποιημένα HSCs στον ασθενή, είναι απαραίτητο να ακολουθηθεί ένα θεραπευτικό σχήμα, που συνήθως περιλαμβάνει χημειοθεραπεία. Αυτό το βήμα είναι ζωτικής σημασίας για τη δημιουργία θώκου στον μυελό των οστών ώστε να είναι δεκτικός σε εμφύτευση των νέων κυττάρων. Σύμφωνα με τους Thompson et al, το θεραπευτικό σχήμα είναι ένα κρίσιμο συστατικό της γονιδιακής θεραπείας, επηρεάζοντας τόσο την επιτυχία της μεταμόσχευσης όσο και την ασφάλεια των ασθενών (Thompson, Walters et al. 2018). Αργότερα, τα γενετικά τροποποιημένα HSCs εισάγονται με ενδοφλέβια ένεση πίσω στην κυκλοφορία του αίματος του ασθενούς. Μεταναστεύουν στον μυελό των οστών, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται για να παράγουν φυσιολογική αιμοσφαιρίνη. Μια μελέτη ορόσημο από τους Cavazzana-Calvo et al. έδειξε επιτυχημένη μεταμόσχευση και παραγωγή αιμοσφαιρίνης σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία μετά από αυτή τη διαδικασία (Cavazzana-Calvo, Payen et al. 2010).

Μετά τη μεταμόσχευση, οι ασθενείς παρακολουθούνται στενά για ανεπιθύμητες ενέργειες. Η επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας τυπικά αξιολογείται μέσω παρακολούθηση της βελτίωσης στα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και μειωμένες απαιτήσεις μετάγγισης. Όπως υπογραμμίζεται σε μια μελέτη των Ribeil et al. (2017, New England Journal of Medicine), η μακροχρόνια παρακολούθηση είναι απαραίτητη για τη διασφάλιση της αποτελεσματικότητας της γονιδιακής θεραπείας στις

θαλασσαιμίες αλλά και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία (Ribeil, Hacein-Bey-Abina et al. 2017). Κάθε ένα από αυτά τα βήματα είναι κρίσιμο για την επιτυχία της γονιδιακής θεραπείας στη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας.

Έχουν αναφερθεί πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε κλινικές μελέτες που υιοθετούν αυτή την προσέγγιση. Σημείο αναφοράς αποτελεί η ανάπτυξη του Betibeglogene autotemcel ως η πρώτη θεραπεία που έχει εγκριθεί από τον EMA και τον FDA, όπως θα αναλυθεί στην επόμενη ενότητα (Asghar, Khabir et al. 2022). Ωστόσο, η χρήση της ανωτέρω τεχνολογίας δεν έρχεται χωρίς προκλήσεις: ενώ οι λεντικοί φορείς δείχνουν πολλά υποσχόμενοι, η διασφάλιση της ενσωμάτωσης στη σωστή γονιδιωματική θέση χωρίς να προκαλούνται αποτελέσματα «εκτός στόχου» ή η πιθανότητα να προκαλούν κακοήθειες παραμένει βάσιμη ανησυχία (Montini, Cesana et al. 2006, Rattananon, Anurathapan et al. 2021). Εναλλακτικά, τεχνολογίες επεξεργασίας γονιδίων, όπως η τεχνολογία CRISPR/Cas9 μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ακριβή επεξεργασία γονιδίων. Μελέτες όπως οι Canver et al. (2015, Science) καταδεικνύουν τη δυνατότητα του CRISPR/Cas9 στη διόρθωση μεταλλάξεων γονιδίων β-σφαιρίνης απευθείας στα HSCs.

Αντί να στοχεύει το ελαττωματικό γονίδιο β-σφαιρίνης, μια άλλη στρατηγική στοχεύει στην αύξηση της παραγωγής γ σφαιρίνης, μιας εμβρυϊκής μορφής αιμοσφαιρίνης που εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε ενήλικες. Προς αυτή την κατεύθυνση, έγιναν προσπάθειες έγιναν για υπερέκφραση του γονιδίου της γ σφαιρίνης μέσω προσθήκης εξωγενούς γονιδίου στον οργανισμό του ασθενούς. Εναλλακτικά, η επαγωγή έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου, θεωρείται ως μία σημαντική εξέλιξη σε σχέση με την προσθήκη ενός εξωγενούς αλληλομόρφου γ σφαιρίνης. Παρακάτω, αναφέρονται κάποιες από τις σημαντικότερες προσεγγίσεις προς αυτή την κατεύθυνση:

- Το 2003, οι Persons et al. ανέπτυξαν τον φορέα "d432βAγ", ο οποίος εξέφραζε γ-σφαιρίνη υπό τον έλεγχο στοιχείων LCR βήτα-σφαιρίνης, με αποτέλεσμα ελάχιστη επαγωγή του γονιδίου (Persons, Hargrove et al. 2003).
- Οι Hanawa et al. το 2004 (Hanawa, Hargrove et al. 2004) χρησιμοποίησαν μεγαλύτερο LCR για να επιτύχουν πιο συνεπή έκφραση σε οργανισμούς μοντέλα.
- Το 2006, έγινε απόπειρα να κατασκευαστεί ένας υβριδικός φορέας που να εκφράζει γ-σφαιρίνη και ταυτόχρονα να στοχεύει τη β-σφαιρίνη μέσω της τεχνολογίας siRNA (Samakoglu, Lisowski et al. 2006). Ανακάλυψαν ότι η τοποθέτηση του

siRNA ήταν μια σημαντική προσθήκη, καθώς επηρέαζε την ποσότητα έκφρασης γ-σφαιρίνης (Samakoglu, Lisowski et al. 2006).

- Πιο πρόσφατα η αλληλουχία από το γονίδιο της γ-σφαιρίνης τροποποιήθηκε ώστε να περιέχει ένα 3'UTR από β-σφαιρίνη, έχοντας ως υπόβαθρο ότι ειδικές πρωτεΐνες δεσμεύουν την περιοχή 3'UTR και αυξάνουν τη σταθερότητα του mRNA (Pestina, Hargrove et al. 2009). Η προσέγγιση αυτή, σε συνδυασμό με προσθήκη άλλων ρυθμιστικών αλληλουχιών – όπως του ρυθμιστικού στοιχείου/μονωτή cHS4 – οδήγησε σε αυξημένη παραγωγή εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (HbF) που κυμαινόταν μεταξύ 45 και 60% και έως τριπλάσια αύξηση της συνολικής περιεκτικότητας σε αιμοσφαιρίνες (Wilber, Hargrove et al. 2011).
- Η ομάδα των Παπανικολάου et al. (Papanikolaou, Georgomanoli et al. 2012), τροποποίησε τον υποκινητή της γ-σφαιρίνης, εισάγοντας μεταλλάξεις σε κατασταλτικά ρυθμιστικά στοιχεία, με στόχο να αυξήσει τη σύνθεση γ-σφαιρίνης χωρίς το LCR. Η προσέγγιση αυτή οδήγησε σε ήπια βελτίωση της σύνθεσης της HbF σε σύγκριση με μάρτυρες. Η περαιτέρω μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση αποτελεί μια σημαντική εναλλακτική στην υπερέκφραση της β-σφαιρίνης.

## 4.2 Επαγωγή έκφρασης γ σφαιρίνης μέσω καταστολής BCL11A

Πριν από δεκαετίες, διαπιστώθηκε ότι οι ασθενείς με β-θαλασσαιμία ή δρεπανοκυτταρική αναιμία εμφανίζουν λιγότερο σοβαρά συμπτώματα όταν τα ποσοστά HbF είναι αυξημένα λόγω της κατάστασης που είναι γνωστή ως κληρονομική επιμονή της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης (Perrine, Brown et al. 1972, Platt, Brambilla et al. 1994, Charache, Terrin et al. 1995, Bunn 1997). Στη β-θαλασσαιμία, τα αυξημένα επίπεδα γ-σφαιρίνης αντισταθμίζουν την ανεπάρκεια β-σφαιρίνης, βελτιώνοντας την ανισορροπία στην αναλογία α προς β-σφαιρίνη, βελτιώνοντας τα συμπτώματα αναιμίας.

Οι μηχανισμοί προστατευτικής δράσης από τις εμβρυϊκές σφαιρίνες στη δρεπανοκυτταρική αναιμία προκύπτουν από γεγονός ότι οι αλυσίδες γ-σφαιρίνης συνενώνονται σε μικτά τετραμερή αιμοσφαιρίνης που δεν συμμετέχουν στο σχηματισμό πολυμερών, αναστέλλοντας αφενός τη δρεπάνωση και οδηγώντας



αφετέρου σε ηπιότερο κλινικό φαινότυπο. Επίπεδα HbF πάνω από 20%, βελτιώνουν τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων νόσου και βελτιώνουν την επιβίωση των ασθενών.

Η πρωτεΐνη CLL/λεμφώματος 11A (BCL11A) των B κυττάρων είναι ένας κύριος μεταγραφικός ρυθμιστής της έκφρασης της πρωτεΐνης HbF (Menzel, Garner et al. 2007, Uda, Galanello et al. 2008) Μία γενετική παραλλαγή στον ενισχυτή του BCL11A επηρεάζει την έκφρασή του και, κατά συνέπεια, τα επίπεδα HbF (Bauer, Kamran et al. 2013). Οι ασθενείς με απλοανεπάρκεια BCL11A έχουν αυξημένα επίπεδα HbF στο αίμα οδηγώντας δυνητικά σε βελτίωση της κλινικής εικόνας συνδυαστικά με β-αιμοσφαιρινοπάθειες (Funnell, Prontera et al. 2015).

Η κύρια πρόκληση του συγκεκριμένου τύπου θεραπείας ήταν το αποτέλεσμα της καταστολής της έκφρασης του BCL11A μόνο σε ερυθροειδή κύτταρα, καθώς η διαταραχή του BCL11A μπορεί να έχει κρίσιμες επιπτώσεις και σε άλλες, φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες πέρα από τον έλεγχο της έκφρασης της εμβρυικής αιμοσφαιρίνης. Το BCL11A παίζει σημαντικό ρόλο, μεταξύ άλλων, στην αυτοανανέωση των HSC, στην ωρίμανση των B-λεμφοκυττάρων και στην ανάπτυξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (Liu, Keller et al. 2003, Ippolito, Dekker et al. 2014, Tsang, Yu et al. 2015, Luc, Huang et al. 2016)(40-43). Για το σκοπό αυτό, διερευνώνται πολλαπλές προσεγγίσεις για την γενετική πρόκληση έκφρασης της HbF.

Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι η στόχευση του BCL11A χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση λεντιού με shRNA/miRNA προκαλεί επαγωγή HbF σε ανθρώπινα ερυθροειδή κύτταρα (Sankaran, Menne et al. 2008, Guda, Brendel et al. 2015). Δεδομένου ότι αλληλουχίες ενισχυτών είναι υπεύθυνες για την έκφραση του BCL11A στα ερυθροειδή κύτταρα, η απλή διακοπή από μια νουκλεάση, είτε πρόκειται για νουκλεάσες δακτύλου ψευδαργύρου (ZFN), ενεργοποιητές μεταγραφής όπως νουκλεάσες τελεστές (TALENs) ή CRISPR-Cas9, μπορεί να είναι αρκετή για να διαταραχθεί η έκφραση BCL11A σε πρόδρομα ερυθρά αιμοσφαίρια με αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα HbF (Canver, Smith et al. 2015, Chang, Smith et al. 2017).

Αρκετές μελέτες έδειξαν την επιτυχή λειτουργική διόρθωση των θαλασσαιμικών και δρεπανοκυτταρική αναιμία CD34+ κυττάρων in vitro και in vivo είτε με την αδρανοποίηση ZFN είτε με CRISPR-Cas9 του BCL11A-ερυθροειδούς ενισχυτή (Psatha, Reik et al. 2018). Αυτές οι αναφορές ανέδειξαν νέες και αποτελεσματικές στρατηγικές επεξεργασίας γονιδιώματος για την καταστολή της

έκφρασης του γονιδίου BCL11A είναι πολλά υποσχόμενες θεραπευτικές επιλογές για τις αιμοσφαιρινοπάθειες (Wu, Zeng et al. 2019). Επιπλέον, οι προσεγγίσεις επεξεργασίας θα μπορούσαν να είναι θεωρητικά πιο ασφαλείς σε σύγκριση με τους λεντιούς που ενσωματώνονται τυχαία στο γονιδίωμα (Cattoglio, Facchini et al. 2007, Markt, Scaramuzza et al. 2019). Κλινικές δοκιμές που βασίζονται σε αυτήν την προσέγγιση βρίσκονται σε εξέλιξη και αναφέρονται στην επόμενη ενότητα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μία πρόσφατη μελέτη καταδεικνύεται η αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας γονιδίων μέσω της τεχνολογίας CRISPR-Cas9. Ειδικότερα, στοχεύοντας τον ειδικό ενισχυτή του γονιδίου BCL11A σε προγονικά κύτταρα CD34+, οι ερευνητές πέτυχαν περίπου 80% αποτελεσματικότητα τροποποίησης χωρίς φαινόμενα εκτός στόχου. Δύο ασθενείς, ο ένας με β<sup>0</sup> θαλασσαιμία και ο άλλος με δρεπανοκυτταρική αναιμία, έλαβαν αυτόλογα κύτταρα CD34+ επεξεργασμένα για να καταστείλουν το BCL11A, οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, ανεξαρτησία από μετάγγιση και εξάλειψη των αγγειοαποφρακτικών επεισοδίων στον ασθενή με δρεπανοκυτταρική αναιμία, κατά τη διάρκεια ενός έτους μετά τη θεραπεία (Frangoul, Altshuler et al. 2021). Αυτή η νέα θεραπεία δείχνει πολλά υποσχόμενη για την αντιμετώπιση των υποκείμενων γενετικών αιτιών αυτών των ασθενειών. Η θεραπεία που στηρίζεται στην ανωτέρω προσέγγιση (exagamglogene autotemcel), έλαβε έγκριση τον Νοέμβριο 2023 στη Μ. Βρετανία, τον Δεκέμβριο 2023 στις ΗΠΑ, FDA για χρήση σε ασθενείς με β<sup>0</sup> θαλασσαιμία και δρεπανοκυτταρική αναιμία και αναμένεται η έγκριση και στην Ευρώπη (Hoy 2024).

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΤΡΕΧΟΥΣΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ,  
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΕΙΣ**

## **Κεφάλαιο 5: Τρέχουσες θεραπείες, κλινικές δοκιμές και μελλοντικές κατευθύνσεις**

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας για β θαλασσαιμία, με ορισμένες να παρουσιάζουν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Μία ενδιαφέρουσα παράμετρος είναι ότι η πρώτη κλινική μελέτη ξεκίνησε ήδη από το 2006, ενώ πρόσφατα έχουν εκκινηθεί πολυάριθμες μελέτες. Αυτό υποδηλώνει ότι η εξέλιξη της τεχνολογίας αλλά και η επίλυση κρίσιμων ζητημάτων ασφαλείας επέτρεψε την αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος για τη γονιδιακή θεραπεία ως μια βιώσιμη αλλά και αποτελεσματική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της β θαλασσαιμίας. Ειδικότερα, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov) που αποτελεί σημείο αναφοράς, μέχρι σήμερα έχουν διεξαχθεί 22 κλινικές μελέτες που αφορούν γονιδιακή θεραπεία για ασθενείς με β θαλασσαιμία από τις οποίες, οι 12 έχουν ολοκληρωθεί, ενώ οι υπόλοιπες βρίσκονται ακόμη σε εξέλιξη. Μία σύνοψη αυτών των μελετών δίνεται στον **πίνακα 7**.

Ανάμεσα στις κλινικές μελέτες ξεχωρίζουν αυτές που αφορούν τη γονιδιακή θεραπεία Lentiglobin BB305 η οποία πρόσφατα έλαβε έγκριση αρχικά από τις Ευρωπαϊκές ρυθμιστικές αρχές (EMA) και εκ των υστέρων από τον οργανισμό FDA των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής. Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζεται αρχικά η επιτυχημένη περίπτωση της Lentiglobin και στη συνέχεια η προοπτική επιπρόσθετων θεραπειών που προχώρησαν σε κλινικές μελέτες.

**Πίνακας 7:** Σύνοψη κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας για β θαλασσαιμία.

[ πηγή: *clinicaltrials.gov* ]

<b>NCT</b>	<b>Τίτλος (Αγγλικά)</b>	<b>ΑΡΧΗ</b>	<b>ΤΕΛΟΣ</b>
<b>NCT03275051</b>	Long-term Follow-up of Subjects Treated With OTL-300 for Transfusion Dependent Beta-thalassemia Study (TIGET-BTHAL)	4/10/2017	1/6/2026
<b>NCT01206075</b>	Evaluating the Safety and Effectiveness of Mozobil Mobilization in Adults With Beta-Thalassemia Major	2010-10	2014-12*
<b>NCT03728322</b>	iHSCs With the Gene Correction of HBB Intervent Subjests With B <sup>2</sup> -thalassemia Mutations	2019-01	2021-01*
<b>NCT03276455</b>	Gene Therapy for Beta-Thalassemia Major Using Autologous Hematopoietic Stem Cell Genetically Modified	15/9/2017	15/9/2021*
<b>NCT05015920</b>	A Study Evaluating the Safety and Efficacy of the BD211 Drug Product in Thalassemia Major Participants	1/4/2021	23/2/2024
<b>NCT01745120</b>	A Study Evaluating the Safety and Efficacy of the <b>LentiGlobin</b> BB305 Drug Product in Thalassemia Major Participants	2013-08	21/2/2018*
<b>NCT02151526</b>	A Study Evaluating the Safety and Efficacy of <b>LentiGlobin</b> BB305 Drug Product in B <sup>2</sup> -Thalassemia Major (Also Referred to as Transfusion-dependent B <sup>2</sup> -Thalassemia [TDT]) and Sickle Cell Disease	7/6/2013	26/2/2019*
<b>NCT03207009</b>	A Study Evaluating the Efficacy and Safety of the <b>LentiGlobin</b> BB305 Drug Product in Participants With Transfusion-Dependent B <sup>2</sup> -Thalassemia	8/6/2017	15/11/2022*
<b>NCT05145062</b>	Long - Term Follow Up of Sickle Cell Disease and Beta-thalassemia Subjects Previously Exposed to BIVV003 or ST-400.	21/12/2021	10/8/2037
<b>NCT00336362</b>	Evaluating the Safety of G-CSF Mobilization in Individuals With Beta Thalassemia Major	2006-07	2010-08*
<b>NCT01639690</b>	“B-Thalassemia Major With Autologous CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells Transduced With TNS9.3.55 a Lentiviral Vector Encoding the Normal Human“B-Globin Gene	2012-07	2024-07

<b>NCT02633943</b>	Long-term Follow-up of Subjects With Transfusion-Dependent B <sup>2</sup> -Thalassemia (TDT) Treated With Ex Vivo Gene Therapy	2014-01	2035-11
<b>NCT03432364</b>	A Study to Assess the Safety, Tolerability, and Efficacy of ST-400 for Treatment of Transfusion-Dependent Beta-thalassemia (TDT)	29/3/2018	17/11/2022*
<b>NCT03351829</b>	Gene Therapy of Beta Thalassemia Using a Self-inactivating Lentiviral Vector	1/12/2017	31/12/2020*
<b>NCT05860595</b>	Evaluation the Safety and Efficacy of KL003 Cell Injection in the Treatment of Transfusion-dependent B <sup>2</sup> -thalassemia.	23/5/2023	24/10/2025
<b>NCT02453477</b>	Gene Therapy for Transfusion Dependent Beta-thalassemia	2015-05	2019-08*
<b>NCT04416178</b>	Sickle Cell Disease and the Genomic and Gene Therapy Needs of Stakeholders	17/12/2020	2024-02
<b>NCT05442346</b>	Safety and Efficacy Evaluation of B-globin Reactivated Autologous Hematopoietic Stem Cells	25/12/2023	30/11/2024
<b>NCT02906202</b>	A Study Evaluating the Efficacy and Safety of the <b>LentiGlobin BB305</b> Drug Product in Participants With Transfusion-Dependent B-Thalassemia, Who do Not Have a B <sup>0</sup> /B <sup>0</sup> Genotype	8/8/2016	31/3/2022*
<b>NCT05762510</b>	A Study Evaluating the Safety and Efficacy of LentiRed Drug Product in Transfusion-dependent B-Thalassemia [TDT]	22/2/2023	31/10/2030
<b>NCT04211480</b>	Safety and Efficacy Evaluation of B-globin Reactivated Autologous Hematopoietic Stem Cells	1/4/2020	1/12/2023*
<b>NCT05991336</b>	Growth and Development-related Outcomes in Children With Transfusion-dependent Beta-thalassemia After Gene Therapy	5/6/2023	31/12/2029
<b>NCT: αριθμός μελέτης,</b>			
<b>*: η μελέτη έχει ολοκληρωθεί</b>			

## 5.1 Εγκεκριμένες γονιδιακές θεραπείες

Το Lentiglobin, γνωστό επίσης ως betibeglogene autotemcel ή beti-cel, είναι το όνομα του προϊόντος γονιδιακής θεραπείας που αναπτύχθηκε από την bluebird bio για τη θεραπεία της β θαλασσαιμίας (Asghar, Khabir et al. 2022). Αυτό το προϊόν είναι περισσότερο γνωστό στην Ευρωπαϊκή Ένωση και τις ΗΠΑ με την εμπορική του ονομασία Zynteglo.

Το Lentiglobin/Zynteglo είναι μια ex vivo γονιδιακή θεραπεία, η οποία περιλαμβάνει αρχικά τη συλλογή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων ενός ασθενούς. Ακολουθεί η τροποποίησή τους χρησιμοποιώντας έναν λεντικό φορέα για την εισαγωγή ενός λειτουργικού γονιδίου β-σφαιρίνης. Τα τροποποιημένα κύτταρα στη συνέχεια, εγχέονται πίσω στον ασθενή με σκοπό την παραγωγή φυσιολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων και την αποφυγή της ανάγκης για τακτικές μεταγγίσεις αίματος σε άτομα με β θαλασσαιμία και δρεπανοκυταρική αναιμία που εξαρτώνται από μετάγγιση (Kanter, Walters et al. 2022).

Οι αρχικές παρατηρήσεις από τις κλινικές δοκιμές του φορέα LentiGlobin BB305 (NCT02151526 και NCT01745120, φορέας BB305, Πίνακας 7) έδειξαν ότι 11 από τους 13 ασθενείς που δεν είχαν γονότυπο  $\beta^0/\beta^0$  μπόρεσαν να διακόψουν τη μετάγγιση αίματος (Thompson, Walters et al. 2018, Ikawa, Miccio et al. 2019). Ωστόσο, η θεραπεία για τον σοβαρό γονότυπο της β-θαλασσαιμίας  $\beta^0/\beta^0$  έχει αποδειχθεί πιο απαιτητική. Σε τέτοιους ασθενείς, η αύξηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης σε θεραπευτικά επίπεδα, μετά τη μεταγωγή με λεντιό που φέρει το γονίδιο β-σφαιρίνης, απαιτούν αυξημένο αριθμό αντιγράφων (Breda, Casu et al. 2012). Στις ίδιες δοκιμές του LentiGlobin BB305, πέντε στους εννέα ασθενείς με γονότυπο  $\beta^0/\beta^0$  ή δύο αντίγραφα της μετάλλαξης IVS1-110 - που είναι μια μορφή μη  $\beta^0/\beta^0$  με σοβαρό φαινοτυπικό αντίκτυπο - εξακολουθούν να χρειάζονται μεταγγίσεις (Thompson, Walters et al. 2018). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι, ενώ οι μη-  $\beta^0/\beta^0$  γονότυποι ενδέχεται να απαιτούν σχετικά χαμηλά επίπεδα γονιδιωματικών ενσωματώσεων του φορέα ώστε να φθάσουν σε επίπεδο θεραπείας ανεξάρτητο μετάγγισης, οι γονότυποι  $\beta^0/\beta^0$  ή IVS1-110 απαιτούν μεγαλύτερο αριθμό αντιγράφων φορέα ώστε να επιτευχθούν αντίστοιχα θεραπευτικά αποτελέσματα. Συμπερασματικά

η θεραπεία LentiGlobin αποτελεί ένα σημαντικό και πολλά υποσχόμενο βήμα στην ριζική αντιμετώπιση της νόσου.

Αξίζει να αναφερθεί ότι σε μια κλινική δοκιμή που περιελάμβανε ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, έχουν αναφερθεί δύο περιπτώσεις αιματολογικών κακοηθειών: μία περίπτωση μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου και μία άλλη οξείας μυελογενούς λευχαιμίας. Αυτοί οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε γονιδιακή θεραπεία Lentiglobin. Λεπτομερείς γονιδιωματικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι η αιμοποιητική εξαλλαγή που παρατηρήθηκε σε αυτά τα άτομα δεν συσχετιζόταν και δεν μπορούσε να αποδοθεί στην ίδια τη γονιδιακή θεραπεία. Αντίθετα, καθορίστηκε ότι το σχήμα μυελοεκαθαριστικής χημειοθεραπείας που χρησιμοποιήθηκε ως προπαρασκευαστικό βήμα για τη γονιδιακή θεραπεία, σε συνδυασμό με την εγγενή προδιάθεση των ασθενών, ήταν η πιθανή αιτία αυτών των κακοηθειών (Hsieh, Bonner et al. 2020, Magrin, Semeraro et al. 2022). Στις μελέτες γονιδιακής θεραπείας σε θαλασσαιμικούς ασθενείς, δεν έχουν αναφερθεί περιπτώσεις εισχωριτικής μεταλλαξιγένεσης.

Εντούτοις, παρότι τα παραπάνω δεδομένα αποτελούν θετικό προμήνυμα για τη χρήση προσεγγίσεων γονιδιακής θεραπείας για τη θεραπεία αιμοσφαιρινοπαθειών, η πιθανή ανησυχία είναι ότι η απαίτηση για υψηλό VCN σε επιβαρυσμένη κλινική εικόνα, μπορεί επίσης να οδηγήσει σε αυξημένο κίνδυνο εισαγωγικής μεταλλαξιγένεσης. Επιπλέον, για τον ίδιο λόγο τίθενται περιορισμοί ακόμη και αποκλεισμός στη χρήση αυτών των φορέων για μερικώς μυελοεκαθαριστικά σχήματα (μικρομεταμοσχεύσεις) που θα επέτρεπαν μειωμένη τοξική προετοιμασία, αλλά θα μείωναν επίσης τον αριθμό των γενετικά τροποποιημένων μεταμοσχευμένων HSCs. Για το σκοπό αυτό, ενδέχεται να απαιτείται μελλοντική τροποποίηση του φορέα LV για να εκφράζει υψηλότερα επίπεδα αιμοσφαιρίνης. Οι νέοι φορείς θα μπορούσαν επίσης να φέρουν τροποποιημένη και πιο λειτουργική β-σφαιρίνη και ταυτόχρονα να καταστέλλουν την έκφραση του BCL11A στην ερυθροειδή σειρά κυττάρων. Σε αυτό το περιβάλλον, όπου τα κύτταρα εκφράζουν αρκετά υψηλά επίπεδα θεραπευτικών σφαιρινών, ο μικτός χιμαρισμός μπορεί να είναι αποδεκτός.

Όσον αφορά το ρυθμιστικό καθεστώς, το Zynteglo έλαβε αρχικά άδεια κυκλοφορίας υπό όρους από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (EMA) για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Αντίστοιχα, σε δεύτερο χρόνο αποτέλεσε εγκεκριμένη και από τον FDA γονιδιακή θεραπεία για τη β θαλασσαιμία. Αυτή η θεραπεία



αντιπροσωπεύει μια σημαντική πρόοδο για τους ασθενείς, προσφέροντας μια εν δυνάμει θεραπεία εφ' όρου ζωής. Η έγκριση βασίστηκε σε μελέτες φάσης III που έδειξαν ότι το 89% των αξιολογήσιμων ασθενών πέτυχε ανεξαρτησία μετάγγισης, ένα σημαντικό ορόσημο στη θεραπεία αυτής της γενετικής νόσου. Ο τομέας της γονιδιακής θεραπείας εξελίσσεται ταχέως και ενδέχεται να προκύψουν νέες θεραπείες ή πρόσθετες εγκρίσεις σύντομα.

Οι εξελίξεις στον κλάδο τα τελευταία έτη είναι αλματώδεις. Ως αποτέλεσμα, μία θεραπεία που στηρίζεται στην τεχνολογία επεξεργασίας γονιδίων μέσω της τεχνολογίας CRISPR-Cas9 έχει λάβει πρόσφατα έγκριση από ρυθμιστικούς φορείς για χρήση σε ασθενείς με β θαλασσαιμία. Συγκεκριμένα, η στόχευση CRISPR-Cas9 επιτρέπει τροποποίηση στον ενισχυτή του γονιδίου BCL11A σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα CD34+, οδηγώντας σε ειδική καταστολή του BCL11A, αυξημένα επίπεδα εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης και ανεξαρτησία από μετάγγιση κατά τη διάρκεια ενός έτους μετά τη θεραπεία (Frangoul, Altshuler et al. 2021).

Η θεραπεία που στηρίζεται στην ανωτέρω προσέγγιση CASGEVY™ (exagamglogene autotemcel / exa-cel) αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη λύση για την εξαρτώμενη από μετάγγιση β-θαλασσαιμία. Στη δοκιμή CLIMB THAL-111, 44 ασθενείς ηλικίας 12 έως 35 ετών με β<sup>0</sup> θαλασσαιμία υποβλήθηκαν σε θεραπεία με exa-cel μετά από μυελοεκαθαριστική θεραπεία. Η θεραπεία οδήγησε σε σημαντικά αποτελέσματα, με 42 από τους 44 ασθενείς να διακόπτουν εντελώς τις μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η θεραπεία είχε ως αποτέλεσμα συνεχείς αυξήσεις στα επίπεδα HbF και ολικής αιμοσφαιρίνης πάνω από 9 g/dL, με ένα μέσο επίπεδο να διατηρείται πάνω από 11 g/dL, υποδεικνύοντας αποτελεσματική και ανθεκτική επεξεργασία του γονιδίου BCL11A σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα. Δύο ασθενείς παρουσίασαν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη θεραπεία, αλλά αυτές επιλύθηκαν χωρίς αναφερόμενους θανάτους, διακοπή ή κακοήθειες. Συνολικά, το exa-cel επιδεικνύει ισχυρό προφίλ ασφάλειας και αποτελεσματικότητα στην εξάλειψη της ανάγκης για μεταγγίσεις σε ασθενείς με β θαλασσαιμία (Locatelli, Lang et al. 2022).

Νεότερα δεδομένα από τη μελέτη, με μέση παρακολούθηση 20,4 μηνών, αναδεικνύουν ότι οι ασθενείς εμφάνισαν πρώιμες και παρατεταμένες αυξήσεις στα επίπεδα αιμοσφαιρίνης και εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης, οδηγώντας σε σημαντικές

μειώσεις ή πλήρη διακοπή των απαιτήσεων μετάγγισης κατά αυτό το διάστημα. Η θεραπεία οδήγησε επίσης σε βελτιωμένη ποιότητας ζωής για τους ασθενείς. Αν και οι περισσότεροι ασθενείς παρουσίασαν ανεπιθύμητες ενέργειες, τυπικά ήπιας έως μέτριας βαρύτητας, το προφίλ ασφάλειας του exa-cel ήταν σύμφωνο με τις προσδοκίες για μυελοεκαθαριστική προετοιμασία και μεταμόσχευση αυτόλογων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Αυτά τα ευρήματα ενισχύουν τη δυνατότητα του exa-cel ως εφάπαξ λειτουργικής θεραπείας για τη β-θαλασσαιμία (καθώς και τη δρεπανοκυτταρική αναιμία) σηματοδοτώντας μια σημαντική πρόοδο στη θεραπεία αυτής της γενετικής διαταραχής του αίματος, προσφέροντας ένα σημαντικό βήμα προς μια εφάπαξ λειτουργική θεραπεία για τη νόσο μέσω της τεχνολογίας CRISPR-Cas9 (Frangoul, Locatelli et al. 2023, Locatelli, Lang et al. 2023, Marara, Locatelli et al. 2024).

Ως αποτέλεσμα των ανωτέρω ενθαρυντικών αποτελεσμάτων, το Exagamglogene autotemcel (Casgevy™), που αναπτύχθηκε από την Vertex Pharmaceuticals και την CRISPR Therapeutics, αποτελεί ορόσημο στη γονιδιακή θεραπεία, έχοντας λάβει την εναρκτήρια έγκρισή του στο Ηνωμένο Βασίλειο στις 16 Νοεμβρίου 2023, για τη θεραπεία της β-θαλασσαιμίας και της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. νόσος σε ασθενείς ηλικίας 12 ετών και άνω. Αυτή η καινοτόμος θεραπεία, η οποία αξιοποιεί την τεχνολογία CRISPR/Cas9 προσφέρει μια νέα θεραπευτική επιλογή για ασθενείς που δεν έχουν αντίστοιχο δότη αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Μετά την έγκρισή του στο Ηνωμένο Βασίλειο, το Casgevy™ έλαβε επίσης έγκριση στις ΗΠΑ στις 8 Δεκεμβρίου 2023. Επίσης, έλαβε θετική γνώμη στην ΕΕ στις 14 Δεκεμβρίου 2023, υπογραμμίζοντας τις σημαντικές δυνατότητές του για την αντιμετώπιση αυτών των αιματολογικών διαταραχών σε παγκόσμια κλίμακα (Hoy 2024).

## 5.2 Λοιπές κλινικές δοκιμές

Πρόσφατες κλινικές δοκιμές περιλαμβάνουν μία σειρά από θεραπείες που βρίσκονται ακόμη υπό έλεγχο από τις ρυθμιστικές αρχές. Το OTL-300 είναι ένα φαρμακευτικό προϊόν γονιδιακής θεραπείας, που στοχεύει αυτόλογα αιμοποιητικά βλαστικά/προγονικά CD34+ κύτταρα. Τα κύτταρα τροποποιούνται γενετικά με έναν λεντικό φορέα (GLOBE) που κωδικοποιεί το γονίδιο ανθρώπινης β σφαιρίνης. Το

TIGET-BTHAL (NCT03275051) είναι μια μελέτη φάσης I/II που αξιολογεί την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του OTL-300 σε άτομα με β-θαλασσαιμία εξαρτώμενη από μετάγγιση, για 2 χρόνια μετά τη γονιδιακή θεραπεία (Zakaria, Bahar et al. 2022).

Στο Μιλάνο, εννέα άτομα – 4 ενήλικες και 5 παιδιατρικοί ασθενείς – υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τον φορέα GLOBE, ο οποίος ενσωματώνει μόνο συγκεκριμένα ρυθμιστικά στοιχεία έκφρασης, τα HS2 και HS3, παραλείποντας το στοιχείο HS4 του LCR του γονιδιακού τύπου της β-σφαιρίνης. Η αφαίρεση του HS4 αυξάνει τον τίτλο του ιού, διατηρώντας παρόμοια γονιδιακή έκφραση του γονιδίου β. Από τους ασθενείς που προαναφέρθηκαν, οι τέσσερις ενήλικες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία παρουσίασαν σημαντική μείωση στις απαιτήσεις μετάγγισης, ενώ τα 4/5 των παιδιών πέτυχαν ανεξαρτησία από μετάγγιση (Marktel, Scaramuzza et al. 2019). Δύο πρόσφατες κλινικές μελέτες που διεξάγονται στην Κίνα χρησιμοποιούν δύο νέους λεντιούς: η μία, αποτελεί μελέτη Φάσης 1 για την αξιολόγηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του φαρμακευτικού προϊόντος BD211 (NCT05015920) ενώ η άλλη είναι μια δοκιμή Φάσης 1 που θα αξιολογήσει την ικανότητα του συστήματος LentiHBBT87Q να αποκαθιστά την έκφραση της βT87Q-σφαιρίνης σε παιδιατρικούς ασθενείς με β θαλασσαιμία (NCT04592458) (Germino-Watnick, Hinds et al. 2022).

Οι κλινικές μελέτες εν ενεργεία περιλαμβάνουν τεχνολογίες γονιδιακής τροποποίησης. Η χρήση CRISPR/Cas9 για την επιδιόρθωση του αλληλομόρφου β από την Εταιρεία Allife Medical Science and Technology Co., Ltd. (NCT03728322) αποτελεί μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική που αφενός οδηγεί σε αφαίρεση του παθολογικού αλληλομόρφου και αφετέρου αποφεύγει τους κινδύνους ενσωμάτωσης λεντιών (Hirakawa, Krishnakumar et al. 2020). Αντίστοιχα, έχει αναπτυχθεί μια σειρά από νέα θεραπείες γονιδιακής επεξεργασίας χρησιμοποιώντας αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα με νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs) για την επανενεργοποίηση της έκφρασης HbF. Τα ZFN στοχεύουν το μοτίβο δέσμευσης του GATA1 (GATAA) εντός ενός ιντρονικού ερυθροειδικού ενισχυτή (ESE) του BCL11A, ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό καταστολέα της HbF. Η επεξεργασία με τη μεσολάβηση ZFN του BCL11A ESE έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε επανενεργοποίηση της HbF. Οι δύο σχετιζόμενες υποψήφιες θεραπείες, η ST-400 και η BIVV003, βρίσκονται επί του παρόντος σε κλινικές δοκιμές για εξαρτώμενη από

μετάγγιση β θαλασσαιμία (NCT03432364) και δρεπανοκυτταρική αναιμία (NCT03653247), αντίστοιχα (Lessard, Rimmele et al. 2019).

Σε δοκιμή που χρηματοδοτήθηκε από το IRCCS San Raffaele για τη β-θαλασσαιμία (NCT02453477, Πίνακας 7), οι ανάγκες μετάγγισης μειώθηκαν σε τρεις ενήλικες ασθενείς με σοβαρό γονότυπο  $\beta^0/IVS110$  και στους τρεις από τους τέσσερις παιδιατρικούς ασθενείς (συμπεριλαμβανομένου ενός με  $IVS110/IVS110$  γονότυπο και ένα με γονότυπο  $\beta^0/\beta^0$ ) τα αποτελέσματα ήταν απόλυτα θετικά οδηγώντας σε αποδέσμευση εξάρτησης από μετάγγιση. Στους μη εξαρτώμενους από μετάγγιση ασθενείς, η πλήρης διόρθωση της αναιμίας επιτεύχθηκε μόνο με αυξημένα αντίγραφα λεντιού (αναφέρονται και ως VCN-Vector Copy Number) (Markt, Scaramuzza et al. 2019). Ομοίως, δεδομένα της δοκιμής NCT02906202 (Πίνακας 7) έδειξαν ότι υψηλότερα επίπεδα μεταγωγής ήταν ικανά να αυξήσουν τα επίπεδα Hb σε 13 g/dL σε έναν ασθενή και σε 10 g/dL σε άλλους δύο ασθενείς με γονότυπο  $\beta^0/\beta^0$  (Kanter, Walters et al. 2022).

Επιπλέον, σε ενήλικες ασθενείς με θαλασσαιμία, η υπερφόρτωση σιδήρου και το επακόλουθο οξειδωτικό στρες, η κατασταλτική επίδραση των μακροχρόνιων μεταγγίσεων και της χηλίωσης στην αιμοποίηση και την επαγωγή γήρανσης, είναι παράγοντες που θα μπορούσαν να θέσουν σε κίνδυνο την ασφάλεια και την επιτυχία της τροποποίησης των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (Pilo and Angelucci 2019). Μεταξύ των άλλων διαθέσιμων ενώσεων, το Plerixafor/ Mozobil (NCT01206075) αντιπροσωπεύει μια σημαντική επικουρική ένωση (Yannaki, Karponi et al. 2013) και έχει αποδειχθεί ασφαλές και αποτελεσματικό στην κινητοποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων προς διαφοροποίηση, σε ασθενείς με θαλασσαιμία (Yannaki, Karponi et al. 2013, Thompson, Walters et al. 2018, Markt, Scaramuzza et al. 2019).

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΖΗΤΗΜΑΤΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΚΑΙ ΗΘΙΚΕΣ  
ΠΡΟΕΚΤΑΣΕΙΣ**

## Κεφάλαιο 6: Ζητήματα ασφάλειας και ηθικές προεκτάσεις

Η επιδίωξη της γονιδιακής θεραπείας ως θεραπείας για τη β θαλασσαιμία, αν και πολλά υποσχόμενη, εγείρει κρίσιμα ερωτήματα σχετικά με την ασφάλεια και την ηθική. Σε αυτό το κεφάλαιο, θα εμβαθύνουμε στους κινδύνους που σχετίζονται με τη γονιδιακή θεραπεία, τα ηθικά διλήμματα που παρουσιάζει, τα ρυθμιστικά πλαίσια, την ενημερωμένη συναίνεση και τη δημόσια αντίληψη αυτού του σημαντικού αναδυόμενου πεδίου της Ιατρικής.

Η χρήση των λεντικών φορέων στις μεθόδους γονιδιακής θεραπείας εγείρει ζητήματα ασφαλείας και ανησυχίες, σχετικά με παρενέργειες που μπορεί να εμφανιστούν κατά τη χρήση. Συγκεκριμένα, ο γενετικός ανασυνδυασμός των γονιδίων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των καλυμμάτων των γενετικά τροποποιημένων ιών μπορεί – υποθετικά – να οδηγήσει στην παραγωγή ενός λεντιού ικανού να πολλαπλασιαστεί και να εξαπλωθεί στον ξενιστή οδηγώντας σε εκτεταμένη λοίμωξη και έντονη ανοσολογική απόκριση (Cornetta, Koop et al. 2020). Είναι καθησυχαστικό ότι στις μέχρι τώρα μελέτες το συγκεκριμένο ζήτημα δεν έχει αναφερθεί.

Μια σημαντική επιπρόσθετη ανησυχία είναι οι κίνδυνοι γονοτοξικότητας από τους λεντιούς, λόγω φαινομένων ενθετικής μεταλλαξιγένεσης. Στις πρώιμες δοκιμές γονιδιακής θεραπείας για διάφορες διαταραχές, που στηρίχθηκαν στη χρήση ρετροϊών ως φορέων, σημειώθηκαν σοβαρές επιπλοκές από τον ιό. Αναφέρθηκαν άμεσα συσχετιζόμενα περιστατικά λευχαιμίας, σε ορισμένους από τους ασθενείς (Cavazzana, Bushman et al. 2019, Ferrari, Thrasher et al. 2021). Οι λεντικοί φορείς φέρονται ως σημαντικά ασφαλέστεροι, σε πολλαπλές κλινικές δοκιμές, για περισσότερες από δώδεκα διαταραχές. Γενικά, οι αναλύσεις θέσεων ενσωμάτωσης δεν φανερώνουν “hotspots” ενσωμάτωσης κοντά σε πρωτο-ογκογονίδια, ούτε κλινικά σημαντική κλωνική επέκταση. Οι μόνες κλινικά σημαντικές γονοτοξικότητες κατά τη χρήση λεντιών, έχουν εμφανιστεί με φορείς που περιείχαν συγκεκριμένα δομικά στοιχεία. Συγκεκριμένα, λεντιοί με στοιχεία ενισχυτή μακράς τελικής επανάληψης (LTR) από ρετροϊούς ή με ενσωμάτωση στοιχείου μονωτή που λειτουργεί ως θέση-δέκτης

ματίσματος, μπορεί να επηρεάσει τη γονιδιακή έκφραση και να οδηγήσει σε λανθασμένο μάτισμα των κυτταρικών μεταγραφών, σε περίπτωση που ενσωματωθεί σε αλληλουχία εσωνίων (De Ravin, Liu et al. 2022, Kohn, Chen et al. 2023). Φορείς που φέρουν εναλλακτικά δομικά στοιχεία, δηλαδή χρησιμοποιούν για παράδειγμα υποκινητές κυτταρικών γονιδίων με χαμηλή ενεργότητα ενισχυτή (π.χ. ανθρώπινη φωσφογλυκερική κινάση ή παράγοντας επιμήκυνσης-1α) ή με έκφραση περιορισμένης γενεαλογίας (π.χ. β-σφαιρίνη) δεν έχουν δείξει γονοτοξικότητα, αλλά πολυκλωνική κατανομή φορέα χωρίς κλωνικές επεκτάσεις κυττάρων που είναι χαρακτηριστικές σε μη φυσιολογικές καταστάσεις, όπως η κακοήθεια (Cavazzana, Bushman et al. 2019, Ferrari, Thrasher et al. 2021).

Εναλλακτικά της χρήσης λεντιών για την εισαγωγή γονιδίων που ενσωματώνονται τυχαία στο γονιδίωμα, οι τεχνικές γονιδιακής επεξεργασίας φέρεται να έχουν σημαντικά μειωμένους κινδύνους μεταλλάξεων λόγω τυχαίας ενσωμάτωσης στο γένωμα. Ωστόσο, οι μέθοδοι επεξεργασίας γονιδίων έχουν επίσης εγγενείς κινδύνους γονοτοξικότητας, όπως παρεμβολές και διαγραφές τμημάτων DNA διαφόρων μεγεθών στις θέσεις επεξεργασίας, απώλεια χρωμοσωμικού υλικού σε απόσταση από μια θέση διάσπασης νουκλεάσης και επεξεργασία εκτός στόχου. Οι κίνδυνοι για οποιαδήποτε συγκεκριμένη στρατηγική επεξεργασίας πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και να αξιολογούνται ως μέρος της πρακτικής ελέγχου αποτελεσματικότητας της επεξεργασίας γονιδίων για κλινική χρήση (Kohn, Chen et al. 2023).

Η παρασκευή γονιδιακά τροποποιημένων αυτόλογων φαρμακευτικών προϊόντων HSC είναι μία πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει μία σειρά από βήματα. Για κάθε αυτόλογη μεταμόσχευση απαιτείται συλλογή αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων από τον ασθενή. Αυτές οι διαδικασίες έχουν μέτρια κλινική πολυπλοκότητα, καθότι συνεπάγονται 5-7 ημέρες λήψης παράγοντα διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων G-CSF για κινητοποίηση, τοποθέτηση κατάλληλου καθετήρα κεντρικής φλεβικής αφαίρεσης και 1-3 συνεδρίες λευκαφαίρεσης. Η επιλογή κυττάρων CD34+ και, είτε η εισαγωγή λεντικού φορέα ή η γονιδιακή επεξεργασία με αντιδραστήρια που εισάγονται με ηλεκτροδιάτρηση είναι σχετικά τυποποιημένες διαδικασίες, αλλά συνεπάγονται πολλές ώρες κυτταρικής επεξεργασίας. Υπάρχει ένα σχετικά χαμηλό ποσοστό αποτυχίας, με τα κριτήρια αποδοτικότητας και ασφάλειας να πληρούνται στις περισσότερες περιπτώσεις. Τέλος, η χορήγηση των γενετικά

τροποποιημένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων στο πλαίσιο μιας κλινικής μεταμόσχευσης με μέτρια έως έντονη χημειοθεραπεία προετοιμασίας απαιτεί ιατρική φροντίδα υψηλού κινδύνου για αρκετές εβδομάδες. Ωστόσο, το κλινικό πρότυπο προσέγγισης για αυτές τις διαταραχές είναι μια αλλογενής μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων που έχει παρόμοια (αν όχι μεγαλύτερη) κλινική πολυπλοκότητα (Kohn, Chen et al. 2023).

Η χημειοθεραπεία στόχευσης μυελού των οστών χρησιμοποιείται συνήθως προμεταμοσχευτικά σχεδόν σε όλες τις ασθένειες των αιμοσφαιρίων για την επίτευξη επαρκούς θώκου για μεταμόσχευση των γονιδιακά τροποποιημένων HSCs (με την αναιμία Fanconi να αποτελεί εξαίρεση που μπορεί να επιτύχει θεραπευτικά επίπεδα μεταμόσχευσης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων χωρίς ρύθμιση του αριθμού HSCs λόγω των προβλημάτων στα HSC που είναι εγγενή στη νόσο (Rio, Navarro et al. 2019)). Η προετοιμασία ενέχει κινδύνους τοξικότητας οργάνων, λοιμώξεων, πανκυτταροπενίας που απαιτεί μεταγίσεις και συχνή χορήγηση αντιβιοτικών ενώ επιφέρει ενοχλήσεις όπως βλεννογονίτιδα, ναυτία, έμετο, ανορεξία και αλωπεκία. Ενώ η χημειοθεραπεία προετοιμασίας ενέχει επίσης κινδύνους από πιθανές μεταλλαξιγόνες επιδράσεις αλκυλιωτικών παραγόντων, τουλάχιστον μία αναφορά κοόρτης ασθενών με ADA SCID που έλαβαν μειωμένης έντασης προετοιμασία με βου σουλφάνη δεν οδήγησε σε μεταλλάξεις (White, Lee et al. 2022). Ωστόσο, υπάρχει μεγάλη προσπάθεια για την αντικατάσταση της χημειοθεραπείας με λιγότερο τοξικούς παράγοντες προετοιμασίας, όπως μονοκλωνικά αντισώματα έναντι σε δείκτες βλαστοκυττάρων (π.χ. CD117, CD45): είτε μη συζευγμένα είτε συζευγμένα με χημειοθεραπευτικά (Czechowicz, Kraft et al. 2007, Czechowicz, Palchaudhuri et al. 2019, Kwon, Logan et al. 2019). Η αποτελεσματική προετοιμασία χωρίς χημειοθεραπεία, ενδέχεται να βελτιώσει σημαντικά το προφίλ ασφάλειας αυτών των αυτόλογων μοσχευμάτων.

Υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στα επίπεδα μεταμόσχευσης γονιδιακά τροποποιημένων κυττάρων μεταξύ των μελών σε διαφορετικές κοόρτες πληθυσμού μελέτης σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας που έχουν αναφερθεί (Aiuti, Biasco et al. 2013, Gentner, Tucci et al. 2021, Kanter, Walters et al. 2022, Magnani, Semeraro et al. 2022). Σε μια δοκιμή ADA, το επίπεδο μεταμόσχευσης γονιδιακά τροποποιημένων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων (με βάση τον αριθμό αντιγράφων φορέα σε κοκκιοκύτταρα) ήταν συνάρτηση της δόσης των κυττάρων CD34<sup>+</sup>, του ποσοστού των κυττάρων CD34<sup>+</sup> που μετατράπηκαν, για την έκθεση στη



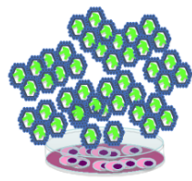
βουσουλφάνη (Reinhardt, Habib et al. 2021). Επομένως, είναι σημαντικό να βελτιστοποιηθεί κάθε στάδιο της διαδικασίας γονιδιακής θεραπείας για βέλτιστα αποτελέσματα.

Η γονιδιακή θεραπεία χορηγείται στο πλαίσιο αυτόλογης μεταμόσχευσης HSC και το κλινικό κόστος είναι σχετικά τυπικό, συμπεριλαμβανομένου του προσυμπτωματικού ελέγχου, των κλινικών εργαστηρίων, της τοποθέτησης κεντρικής φλεβικής γραμμής, της χορήγησης χημειοθεραπείας προετοιμασίας, της κλινικής φροντίδας μετά τη μεταμόσχευση, των δαπανών για παραμονή ασθενούς σε μονάδες μεταμόσχευσης συν το κόστος για αντιβιοτικά, διατροφή εάν χρειάζεται, εργαστηριακός έλεγχος και μολυσματικές ασθένειες, ακτινολογικές μελέτες και λοιπό κόστος (υλικά για επιλογή CD34, κυτταροκαλλιέργεια, δοκιμές, εγκαταστάσεις GMP, ρυθμιστική επίβλεψη). Στο ακαδημαϊκό περιβάλλον, πολλά από αυτά τα κόστη είναι πολύ χαμηλότερα από ό,τι στο εμπορικό περιβάλλον όπου οι προσδοκίες για τον έλεγχο ποιότητας, το κόστος κατασκευής εγκαταστάσεων, τη συντήρηση, την επίβλεψη και ένα υψηλότερο επίπεδο προσωπικού, αυξάνουν το κόστος. Ως εκ τούτου σημαντικές προκλήσεις για την ανάπτυξη και χρήση αυτών των γονιδιακών θεραπειών δεν είναι μόνο τεχνικές αλλά και οικονομικές.

Το κόστος είναι υψηλό για αντιδραστήρια (όπως λεντικοί φορείς κλινικής ποιότητας, γονιδιακής επεξεργασίας) και για υλικά επεξεργασίας κυττάρων, για τις εγκαταστάσεις και την πρόσληψη προσωπικού, επιπλέον του κόστους έρευνας και ανάπτυξης φαρμάκων. Αναμένεται ότι το κόστος ανά δόση, για κάθε ασθενή, μπορεί να μειωθεί καθώς βελτιώνονται οι μέθοδοι παραγωγής φορέα και επεξεργασίας κυττάρων. Η μεγαλύτερη ασφάλεια, η μείωση του κλινικού κόστους όπως και τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα από τη χρήση αυτόλογων διαγονιδιακών HSC, φαίνεται να υπερβαίνουν εκείνα από τη διαθέσιμη επιλογή για μεταμόσχευση ετερόλογων HSC. Η αποφυγή χρήσης ισχυρών ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων πριν και μετά τη μεταμόσχευση και η απουσία κινδύνων για την παθολογική δράση/ανοσία του μοσχεύματος έναντι του ξενιστή μπορεί να προσφέρει αυτό το ανταγωνιστικό πλεονέκτημα στις γονιδιακές θεραπείες, ωστόσο αυτό πρέπει να επιβεβαιωθεί περαιτέρω, κλινικά (Kohn, Chen et al. 2023).

Οι σημαντικές προκλήσεις που παρουσιάζει η εφαρμογή *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας με λεντιούς (κόστος και επιβάρυνση ασθενούς), καθώς και οι εν δυνάμει μελλοντικές λύσεις, συνοψίζονται στην **Εικόνα 9**.

**A**



#### Ιική μόλυνση

- απαιτείται υψηλή ποσότητα ιού
- Μικρή αποδοτικότητα μόλυνσης σε HSC



Εν δυνάμει λύσεις:

- Αντιδραστήρια/επταυξηντές μόλυνσης
- Κυτταρικές σειρές υψηλής παραγωγής ιοσωματίων
- Τροποποίηση φορέων
- Χρήση μεθόδων που δεν απαιτούν λεντιούς (π.χ. CRISPR/Cas9)

**B**



#### Μυελοεκκαθαριστική θεραπεία

- Λοιμώξεις
- Μακρά παραμονή σε νοσοκομεία
- Απαιτείται στείρο περιβάλλον
- Μετάγγιση



Εν δυνάμει λύσεις:

- Μείωση δόσης/χρόνου θεραπείας
- Μη τοξικές/στοχευμένες θεραπείες (π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα)
- *In vivo* θεραπεία

*Εικόνα 9. Παράγοντες που οδηγούν σε υψηλό κόστος χρήσης λεντιών (A) και σε παρενέργειες της μυελοεκκαθαριστικής θεραπείας (B). Προτείνονται εν δυνάμει λύσεις για κάθε κατηγορία προβλημάτων.*

Στον τομέα που αφορά τα ρυθμιστικά πλαίσια και τις κατευθυντήριες γραμμές, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) διαδραματίζουν κρίσιμους ρόλους. Οι οργανισμοί αυτοί αξιολογούν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των γονιδιακών θεραπειών προτού εγκριθούν για κλινική χρήση. Οι ρυθμιστικοί φορείς έχουν θεσπίσει αυστηρές οδηγίες για τη διεξαγωγή κλινικών δοκιμών γονιδιακής θεραπείας, συμπεριλαμβανομένης της τεκμηρίωσης των μέτρων ασφαλείας, της παρακολούθησης ασθενών και της αναφοράς ανεπιθύμητων ενεργειών.

Ως μέρος των ρυθμιστικών πλαισίων της γονιδιακής θεραπείας, η ενημερωμένη συγκατάθεση των ασθενών αποκτά εξαιρετική σημασία. Οι ασθενείς και οι οικογένειές τους πρέπει να λαμβάνουν σαφείς, κατανοητές πληροφορίες σχετικά με τα πιθανά οφέλη και τους κινδύνους της γονιδιακής θεραπείας. Αυτό τους δίνει τη δυνατότητα να λαμβάνουν τεκμηριωμένες αποφάσεις σχετικά με τη θεραπεία τους. Η προστασία των δικαιωμάτων των ασθενών είναι κεντρικής σημασίας για την ηθική εφαρμογή αυτών των καινοτόμων θεραπειών. Η αντίληψη του κοινού για τη γονιδιακή θεραπεία είναι ένα πολύπλευρο ζήτημα. Η διασφάλιση της διαφάνειας στην επικοινωνία, η αντιμετώπιση ανησυχιών και η παροχή πληροφοριών στο κοινό που είναι ακριβείς είναι απαραίτητη. Η κατανόηση και η αποδοχή του κοινού διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην υπεύθυνη ανάπτυξη και υιοθέτηση γονιδιακών θεραπειών. Ενώ το θεραπευτικό δυναμικό είναι σημαντικό, η αντιμετώπιση των κινδύνων, των ηθικών διλημάτων, των κανονιστικών πλαισίων, της ενημερωμένης συναίνεσης και της αντίληψης του κοινού είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση της υπεύθυνης εφαρμογής της γονιδιακής θεραπείας στην κλινική πράξη.

Εδώ και περισσότερα από 100 χρόνια, η θαλασσαιμία, μια από τις πρώτες ομάδες γενετικών ασθενειών που έχουν εντοπιστεί, προσελκύει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας στους τομείς της βιοχημείας, της γενετικής, της μοριακής βιολογίας, της παθολογίας και της αιματολογίας. Η μοριακή βάση και η παθοφυσιολογία της θαλασσαιμίας έχουν μελετηθεί και κατανοηθεί σε βάθος. Οι ανακαλύψεις που επιτεύχθηκαν στον τομέα αποκάλυψαν (και εξακολουθούν να αποκαλύπτουν) νέους μηχανισμούς, σχετικούς με μια σειρά από υποκλάδους των βιοϊατρικών επιστημών. Οι θαλασσαιμίες έχουν επίσης προσφέρει έναν σημαντικό

τομέα για τη διερεύνηση νέων προσεγγίσεων για τη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία κληρονομικών ασθενειών. Το προσδόκιμο ζωής και η ποιότητα ζωής των ασθενών με θαλασσαιμία συνεχίζουν να βελτιώνονται στον βιομηχανοποιημένο κόσμο. Ωστόσο, οι τακτικές θεραπείες μετάγγισης και χηλίωσης σιδήρου εξακολουθούν να είναι οι ακρογωνιαίοι λίθοι της θεραπείας της θαλασσαιμίας.

HSC από φυσιολογικούς δότες, γονιδιακή θεραπεία ή γονιδιακή επεξεργασία με αυτόλογα HSCs ασθενών μπορεί να παρέχει οριστική λύση στο πρόβλημα της ελαττωματικής ερυθροποίησης. Ωστόσο, η ετερόλογη μεταμόσχευση ενέχει υψηλό κίνδυνο απόρριψης μοσχεύματος και θνησιμότητας που σχετίζεται με τη μεταμόσχευση, ενώ οι δοκιμές γονιδιακής θεραπείας και γονιδιακής επεξεργασίας εξακολουθούν να απαιτούν σημαντική βελτιστοποίηση και περαιτέρω αξιολογήσεις ασφάλειας. Επιπλέον, οι δυσμενείς τοξικές επιδράσεις που προκαλούνται από τις θεραπείες, την ανοσοκαταστολή και άλλες παρενέργειες που επηρεάζουν την ποιότητα ζωής των ασθενών, δεν μπορούν να παραβλεφθούν.

Με δεδομένο ότι η θεραπεία περιλαμβάνει την τροποποίηση των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων του ασθενούς στο εργαστήριο για τη διόρθωση της γενετικής μετάλλαξης που ευθύνεται για τη θαλασσαιμία και στη συνέχεια την επανέγχυση αυτών των τροποποιημένων κυττάρων πίσω στον ασθενή, οι εξαιρετικά προηγμένες τεχνικές και οι κλινικές εγκαταστάσεις που απαιτούνται για τη γονιδιακή θεραπεία εξακολουθούν να αποτελούν ισχυρό εμπόδιο για να θεωρηθεί αυτή η προσέγγιση προσβάσιμη για ολόκληρη την παγκόσμια κοινότητα ασθενών με θαλασσαιμία στο άμεσο μέλλον. Επιπρόσθετα, το κόστος της *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας για τη β θαλασσαιμία είναι ένα σημαντικό ζήτημα. Η θεραπεία περιλαμβάνει προηγμένη τεχνολογία, εξειδικευμένες εγκαταστάσεις για γενετική τροποποίηση και αυστηρές κλινικές δοκιμές για τη διασφάλιση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας, τα οποία συμβάλλουν στο υψηλό κόστος της.

Παρά την αρχική οικονομική επένδυση, η ανάγκη για τέτοια κέντρα υγείας που να ειδικεύονται στη γονιδιακή θεραπεία είναι κρίσιμη. Αυτά τα κέντρα όχι μόνο παρέχουν πρόσβαση σε αυτή τη θεραπεία αιχμής, αλλά διαδραματίζουν επίσης βασικό ρόλο στην έρευνα και την ανάπτυξη, οδηγώντας ενδεχομένως σε μειώσεις κόστους με την πάροδο του χρόνου μέσω βελτιώσεων στην τεχνολογία και τα πρωτόκολλα θεραπείας. Επιπλέον, η ίδρυση κέντρων στην *in vitro* γονιδιακή θεραπεία για τη βήτα

θαλασσαιμία μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα ζωής των ασθενών, να μειώσει το μακροπρόθεσμο κόστος υγειονομικής περίθαλψης που σχετίζεται με τη διαχείριση της νόσου και να προσφέρει ελπίδα σε όσους πλήττονται από αυτήν την ασθένεια.

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ Η ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ  
ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΣΤΗ Β ΘΑΛΑΣΣΑΙΜΙΑ**

## Κεφάλαιο 7: Συμπεράσματα και η προοπτική της γονιδιακής θεραπείας στη β θαλασσαιμία

Η β θαλασσαιμία, μια κληρονομική διαταραχή του αίματος που χαρακτηρίζεται από μείωση ή απουσία σύνθεσης αλυσίδων β σφαιρίνης, θέτει σημαντικές προκλήσεις για την υγεία παγκοσμίως. Οι συμβατικές θεραπείες, κυρίως οι μεταγγίσεις αίματος και η χηλίωση σιδήρου, διαχειρίζονται τα συμπτώματα αλλά δεν αντιμετωπίζουν την υποκείμενη γενετική αιτία. Οι πρόσφατες εξελίξεις στη γονιδιακή θεραπεία έχουν ανοίξει νέους δρόμους για δυνητικά θεραπευτικές θεραπείες, προσφέροντας ελπίδα σε ασθενείς με β θαλασσαιμία.

Η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μια επαναστατική προσέγγιση που εισάγει ή μεταβάλλει το γενετικό υλικό στα κύτταρα ενός ασθενούς, έχει κερδίσει σημαντικό έδαφος στη θεραπεία γενετικών διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της β θαλασσαιμίας. Η κύρια στρατηγική που χρησιμοποιεί η γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει τη χρήση φορέων, συχνά ιών, για την παράδοση λειτουργικών γονιδίων για την αντιστάθμιση της έλλειψης έκφρασης των ελαττωματικών αλληλομόρφων. Πρόσφατες κλινικές δοκιμές έδειξαν πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, με ορισμένους ασθενείς να επιτυγχάνουν ανεξαρτησία από τη μετάγγιση, ένα σημαντικό ορόσημο στη θεραπεία της β θαλασσαιμίας. Αυτές οι επιτυχίες υπογραμμίζουν τη δυνατότητα της γονιδιακής θεραπείας να αλλάξει ριζικά την πορεία της νόσου. Η αυτόλογη μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, όπου τα κύτταρα ενός ασθενούς τροποποιούνται και εγχέονται εκ νέου, είναι μια βασική τεχνική, που μειώνει τους κινδύνους που σχετίζονται με τη μεταμόσχευση κυττάρων δότη, όπως η νόσος μοσχεύματος έναντι ξενιστή. Ασθενείς έχουν επιτύχει ανεξαρτησία μετάγγισης μετά από γονιδιακή θεραπεία, επιδεικνύοντας τη δυνατότητα ευρύτερης εφαρμογής αυτών των θεραπειών. Ενώ πολλοί ασθενείς επωφελούνται από τη γονιδιακή θεραπεία, οι ερευνητές παρακολουθούν συνεχώς για ανεπιθύμητες ενέργειες, διασφαλίζοντας τη μακροπρόθεσμη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα αυτών των θεραπειών.

Παρά την υπόσχεσή της, η γονιδιακή θεραπεία για τη β θαλασσαιμία αντιμετωπίζει πολλές προκλήσεις. Ο σχεδιασμός του φορέα, η αποτελεσματική μεταφορά γονιδίων, η επίτευξη συνεπούς θεραπευτικής έκφρασης και η

μακροπρόθεσμη ασφάλεια είναι τομείς που απαιτούν περαιτέρω έρευνα. Ο κίνδυνος εισαγωγικής μεταλλαξιγένεσης και ογκογένεσης, όπου η ενσωμάτωση του ιικού φορέα διαταράσσει τη φυσιολογική λειτουργία των γονιδίων, οδηγώντας δυνητικά σε καρκίνο, παραμένει μια σημαντική ανησυχία. Επιπλέον, το υψηλό κόστος και η πολυπλοκότητα της γονιδιακής θεραπείας περιορίζουν την προσβασιμότητά της, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα χαμηλών πόρων όπου η βήτα θαλασσαιμία είναι πιο διαδεδομένη.

Η γονιδιακή θεραπεία εγείρει επίσης περίπλοκα ηθικά και κανονιστικά ζητήματα. Οι ηθικές ανησυχίες περιλαμβάνουν τις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις της γενετικής τροποποίησης, τη δυνατότητα μετάδοσης της βλαστικής γραμμής και τη δίκαιη πρόσβαση σε θεραπείες. Τα ρυθμιστικά πλαίσια εξελίσσονται για την αντιμετώπιση αυτών των προκλήσεων, εστιάζοντας στην ασφάλεια των ασθενών, στη συναίνεση κατόπιν ενημέρωσης και στην παρακολούθηση των μακροπρόθεσμων αποτελεσμάτων.

Το μέλλον της γονιδιακής θεραπείας στη β θαλασσαιμία είναι πολλά υποσχόμενο, αλλά εξαρτάται από τη συνεχιζόμενη έρευνα και ανάπτυξη. Η έρευνα συνεχίζει να βελτιώνει τις τεχνολογίες επεξεργασίας γονιδίων, καθιστώντας τις πιο ακριβείς και αποτελεσματικές, μειώνοντας έτσι τους κινδύνους που συνδέονται με αυτές τις παρεμβάσεις. Η πρόοδος στην τεχνολογία φορέων, οι ασφαλέστερες και αποτελεσματικότερες τεχνικές επεξεργασίας γονιδίων όπως το CRISPR/Cas9 και η βελτιωμένη κατανόηση της βιολογίας των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων θα μπορούσαν να ενισχύσουν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια. Οι εξατομικευμένες προσεγγίσεις, η προσαρμογή της θεραπείας σε μεμονωμένα γενετικά προφίλ, μπορεί να βελτιστοποιήσουν τα αποτελέσματα της. Η παγκόσμια συνεργασία είναι απαραίτητη για την επιτάχυνση της έρευνας, τη μείωση του κόστους και τη βελτίωση της πρόσβασης, ιδιαίτερα σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό β θαλασσαιμίας, όπως η Ελλάδα.

Η γονιδιακή θεραπεία αντιπροσωπεύει μία καινοτομία στην αντιμετώπιση της β θαλασσαιμίας, προσφέροντας μια πιθανή θεραπεία για μια ασθένεια που επί του παρόντος βασίζεται στη δια βίου διαχείριση. Αν και υπάρχουν σημαντικές προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν, η πρόοδος που έχει σημειωθεί μέχρι στιγμής είναι ενθαρρυντική. Η συνεχής έρευνα, οι ηθικοί προβληματισμοί και οι συλλογικές



προσπάθειες είναι ζωτικής σημασίας για την αξιοποίηση του πλήρους δυναμικού της γονιδιακής θεραπείας για τον μετασχηματισμό της ζωής των ασθενών με β θαλασσαιμία. Η διασφάλιση της ισότιμης πρόσβασης στη γονιδιακή θεραπεία αποτελεί παγκόσμια προτεραιότητα. Εμφανίζονται πρωτοβουλίες για την επέκταση της πρόσβασης σε αυτή τη θεραπεία αιχμής, ιδιαίτερα σε περιοχές με υψηλό επιπολασμό της β θαλασσαιμίας. Ο απώτερος στόχος της γονιδιακής θεραπείας για τη β θαλασσαιμία είναι να παράσχει θεραπεία, επιτρέποντας στα άτομα να ζήσουν υγιή, ανεξάρτητη από τη μετάγγιση ζωή. Αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος, είναι σημαντικό να αναγνωριστεί ότι η συνεχής έρευνα, οι κλινικές δοκιμές και οι καινοτόμες προσεγγίσεις είναι απαραίτητες για την επίτευξη αυτού του στόχου.

Το κόστος της γονιδιακής θεραπείας για τη β θαλασσαιμία μπορεί να ποικίλλει ευρέως με βάση διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της χώρας στην οποία χορηγείται η θεραπεία, της μονάδας υγειονομικής περίθαλψης και των λεπτομερειών του πρωτοκόλλου θεραπείας. Για παράδειγμα, οι γονιδιακές θεραπείες για παρόμοιες καταστάσεις έχουν κοστολογηθεί σε περίπου 1,5-2 εκατομμύρια δολάρια ή περισσότερο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Το κόστος αυτό περιλαμβάνει ολόκληρη τη διαδικασία της γονιδιακής θεραπείας, συμπεριλαμβανομένης της συλλογής και γενετικής τροποποίησης αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, της διαδικασίας θεραπείας και της φροντίδας και παρακολούθησης μετά τη θεραπεία. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι τιμές μπορούν επίσης να επηρεαστούν από τις πολιτικές υγειονομικής περίθαλψης και την ασφαλιστική κάλυψη που ενδέχεται να μειώσουν την οικονομική επιβάρυνση για τους ασθενείς και τις οικογένειές τους.

Μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να ληφθεί επίσης υπόψιν είναι το γεγονός ότι, πέραν από την ανάγκη συνεχούς αντιμετώπισης των συμπτωμάτων της ασθένειας και των παρενεργειών από τις συμβατικές θεραπείες, το συνολικό κόστος για το σύστημα υγείας θεωρείται μεγαλύτερο από αυτό της γονιδιακής θεραπείας (Basu, Winn et al. 2024). Δεδομένης της ταχέως εξελισσόμενης φύσης της τεχνολογίας γονιδιακής θεραπείας και της οικονομίας της υγειονομικής περίθαλψης, το κόστος που σχετίζεται με αυτές τις θεραπείες θα μπορούσε να μειωθεί σταδιακά, ώστε τελικά να αποτελεί μία βιώσιμη λύση τόσο από υγειονομικής όσο και οικονομικής άποψης.

## Περίληψη

Η β θαλασσαιμία, μια σοβαρή κληρονομική διαταραχή, που προκαλείται από πληθώρα μεταλλάξεων στο γονίδιο της β-σφαιρίνης και οδηγεί σε αναιμία, αποτελεί σημαντική πρόκληση για τη δημόσια υγεία - ιδιαίτερα σε περιοχές με υψηλές συχνότητες φορέων, όπως η Ελλάδα. Είναι αποδεκτό ότι οι παραδοσιακές θεραπείες, ενώ διαχειρίζονται τα συμπτώματα, δεν αντιμετωπίζουν τη γενετική βάση της νόσου. Το συγκεκριμένο δοκίμιο διερευνά τις δυνατότητες της γονιδιακής θεραπείας ως στρατηγική αντιμετώπισης της β θαλασσαιμίας, ενώ προσεγγίζει τη μοριακή βάση της νόσου και τις τεχνικές στόχευσης του γονιδίου β-σφαιρίνης για θεραπευτική παρέμβαση. Εξετάζονται, επίσης, οι εξελίξεις στις τεχνικές γονιδιακής θεραπείας - συμπεριλαμβανομένων στρατηγικών *in vivo* και *ex vivo* - όπως και ο ρόλος των διαφορετικών συστημάτων φορέων - με έμφαση σε εγκεκριμένες θεραπείες. Η κριτική αξιολόγηση των κλινικών δοκιμών και μελετών αναδεικνύει τις προκλήσεις που προκύπτουν κατά τη μεταφορά της γονιδιακής θεραπείας από το εργαστήριο στην κλινική. Επιπλέον, εγείρονται ζητήματα που αφορούν σε ηθικές προεκτάσεις αλλά και στην προσβασιμότητα των ασθενών στη γονιδιακή θεραπεία, προτείνοντας μια, εν δυνάμει, μελλοντική προοπτική για την ενσωμάτωσή της στην καθημερινή κλινική πρακτική αντιμετώπισης της β θαλασσαιμίας. Καταληκτικά, η ολοκληρωμένη επισκόπηση της τρέχουσας κατάστασης της γονιδιακής θεραπείας για τη β θαλασσαιμία, υπογραμμίζει τις δυνατότητές της και επισημαίνει τα πλεονεκτήματά της ως μια βιώσιμη και αποτελεσματική θεραπευτική προσέγγιση.

## **Abstract**

$\beta$  thalassemia, a hereditary blood disorder caused by mutations in the  $\beta$ -globin gene, presents a significant public health challenge, particularly in regions with high carrier frequencies. Traditional treatments, while managing symptoms, do not address the genetic root of the disease. This essay explores the potential of gene therapy as a transformative approach for treating beta thalassemia. It delves into the molecular basis of the disease and the rationale behind targeting the  $\beta$ -globin gene for therapeutic intervention. The essay examines the advancements in gene therapy techniques, including both *in vivo* and *ex vivo* strategies, and the role of different vector systems, particularly focusing on approved therapies. The critical evaluation of clinical trials and case studies highlights the successes and challenges faced in translating gene therapy from bench to bedside. Additionally, the essay discusses the ethical, regulatory, and accessibility issues surrounding gene therapy, proposing a future perspective for its integration into standard care for  $\beta$  thalassemia. By providing a comprehensive overview of the current state of gene therapy for beta thalassemia, the essay underscores its potential as a curative treatment, paving the way for a new era in the management of genetic disorders.

## Βιβλιογραφία

- Aiuti, A., L. Biasco, S. Scaramuzza, F. Ferrua, M. P. Cicalese, C. Baricordi, F. Dionisio, A. Calabria, S. Giannelli and M. C. Castiello (2013). "Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome." Science **341**(6148): 1233151.
- Aiuti, A., F. Cattaneo, S. Galimberti, U. Benninghoff, B. Cassani, L. Callegaro, S. Scaramuzza, G. Andolfi, M. Mirolo and I. Brigida (2009). "Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency." New England Journal of Medicine **360**(5): 447-458.
- Amberger, J. S., C. A. Bocchini, A. F. Scott and A. Hamosh (2019). "OMIM. org: leveraging knowledge across phenotype–gene relationships." Nucleic acids research **47**(D1): D1038-D1043.
- Angastiniotis, M., M. Petrou, D. Loukopoulos, B. Modell, D. Farmakis, P. Englezos and A. Eleftheriou (2021). "The prevention of thalassemia revisited: a historical and ethical perspective by the thalassemia international federation." Hemoglobin **45**(1): 5-12.
- Arabi, F., V. Mansouri and N. Ahmadbeigi (2022). "Gene therapy clinical trials, where do we go? An overview." Biomedicine & Pharmacotherapy **153**: 113324.
- Arlet, J.-B., M. Dussiot, I. C. Moura, O. Hermine and G. Courtois (2016). "Novel players in  $\beta$ -thalassemia dyserythropoiesis and new therapeutic strategies." Current opinion in hematology **23**(3): 181-188.
- Asghar, A. A., Y. Khabir and M. R. Hashmi (2022). "Zynteglo: Betibeglogene autotemcel–An innovative therapy for  $\beta$ -thalassemia patients." Annals of Medicine and Surgery **82**.
- Atweh, G. F., J. DeSimone, Y. Sauntharajah, H. Fathallah, R. S. Weinberg, R. L. Nagel, M. E. Fabry and R. J. Adams (2003). "Hemoglobinopathies." ASH Education Program Book **2003**(1): 14-39.
- Badawy, S. M., U. Beg, R. I. Liem, S. Chaudhury and A. A. Thompson (2021). "A systematic review of quality of life in sickle cell disease and thalassemia after stem cell transplant or gene therapy." Blood advances **5**(2): 570-583.
- Barrangou, R. and J. A. Doudna (2016). "Applications of CRISPR technologies in research and beyond." Nature biotechnology **34**(9): 933-941.

Basu, A., A. N. Winn, K. M. Johnson, B. Jiao, B. Devine, J. S. Hankins, S. D. Arnold, M. Bender and S. D. Ramsey (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.

Bauer, D. E., S. C. Kamran, S. Lessard, J. Xu, Y. Fujiwara, C. Lin, Z. Shao, M. C. Canver, E. C. Smith and L. Pinello (2013). "An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level." Science **342**(6155): 253-257.

Berg, J. M. and J. L. Tymoczko (2018). Stryer biochemie, Springer.

Beutler, E. (2001). "The cline affair." Molecular Therapy **4**(5): 396-397.

Blaese, R. M., K. W. Culver, A. D. Miller, C. S. Carter, T. Fleisher, M. Clerici, G. Shearer, L. Chang, Y. Chiang and P. Tolstoshev (1995). "T lymphocyte-directed gene therapy for ADA– SCID: initial trial results after 4 years." Science **270**(5235): 475-480.

Bordignon, C., L. D. Notarangelo, N. Nobili, G. Ferrari, G. Casorati, P. Panina, E. Mazzolari, D. Maggioni, C. Rossi and P. Servida (1995). "Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA– immunodeficient patients." Science **270**(5235): 470-475.

Borgna-Pignatti, C., S. Rugolotto, P. De Stefano, H. Zhao, M. D. Cappellini, G. C. Del Vecchio, M. A. Romeo, G. L. Forni, M. R. Gamberini and R. Ghilardi (2004). "Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine." haematologica **89**(10): 1187-1193.

Boztug, K., M. Schmidt, A. Schwarzer, P. P. Banerjee, I. A. Díez, R. A. Dewey, M. Böhm, A. Nowrouzi, C. R. Ball and H. Glimm (2010). "Stem-cell gene therapy for the Wiskott–Aldrich syndrome." New England Journal of Medicine **363**(20): 1918-1927.

Breda, L., C. Casu, S. Gardenghi, N. Bianchi, L. Cartegni, M. Narla, K. Yazdanbakhsh, M. Musso, D. Manwani and J. Little (2012). "Therapeutic hemoglobin levels after gene transfer in  $\beta$ -thalassemia mice and in hematopoietic cells of  $\beta$ -thalassemia and sickle cells disease patients." PloS one **7**(3): e32345.

Bunn, H. F. (1997). "Pathogenesis and treatment of sickle cell disease." New England Journal of Medicine **337**(11): 762-769.

Camaschella, C., M. T. Bertero, A. Serra, M. Dall'Acqua, P. Gasparini, M. Trento, L. Vettore, G. Perona, G. Saglio and U. Mazza (1987). "A benign form of thalassaemia intermedia may be determined by the interaction of triplicated alpha locus and heterozygous beta-thalassaemia." Br J Haematol **66**(1): 103-107.

Canver, M. C., E. C. Smith, F. Sher, L. Pinello, N. E. Sanjana, O. Shalem, D. D. Chen, P. G. Schupp, D. S. Vinjamur and S. P. Garcia (2015). "BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis." Nature **527**(7577): 192-197.

Cao, A. and R. Galanello (2010). "Beta-thalassemia." Genetics in medicine **12**(2): 61-76.

Cao, A. and R. Galanello (2010). "Beta-thalassemia." Genet Med **12**(2): 61-76.

Cao, A. and P. Moi (2000). "Genetic modifying factors in beta-thalassemia." Clin Chem Lab Med **38**(2): 123-132.

Caocci, G., A. Vacca, E. Piras, V. Serreli, C. Dessi, M. Marcias, P. Risso and G. La Nasa (2016). "Return to normal life after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia: a study of patients transplanted from matched sibling donors." Bone Marrow Transplantation **51**(12): 1640-1641.

Catapano, R., R. Sessa, S. Trombetti, E. Cesaro, F. Russo, P. Izzo, A. Makis and M. Grosso (2023). "Identification and Functional Analysis of Known and New Mutations in the Transcription Factor KLF1 Linked with  $\beta$ -Thalassemia-like Phenotypes." Biology **12**(4): 510.

Cattoglio, C., G. Facchini, D. Sartori, A. Antonelli, A. Miccio, B. Cassani, M. Schmidt, C. Von Kalle, S. Howe and A. J. Thrasher (2007). "Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **110**(6): 1770-1778.

Cavazzana-Calvo, M., E. Payen, O. Negre, G. Wang, K. Hehir, F. Fusil, J. Down, M. Denaro, T. Brady and K. Westerman (2010). "Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human  $\beta$ -thalassaemia." Nature **467**(7313): 318-322.

Cavazzana, M., F. D. Bushman, A. Miccio, I. André-Schmutz and E. Six (2019). "Gene therapy targeting haematopoietic stem cells for inherited diseases: progress and challenges." Nature reviews Drug discovery **18**(6): 447-462.

Cazzola, M., P. D. Stefano, L. Ponchio, F. Locatelli, Y. Beguin, C. Dessi, S. Barella, A. Cao and R. Galanello (1995). "Relationship between transfusion regimen and suppression of erythropoiesis in  $\beta$ -thalassaemia major." British journal of haematology **89**(3): 473-478.

Chaidos, A., A. Makis, E. Hatzimichael, S. Tsiara, M. Gouva, E. Tzouvara and K. L. Bourantas (2004). "Treatment of  $\beta$ -thalassemia patients with recombinant human erythropoietin: effect on transfusion requirements and soluble adhesion molecules." Acta Haematologica **111**(4): 189-195.

Chang, K.-H., S. E. Smith, T. Sullivan, K. Chen, Q. Zhou, J. A. West, M. Liu, Y. Liu, B. F. Vieira and C. Sun (2017). "Long-term engraftment and fetal globin induction upon BCL11A gene editing in bone-marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells." Molecular Therapy-Methods & Clinical Development **4**: 137-148.

Charache, S., M. L. Terrin, R. D. Moore, G. J. Dover, F. B. Barton, S. V. Eckert, R. P. McMahon, D. R. Bonds and I. o. t. M. S. o. H. i. S. C. Anemia (1995). "Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia." New England Journal of Medicine **332**(20): 1317-1322.

Clarke, G. M. and T. N. Higgins (2000). "Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update." Clinical chemistry **46**(8): 1284-1290.

Clegg, J. B. and D. J. Weatherall (1999). "Thalassemia and malaria: new insights into an old problem." Proceedings of the Association of American Physicians **111**(4): 278-282.

Colah, R., A. Gorakshakar and A. Nadkarni (2010). "Global burden, distribution and prevention of  $\beta$ -thalassemias and hemoglobin E disorders." Expert Rev Hematol **3**(1): 103-117.

Cornetta, K., S. Koop, E. Nance, K. House and L. Duffy (2020). "Replication-Competent Lentivirus Analysis of Vector-Transduced T Cell Products Used in Cancer Immunotherapy Clinical Trials." Chimeric Antigen Receptor T Cells: Development and Production: 181-194.

Crick, F. (1970). "Central dogma of molecular biology." Nature **227**(5258): 561-563.

Crystal, R. G. (1995). "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success." Science **270**(5235): 404-410.

Czechowicz, A., D. Kraft, I. L. Weissman and D. Bhattacharya (2007). "Efficient transplantation via antibody-based clearance of hematopoietic stem cell niches." Science **318**(5854): 1296-1299.

Czechowicz, A., R. Palchaudhuri, A. Scheck, Y. Hu, J. Hoggatt, B. Saez, W. W. Pang, M. K. Mansour, T. A. Tate and Y. Y. Chan (2019). "Selective hematopoietic stem cell ablation using CD117-antibody-drug-conjugates enables safe and effective transplantation with immunity preservation." Nature communications **10**(1): 617.

De Ravin, S. S., S. Liu, C. L. Sweeney, J. Brault, N. Whiting-Theobald, M. Ma, T. Liu, U. Choi, J. Lee and S. A. O'Brien (2022). "Lentivector cryptic splicing mediates

increase in CD34+ clones expressing truncated HMGA2 in human X-linked severe combined immunodeficiency." Nature Communications **13**(1): 3710.

De Sanctis, V., C. Kattamis, D. Canatan, A. T. Soliman, H. Elsedfy, M. Karimi, S. Daar, Y. Wali, M. Yassin, N. Soliman, P. Sobti, S. Al Jaouni, M. El Kholly, B. Fiscina and M. Angastiniotis (2017). "β-Thalassemia Distribution in the Old World: an Ancient Disease Seen from a Historical Standpoint." Mediterr J Hematol Infect Dis **9**(1): e2017018.

Dever, D. P., R. O. Bak, A. Reinisch, J. Camarena, G. Washington, C. E. Nicolas, M. Pavel-Dinu, N. Saxena, A. B. Wilkens and S. Mantri (2016). "CRISPR/Cas9 β-globin gene targeting in human haematopoietic stem cells." Nature **539**(7629): 384-389.

Dunbar, C. E., K. A. High, J. K. Joung, D. B. Kohn, K. Ozawa and M. Sadelain (2018). "Gene therapy comes of age." Science **359**(6372): eaa4672.

Epstein, A. L., P. Marconi, R. Argnani and R. Manservigi (2005). "HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy." Current gene therapy **5**(5): 445-457.

Ferrari, G., A. J. Thrasher and A. Aiuti (2021). "Gene therapy using haematopoietic stem and progenitor cells." Nature Reviews Genetics **22**(4): 216-234.

Fibach, E. and E. A. Rachmilewitz (2017). "Pathophysiology and treatment of patients with beta-thalassemia - an update." F1000Res **6**: 2156.

Franchini, M., G. L. Forni and G. M. Liumbruno (2017). "Is there a standard-of-care for transfusion therapy in thalassemia?" Current Opinion in Hematology **24**(6): 558-564.

Frangoul, H., D. Altshuler, M. D. Cappellini, Y.-S. Chen, J. Domm, B. K. Eustace, J. Foell, J. de la Fuente, S. Grupp and R. Handgretinger (2021). "CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β-thalassemia." New England Journal of Medicine **384**(3): 252-260.

Frangoul, H., F. Locatelli, A. Sharma, M. Bhatia, M. Mapara, L. Molinari, D. Wall, R. I. Liem, P. Telfer and A. J. Shah (2023). "Exagamglogene Autotemcel for Severe Sickle Cell Disease." Blood **142**: 1052.

Fucharoen, S. and D. J. Weatherall (2012). "The hemoglobin E thalassemias." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **2**(8): a011734.

Funnell, A. P., P. Prontera, V. Ottaviani, M. Piccione, A. Giambona, A. Maggio, F. Ciaffoni, S. Stehling-Sun, M. Marra and F. Masiello (2015). "2p15-p16. 1 microdeletions encompassing and proximal to BCL11A are associated with elevated



HbF in addition to neurologic impairment." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **126**(1): 89-93.

Galanello, R. and R. Origa (2010). "Beta-thalassemia." Orphanet journal of rare diseases **5**: 1-15.

Gentner, B., F. Tucci, S. Galimberti, F. Fumagalli, M. De Pellegrin, P. Silvani, C. Camesasca, S. Pontesilli, S. Darin and F. Ciotti (2021). "Hematopoietic stem-and progenitor-cell gene therapy for Hurler syndrome." New England Journal of Medicine **385**(21): 1929-1940.

Germino-Watnick, P., M. Hinds, A. Le, R. Chu, X. Liu and N. Uchida (2022). "Hematopoietic Stem Cell Gene-Addition/Editing Therapy in Sickle Cell Disease." Cells **11**(11): 1843.

Giardine, B. M., P. Joly, S. Pissard, H. Wajcman, D. H. K. Chui, R. C. Hardison and G. P. Patrinos (2021). "Clinically relevant updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations." Nucleic acids research **49**(D1): D1192-D1196.

Greaves, M. F., J. Brown, H. V. Molgaard, N. Spurr, D. Robertson, D. Delia and D. Sutherland (1992). "Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule." Leukemia **6**(Suppl 1): 31-36.

Guda, S., C. Brendel, R. Renella, P. Du, D. E. Bauer, M. C. Canver, J. K. Grenier, A. W. Grimson, S. C. Kamran and J. Thornton (2015). "miRNA-embedded shRNAs for lineage-specific BCL11A knockdown and hemoglobin F induction." Molecular Therapy **23**(9): 1465-1474.

Hacein-Bey-Abina, S., J. Hauer, A. Lim, C. Picard, G. P. Wang, C. C. Berry, C. Martinache, F. Rieux-Laucat, S. Latour and B. H. Belohradsky (2010). "Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." New England Journal of Medicine **363**(4): 355-364.

Hanawa, H., P. W. Hargrove, S. Kepes, D. K. Srivastava, A. W. Nienhuis and D. A. Persons (2004). "Extended  $\beta$ -globin locus control region elements promote consistent therapeutic expression of a  $\gamma$ -globin lentiviral vector in murine  $\beta$ -thalassemia." Blood **104**(8): 2281-2290.

Harteveld, C. L., A. Achour, S. J. Arkesteijn, J. Ter Huurne, M. Verschuren, S. Bhagwandien-Bisoen, R. Schaap, L. Vijfhuizen, H. El Idrissi and T. T. Koopmann (2022). "The hemoglobinopathies, molecular disease mechanisms and diagnostics." International Journal of Laboratory Hematology **44**: 28-36.

Hatzimichael, E., D. Timotheatou, E. Koumpis, L. Benetatos and A. Makis (2022). "Luspatercept: A New Tool for the Treatment of Anemia Related to  $\beta$ -Thalassemia, Myelodysplastic Syndromes and Primary Myelofibrosis." Diseases **10**(4): 85.

Hirakawa, Matthew P., R. Krishnakumar, Jerilyn A. Timlin, James P. Carney and Kimberly S. Butler (2020). "Gene editing and CRISPR in the clinic: current and future perspectives." Bioscience Reports **40**(4).

Howe, S. J., M. R. Mansour, K. Schwarzwaelder, C. Bartholomae, M. Hubank, H. Kempinski, M. H. Brugman, K. Pike-Overzet, S. J. Chatters and D. De Ridder (2008). "Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients." The Journal of clinical investigation **118**(9).

Hoy, S. M. (2024). "Exagamglogene Autotemcel: First Approval." Molecular Diagnosis & Therapy: 1-7.

Hsieh, M. M., M. Bonner, F. J. Pierciey Jr, N. Uchida, J. Rottman, L. Demopoulos, M. Schmidt, J. Kanter, M. C. Walters and A. A. Thompson (2020). "Myelodysplastic syndrome unrelated to lentiviral vector in a patient treated with gene therapy for sickle cell disease." Blood advances **4**(9): 2058-2063.

Ikawa, Y., A. Miccio, E. Magrin, J. L. Kwiatkowski, S. Rivella and M. Cavazzana (2019). "Gene therapy of hemoglobinopathies: progress and future challenges." Human Molecular Genetics **28**(R1): R24-R30.

Ippolito, G. C., J. D. Dekker, Y.-H. Wang, B.-K. Lee, A. L. Shaffer III, J. Lin, J. K. Wall, B.-S. Lee, L. M. Staudt and Y.-J. Liu (2014). "Dendritic cell fate is determined by BCL11A." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(11): E998-E1006.

Jessup, M., B. Greenberg, D. Mancini, T. Cappola, D. F. Pauly, B. Jaski, A. Yaroshinsky, K. M. Zsebo, H. Dittrich and R. J. Hajjar (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.

Kanter, J., M. C. Walters, L. Krishnamurti, M. Y. Mapara, J. L. Kwiatkowski, S. Rifkin-Zenenberg, B. Aygun, K. A. Kasow, F. J. Pierciey Jr and M. Bonner (2022). "Biologic and clinical efficacy of LentiGlobin for sickle cell disease." New England Journal of Medicine **386**(7): 617-628.

- Kattamis, A., G. L. Forni, Y. Aydinok and V. Viprakasit (2020). "Changing patterns in the epidemiology of  $\beta$ -thalassemia." European Journal of Haematology **105**(6): 692-703.
- Kohn, D. B., Y. Y. Chen and M. J. Spencer (2023). "Successes and challenges in clinical gene therapy." Gene Therapy **30**(10): 738-746.
- Kulozik, A. E., S. L. Thein, J. S. Wainscoat, R. Gale, L. A. Kay, J. K. Wood, D. J. Weatherall and E. R. Huehns (1987). "Thalassaemia intermedia: interaction of the triple alpha-globin gene arrangement and heterozygous beta-thalassaemia." Br J Haematol **66**(1): 109-112.
- Kwon, H.-S., A. C. Logan, A. Chhabra, W. W. Pang, A. Czechowicz, K. Tate, A. Le, J. Poyser, R. Hollis and B. V. Kelly (2019). "Anti-human CD117 antibody-mediated bone marrow niche clearance in nonhuman primates and humanized NSG mice." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **133**(19): 2104-2108.
- Ladis, V., G. Chouliaras, V. Berdoukas, A. Chatziliami, C. Fragodimitri, F. Karabatsos, J. Youssef, A. Kattamis and M. Karagiorga-Lagana (2011). "Survival in a large cohort of Greek patients with transfusion-dependent beta thalassaemia and mortality ratios compared to the general population." European journal of haematology **86**(4): 332-338.
- Lessard, S., P. Rimmelé, H. Ling, K. Moran, B. Vieira, Y.-D. Lin, V. Hong, A. Reik, D. Dang, N. Uchida, J. F. Tisdale, P. Rendo, A. Daak and A. Hicks (2019). "Zinc Finger Nuclease-Mediated Disruption of the BCL11A Erythroid Enhancer Results in Enriched Biallelic Editing, Increased Fetal Hemoglobin, and Reduced Sickling in Erythroid Cells Derived from Sickle Cell Disease Patients." Blood **134**: 974.
- Li, S.-D. and L. Huang (2007). "Non-viral is superior to viral gene delivery." Journal of controlled release **123**(3): 181-183.
- Lindenau, J. D., S. C. Wagner, S. M. d. Castro and M. H. Hutz (2016). "The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB\* S globin gene haplotypes." Genetics and molecular biology **39**: 515-523.
- Liu, P., J. R. Keller, M. Ortiz, L. Tessarollo, R. A. Rachel, T. Nakamura, N. A. Jenkins and N. G. Copeland (2003). "Bcl11a is essential for normal lymphoid development." Nature immunology **4**(6): 525-532.
- Locatelli, F., P. Lang, S. Corbacioglu, D. Wall, R. Meisel, A. M. Li, J. de La Fuente, A. J. Shah, B. Carpenter and J. L. Kwiatkowski (2023). "Exagamglogene Autotemcel for Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia." Blood **142**: 1053.

Locatelli, F., P. Lang, A. Li, S. Corbacioglu, J. de la Fuente, D. A. Wall, R. Liem, R. Meisel, M. Y. Mapara and A. J. Shah (2022). "Efficacy and safety of a single dose of exagamglogene autotemcel for transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia." Blood **140**(Supplement 1): 4899-4901.

Lonergan, G. J., D. B. Cline and S. L. Abbondanzo (2001). "Sickle cell anemia." Radiographics **21**(4): 971-994.

Luc, S., J. Huang, J. L. McEldoon, E. Somuncular, D. Li, C. Rhodes, S. Mamoor, S. Hou, J. Xu and S. H. Orkin (2016). "Bcl11a deficiency leads to hematopoietic stem cell defects with an aging-like phenotype." Cell reports **16**(12): 3181-3194.

Magnani, A., M. Semeraro, F. Adam, C. Booth, L. Dupré, E. Morris, A. Gabrion, C. Roudaut, D. Borgel and A. Toubert (2022). "Long-term safety and efficacy of lentiviral hematopoietic stem/progenitor cell gene therapy for Wiskott–Aldrich syndrome." Nature Medicine **28**(1): 71-80.

Magrin, E., M. Semeraro, N. Hebert, L. Joseph, A. Magnani, A. Chalumeau, A. Gabrion, C. Roudaut, J. Marouene and F. Lefrere (2022). "Long-term outcomes of lentiviral gene therapy for the  $\beta$ -hemoglobinopathies: the HGB-205 trial." Nature Medicine **28**(1): 81-88.

Maguire, A. M., K. A. High, A. Auricchio, J. F. Wright, E. A. Pierce, F. Testa, F. Mingozzi, J. L. Benniselli, G.-s. Ying and S. Rossi (2009). "Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial." The Lancet **374**(9701): 1597-1605.

Makis, A., N. Chaliasos, S. Alfantaki, P. Karagouni and A. Siamopoulou (2013). "Chelation therapy with oral solution of deferiprone in transfusional iron-overloaded children with hemoglobinopathies." Anemia **2013**.

Makis, A., N. Chaliasos and A. Siamopoulou (2011). "Iron Chelation Treatment with Oral Solution of Deferiprone in Young Children with Hemoglobinopathies." Blood **118**(21): 3204.

Makis, A., I. Georgiou, J. Traeger-Synodinos, M. R. Storino, M. Giuliano, I. Andolfo, E. Hatzimichael, N. Chaliasos, V. Giapros and P. Izzo (2021). "A novel  $\epsilon\gamma\delta\beta$ -thalassemia deletion associated with severe anemia at birth and a  $\beta$ -thalassemia intermedia phenotype later in life in three generations of a Greek family." Hemoglobin **45**(6): 351-354.

- Makis, A., E. Hatzimichael, I. Papassotiriou and E. Voskaridou (2016). "2017 Clinical trials update in new treatments of  $\beta$ -thalassemia." *American journal of hematology* **91**(11): 1135-1145.
- Makis, A., E. Voskaridou, I. Papassotiriou and E. Hatzimichael (2021). "Novel Therapeutic Advances in  $\beta$ -Thalassemia." *Biology* **10**(6): 546.
- Mapara, M. Y., F. Locatelli, P. Lang, S. Corbacioglu, A. Li, J. de la Fuente, D. A. Wall, R. Meisel, A. J. Shah and R. Liem (2024). "Transfusion Independence after Exagamglogene Autotemcel in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia." *Transplantation and Cellular Therapy* **30**(2): S236.
- Markt, S., S. Scaramuzza, M. P. Cicalese, F. Giglio, S. Galimberti, M. R. Lidonnici, V. Calbi, A. Assanelli, M. E. Bernardo and C. Rossi (2019). "Intrabone hematopoietic stem cell gene therapy for adult and pediatric patients affected by transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia." *Nature medicine* **25**(2): 234-241.
- Menzel, S., C. Garner, I. Gut, F. Matsuda, M. Yamaguchi, S. Heath, M. Foglio, D. Zelenika, A. Boland and H. Rooks (2007). "A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15." *Nature genetics* **39**(10): 1197-1199.
- Mercola, K. E., M. Bar-Eli, H. D. Stang, D. J. Slamon and M. J. Cline (1982). "Insertion of new genetic information into bone marrow cells of mice: comparison of two selectable genes." *Annals of the New York Academy of Sciences* **397**: 272-280.
- Modell, B. and M. Darlison (2008). "Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators." *Bulletin of the World Health Organization* **86**(6): 480-487.
- Modell, B., M. Khan and M. Darlison (2000). "Survival in beta-thalassaemia major in the UK: data from the UK Thalassaemia Register." *Lancet* **355**(9220): 2051-2052.
- Montini, E., D. Cesana, M. Schmidt, F. Sanvito, M. Ponzoni, C. Bartholomae, L. S. Sergi, F. Benedicenti, A. Ambrosi and C. Di Serio (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.
- Moss, B. (2007). "Poxviridae: the viruses and their replication." (No Title): 2905.
- Musallam, K. M., L. Lombard, K. D. Kistler, M. Arregui, K. S. Gilroy, C. Chamberlain, E. Zagadailov, K. Ruiz and A. T. Taher (2023). "Epidemiology of clinically significant forms of alpha- and beta-thalassemia: A global map of evidence and gaps." *American Journal of Hematology* **98**(9): 1436-1451.

Naldini, L. (2015). "Gene therapy returns to centre stage." Nature **526**(7573): 351-360.

Nienhuis, A. W., C. E. Dunbar and B. P. Sorrentino (2006). "Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells." Molecular Therapy **13**(6): 1031-1049.

Olivieri, N. F. (1999). "The beta-thalassemyias." N Engl J Med **341**(2): 99-109.

Ottolenghi, S., W. G. Lanyon, R. Williamson, D. J. Weatherall, J. B. Clegg and C. S. Pitcher (1975). "Human globin gene analysis for a patient with beta-o/delta beta-thalassaemia." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(6): 2294-2299.

Papanikolaou, E., M. Georgomanoli, E. Stamateris, F. Panetsos, M. Karagiorga, P. Tsaftaris, S. Graphakos and N. P. Anagnou (2012). "The new self-inactivating lentiviral vector for thalassaemia gene therapy combining two HPFH activating elements corrects human thalassaemic hematopoietic stem cells." Human gene therapy **23**(1): 15-31.

Pardi, N., M. J. Hogan, F. W. Porter and D. Weissman (2018). "mRNA vaccines—a new era in vaccinology." Nature reviews Drug discovery **17**(4): 261-279.

Pauling, L., H. A. Itano, S. J. Singer and I. C. Wells (1949). "Sickle cell anemia, a molecular disease." Science **110**(2865): 543-548.

Perrine, R., M. J. Brown, J. B. Clegg, D. J. Weatherall and A. May (1972). "Benign sickle-cell anaemia." The lancet **300**(7788): 1163-1167.

Persons, D. A., P. W. Hargrove, E. R. Allay, H. Hanawa and A. W. Nienhuis (2003). "The degree of phenotypic correction of murine  $\beta$ -thalassaemia intermedia following lentiviral-mediated transfer of a human  $\gamma$ -globin gene is influenced by chromosomal position effects and vector copy number." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **101**(6): 2175-2183.

Pestina, T. I., P. W. Hargrove, D. Jay, J. T. Gray, K. M. Boyd and D. A. Persons (2009). "Correction of murine sickle cell disease using  $\gamma$ -globin lentiviral vectors to mediate high-level expression of fetal hemoglobin." Molecular Therapy **17**(2): 245-252.

Pilo, F. and E. Angelucci (2019). "Iron toxicity and hemopoietic cell transplantation: time to change the paradigm." Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases **11**(1).

Platt, O. S., D. J. Brambilla, W. F. Rosse, P. F. Milner, O. Castro, M. H. Steinberg and P. P. Klug (1994). "Mortality in sickle cell disease--life expectancy and risk factors for early death." New England Journal of Medicine **330**(23): 1639-1644.

Premawardhena, A., C. A. Fisher, N. F. Olivieri, S. de Silva, M. Arambepola, W. Perera, A. O'Donnell, T. E. Peto, V. Viprakasit, L. Merson, G. Muraca and D. J. Weatherall

(2005). "Haemoglobin E beta thalassaemia in Sri Lanka." Lancet **366**(9495): 1467-1470.

Psatha, N., A. Reik, S. Phelps, Y. Zhou, D. Dalas, E. Yannaki, D. N. Levasseur, F. D. Urnov, M. C. Holmes and T. Papayannopoulou (2018). "Disruption of the BCL11A erythroid enhancer reactivates fetal hemoglobin in erythroid cells of patients with  $\beta$ -thalassemia major." Molecular Therapy-Methods & Clinical Development **10**: 313-326.

Puumalainen, A.-M., M. Vapalahti, R. S. Agrawal, M. Kossila, J. Laukkanen, P. Lehtolainen, H. Viita, L. Paljärvi, R. Vanninen and S. Ylä-Herttuala (1998). " $\beta$ -Galactosidase gene transfer to human malignant glioma in vivo using replication-deficient retroviruses and adenoviruses." Human gene therapy **9**(12): 1769-1774.

Rachmilewitz, E. A. and P. J. Giardina (2011). "How I treat thalassemia." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **118**(13): 3479-3488.

Ramalingam, S., N. Annaluru, K. Kandavelou and S. Chandrasegaran (2014). "TALEN-mediated generation and genetic correction of disease-specific human induced pluripotent stem cells." Current gene therapy **14**(6): 461-472.

Rattananon, P., U. Anurathapan, K. Bhukhai and S. Hongeng (2021). "The future of gene therapy for transfusion-dependent beta-thalassemia: The power of the lentiviral vector for genetically modified hematopoietic stem cells." Frontiers in Pharmacology **12**: 730873.

Reghupaty, S. C. and D. Sarkar (2019). "Current Status of Gene Therapy in Hepatocellular Carcinoma." Cancers **11**(9): 1265.

Reinhardt, B., O. Habib, K. L. Shaw, E. Garabedian, D. A. Carbonaro-Sarracino, D. Terrazas, B. C. Fernandez, S. De Oliveira, T. B. Moore and A. K. Ikeda (2021). "Long-term outcomes after gene therapy for adenosine deaminase severe combined immune deficiency." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **138**(15): 1304-1316.

Ribeil, J.-A., S. Haccin-Bey-Abina, E. Payen, A. Magnani, M. Semeraro, E. Magrin, L. Caccavelli, B. Neven, P. Bourget and W. El Nemer (2017). "Gene therapy in a patient with sickle cell disease." New England Journal of Medicine **376**(9): 848-855.

Rio, P., S. Navarro, W. Wang, R. Sanchez-Dominguez, R. M. Pujol, J. C. Segovia, M. Bogliolo, E. Merino, N. Wu and R. Salgado (2019). "Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia." Nature medicine **25**(9): 1396-1401.

Rogers, S. and P. Pfuderer (1968). "Use of viruses as carriers of added genetic information." Nature **219**(5155): 749-751.

Rohlfing, C., S. Hanson, M. P. Estey, P. Bordeleau and R. R. Little (2021). "Evaluation of interference from hemoglobin C, D, E and S traits on measurements of hemoglobin A1c by fifteen methods." Clinica Chimica Acta **522**: 31-35.

Sahin, U., K. Karikó and Ö. Türeci (2014). "mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs." Nature reviews Drug discovery **13**(10): 759-780.

Samakoglu, S., L. Lisowski, T. Budak-Alpdogan, Y. Usachenko, S. Acuto, R. Di Marzo, A. Maggio, P. Zhu, J. F. Tisdale and I. Riviere (2006). "A genetic strategy to treat sickle cell anemia by coregulating globin transgene expression and RNA interference." Nature biotechnology **24**(1): 89-94.

Sankaran, V. G., T. F. Menne, J. Xu, T. E. Akie, G. Lettre, B. Van Handel, H. K. Mikkola, J. N. Hirschhorn, A. B. Cantor and S. H. Orkin (2008). "Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A." Science **322**(5909): 1839-1842.

Schechter, A. N. (2008). "Hemoglobin research and the origins of molecular medicine." Blood **112**(10): 3927-3938.

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

Steinberg, M. H., B. G. Forget, D. R. Higgs and D. J. Weatherall (2009). Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management, Cambridge University Press.

Stolberg, S. G. (1999). "The biotech death of Jesse Gelsinger." NY Times Mag **28**: 136-140.

Storz, J. F. (2018). Hemoglobin: insights into protein structure, function, and evolution, Oxford University Press.

Taher, A. T., J. B. Porter, V. Viprakasit, A. Kattamis, S. Chuncharunee, P. Sutcharitchan, N. Siritanaratkul, R. Galanello, Z. Karakas and T. Lawniczek (2013). "Deferasirox effectively reduces iron overload in non-transfusion-dependent thalassemia (NTDT) patients: 1-year extension results from the THALASSA study." Annals of hematology **92**: 1485-1493.

Tanno, T. and J. L. Miller (2010). "Iron loading and overloading due to ineffective erythropoiesis." Advances in hematology **2010**.



TB, C. (1925). "A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes." Trans Am Pediatr Soc **37**: 29-30.

Thom, C. S., C. F. Dickson, D. A. Gell and M. J. Weiss (2013). "Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates." Cold Spring Harbor perspectives in medicine: a011858.

Thomas, C. E., A. Ehrhardt and M. A. Kay (2003). "Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy." Nature Reviews Genetics **4**(5): 346-358.

Thompson, A. A., M. C. Walters, J. Kwiatkowski, J. E. Rasko, J.-A. Ribeil, S. Hongeng, E. Magrin, G. J. Schiller, E. Payen and M. Semeraro (2018). "Gene therapy in patients with transfusion-dependent  $\beta$ -thalassemia." New England Journal of Medicine **378**(16): 1479-1493.

Thorne, B., R. Takeya, F. Vitelli and X. Swanson (2018). "Gene Therapy." Adv Biochem Eng Biotechnol **165**: 351-399.

Tsang, J. C., Y. Yu, S. Burke, F. Buettner, C. Wang, A. A. Kolodziejczyk, S. A. Teichmann, L. Lu and P. Liu (2015). "Single-cell transcriptomic reconstruction reveals cell cycle and multi-lineage differentiation defects in Bcl11a-deficient hematopoietic stem cells." Genome biology **16**(1): 1-16.

Uda, M., R. Galanello, S. Sanna, G. Lettre, V. G. Sankaran, W. Chen, G. Usala, F. Busonero, A. Maschio and G. Albai (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 **105**(5): 1620-1625.

Uddin, F., C. M. Rudin and T. Sen (2020). "CRISPR gene therapy: applications, limitations, and implications for the future." Frontiers in oncology **10**: 1387.

Voskaridou, E., A. Kattamis, C. Fragodimitri, A. Kourakli, P. Chalkia, M. Diamantidis, E. Vlachaki, M. Drosou, S. Lafioniatis and K. Maragkos (2019). "National registry of hemoglobinopathies in Greece: updated demographics, current trends in affected births, and causes of mortality." Annals of hematology **98**: 55-66.

Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). The structure of DNA. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Weatherall, D. J. (2001). "Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias." Nat Rev Genet **2**(4): 245-255.

White, S. L., T. D. Lee, T. Toy, J. E. Carroll, L. Polsky, B. Campo Fernandez, A. Davila, D. B. Kohn and V. Y. Chang (2022). "Evaluation of clonal hematopoiesis in pediatric ADA-SCID gene therapy participants." Blood Advances **6**(21): 5732-5736.

Wilber, A., P. W. Hargrove, Y.-S. Kim, J. M. Riberdy, V. G. Sankaran, E. Papanikolaou, M. Georgomanoli, N. P. Anagnou, S. H. Orkin and A. W. Nienhuis (2011). "Therapeutic levels of fetal hemoglobin in erythroid progeny of  $\beta$ -thalassemic CD34+ cells after lentiviral vector-mediated gene transfer." Blood, The Journal of the American Society of Hematology **117**(10): 2817-2826.

Wilber, A., A. W. Nienhuis and D. A. Persons (2011). "Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities." Blood **117**(15): 3945-3953.

Williams, T. N. and D. J. Weatherall (2012). "World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **2**(9).

Wirth, T., N. Parker and S. Ylä-Herttuala (2013). "History of gene therapy." Gene **525**(2): 162-169.

Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani and P. L. Felgner (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." Science **247**(4949): 1465-1468.

Wu, Y., J. Zeng, B. P. Roscoe, P. Liu, Q. Yao, C. R. Lazzarotto, K. Clement, M. A. Cole, K. Luk and C. Baricordi (2019). "Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells." Nature medicine **25**(5): 776-783.

Wu, Z., A. Asokan and R. J. Samulski (2006). "Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy." Molecular therapy **14**(3): 316-327.

Xenophontos, M., A. Minaidou, C. Stephanou, S. Tamana, M. Kleanthous and P. Kountouris (2023). "IthaPhen: An Interactive Database of Genotype-Phenotype Data for Hemoglobinopathies." HemaSphere **7**(7).

Yannaki, E., G. Karponi, F. Zervou, V. Constantinou, A. Bouinta, V. Tachynopoulou, K. Kotta, E. Jonlin, T. Papayannopoulou and A. Anagnostopoulos (2013). "Hematopoietic stem cell mobilization for gene therapy: superior mobilization by the combination of granulocyte-colony stimulating factor plus plerixafor in patients with  $\beta$ -thalassemia major." Human gene therapy **24**(10): 852-860.

Zakaria, N. A., R. Bahar, W. Z. Abdullah, A. A. Mohamed Yusoff, S. Shamsuddin, R. Abdul Wahab and M. F. Johan (2022). "Genetic Manipulation Strategies for  $\beta$ -Thalassemia: A Review." Front Pediatr **10**: 901605.

Zhang, B. and M. Farwell (2008). "microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy." Journal of cellular and molecular medicine **12**(1): 3-21.

Zu, H. and D. Gao (2021). "Non-viral vectors in gene therapy: Recent development, challenges, and prospects." The AAPS journal **23**(4): 78.