

کاربرد فناوری CRISPR-Cas⁹ در ویرایش ژن و درمان بیماری‌های ژنتیکی ارثی

مرضیه رحمانی

کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه کوثر (ویژه خواران)، بجنورد، ایران

rhmanymrddyh۶۸@gmail.com

چکیده

فناوری CRISPR-Cas⁹ به عنوان یکی از مهم‌ترین دستاوردهای زیست‌فناوری در دهه اخیر، انقلابی در حوزه ویرایش ژن و درمان بیماری‌های ژنتیکی ایجاد کرده است. این سیستم که برگرفته از مکانیسم ایمنی تطبیقی باکتری‌ها است، امکان ایجاد تغییرات هدفمند و دقیق در ژنوم موجودات زنده را فراهم می‌سازد. در سال‌های اخیر، پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه کاربرد درمانی این فناوری برای بیماری‌های ژنتیکی ارثی از جمله کم‌خونی داسی‌شکل، بتا-تالاسمی، دیستروفی عضلانی دوشن، هموفیلی، فیبروز کیستیک و اختلالات عصبی صورت گرفته است. تأیید اولین داروی مبتنی بر CRISPR-Cas⁹ با نام CASGEVY توسط سازمان غذا و داروی آمریکا و آژانس دارویی بریتانیا در سال ۲۰۲۳، نقطه عطفی در مسیر ترجمه بالینی این فناوری محسوب می‌شود. با وجود این موفقیت‌ها، چالش‌هایی نظیر اثرات خارج از هدف، پاسخ‌های ایمنی، روش‌های تحویل کارآمد و ملاحظات اخلاقی همچنان موانع جدی بر سر راه کاربرد گسترده این فناوری هستند. مقاله حاضر به بررسی جامع مکانیسم‌های مولکولی CRISPR-Cas⁹، کاربردهای بالینی آن در درمان بیماری‌های ژنتیکی ارثی، چالش‌های موجود و چشم‌انداز آینده این فناوری می‌پردازد.

واژگان کلیدی: CRISPR-Cas⁹، ویرایش ژن، درمان ژنی، بیماری‌های ژنتیکی ارثی، ترجمه بالینی، اثرات خارج از هدف

۱. مقدمه

بیماری‌های ژنتیکی ارثی گروه وسیعی از اختلالات را شامل می‌شوند که ناشی از جهش‌های ژنی هستند و میلیون‌ها نفر را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهند. رویکردهای درمانی سنتی برای این بیماری‌ها عمدتاً بر مدیریت علائم متمرکز بوده و قادر به ریشه‌کنی علت اصلی بیماری نیستند. در این میان، درمان ژنی به عنوان رویکردی که به دنبال تصحیح مستقیم جهش‌های ژنی عامل بیماری است، چشم‌انداز امیدوارکننده‌ای ارائه می‌دهد (Laurent و همکاران، ۲۰۲۴).

پیدایش فناوری CRISPR-Cas9 در سال ۲۰۱۲ تحولی بنیادین در حوزه ویرایش ژن ایجاد کرد. این سیستم که در ابتدا به عنوان مکانیسم ایمنی تطبیقی در باکتری‌ها و آرکی‌ها شناسایی شده بود، به دلیل سادگی، کارایی بالا و قابلیت برنامه‌ریزی آسان، به سرعت به ابزاری قدرتمند برای ویرایش دقیق ژنوم تبدیل شد (Linek و همکاران، ۲۰۱۲؛ Cong و همکاران، ۲۰۱۳). برخلاف روش‌های پیشین ویرایش ژن مانند زینک‌انگار نوکلئازها (ZFNs) و نوکلئازهای شبه‌فعال‌کننده‌ی رونویسی (TALENs)، سیستم CRISPR-Cas9 با استفاده از یک RNA راهنمای ساده قابل برنامه‌ریزی است و نیازی به مهندسی پروتئین‌های اختصاصی برای هر تارگت ندارد (Doudna و Charpentier، ۲۰۱۴).

در طول یک دهه گذشته، پژوهش‌های گسترده‌ای بر روی کاربردهای درمانی CRISPR-Cas9 متمرکز شده است. از جمله مهم‌ترین دستاوردها می‌توان به تأیید اولین داروی مبتنی بر CRISPR-Cas9 با نام CASGEVY برای درمان کم‌خونی داسی‌شکل و بتا-تالاسمی وابسته به تزریق خون اشاره کرد که نقطه عطفی در تاریخ پزشکی محسوب می‌شود (Frangoul و همکاران، ۲۰۲۴؛ Locatelli و همکاران، ۲۰۲۴). این موفقیت، راه را برای توسعه درمان‌های مشابه برای طیف وسیعی از بیماری‌های ژنتیکی هموار کرده است (آلو و همکاران، ۲۰۲۵).

با وجود پیشرفت‌های سریع، چالش‌های متعددی بر سر راه کاربرد بالینی گسترده CRISPR-Cas9 وجود دارد. اثرات خارج از هدف، پاسخ‌های ایمنی علیه پروتئین Cas9، روش‌های تحویل ناکارآمد، هزینه‌های بالا و ملاحظات اخلاقی از جمله مهم‌ترین این چالش‌ها هستند (Yang و همکاران، ۲۰۲۴؛ Longhurst و همکاران، ۲۰۲۴). مقاله حاضر با هدف ارائه یک نمای جامع از وضعیت کنونی کاربرد فناوری CRISPR-Cas9 در درمان بیماری‌های ژنتیکی ارثی نگاشته شده است و به بررسی مکانیسم‌های مولکولی، کاربردهای بالینی، چالش‌ها و چشم‌اندازهای آینده این فناوری می‌پردازد.

۲. مبانی مولکولی سیستم CRISPR-Cas9

۲-۱. ساختار و عملکرد سیستم CRISPR-Cas9

سیستم CRISPR-Cas9 یک مکانیسم ایمنی تطبیقی در پروکاریوت‌ها است که از آنها در برابر عناصر ژنتیکی متحرک مانند فاژها و پلاسمیدها محافظت می‌کند (Barrangou و همکاران، ۲۰۰۷). این سیستم شامل دو مؤلفه اصلی است: توالی‌های تکراری CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) و پروتئین‌های مرتبط با CRISPR یا Cas. در سیستم نوع II که Cas9 پروتئین مؤثر آن است، فرآیند برش DNA توسط یک کمپلکس

ریبونوکلئوپروتئینی شامل پروتئین Cas9 و دو مولکول RNA راهنما (tracrRNA و crRNA) انجام می‌شود (linek و همکاران، ۲۰۱۲).

برای کاربردهای مهندسی ژنتیک، این دو RNA راهنما به صورت یک RNA راهنمای کایمری یا sgRNA (single-guide RNA) طراحی می‌شوند که شامل یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی راهنما در انتهای ۵' و یک ساختار ساقه-حلقه در انتهای ۳' است (Cong و همکاران، ۲۰۱۳). sgRNA از طریق جفت‌شدن بازهای واتسون-کریک با توالی هدف در DNA ژنومی، پروتئین Cas9 را به محل مورد نظر هدایت می‌کند. برای ایجاد برش، وجود یک موتیف سه نوکلئوتیدی به نام PAM (Protospacer Adjacent Motif) با توالی NGG در مجاورت توالی هدف ضروری است (Mojica و همکاران، ۲۰۰۹). این ویژگی باعث می‌شود که Cas9 تنها در صورتی بتواند DNA را برش دهد که توالی PAM در جایگاه مناسب حضور داشته باشد، که این امر به طور قابل توجهی به اختصاصیت سیستم می‌افزاید.

پروتئین Cas9 دارای دو دامنه کاتالیتیک است: دامنه RuvC که رشته غیرراهنمای DNA را برش می‌دهد و دامنه HNH که رشته راهنما را برش می‌دهد (Nishimasu و همکاران، ۲۰۱۴). اتصال sgRNA به Cas9 باعث تغییر کنفورماسیون پروتئین و فعال‌سازی دامنه‌های برش‌دهنده می‌شود. sgRNA با توالی هدف جفت می‌شود و PAM شناسایی می‌گردد، هر دو دامنه کاتالیتیک فعال شده و یک برش دو رشته‌ای (DSB) در فاصله ۳ نوکلئوتیدی بالادست PAM ایجاد می‌کنند (Sternberg و همکاران، ۲۰۱۴).

۲-۲. مکانیسم‌های ترمیم DNA پس از برش

پس از ایجاد برش دو رشته‌ای توسط Cas9، سلول مکانیسم‌های ترمیم DNA را فعال می‌کند که عمدتاً از دو مسیر پیروی می‌کنند (جدول ۱):

مسیر اول: اتصال انتهای غیرهمولوگ (NHEJ) - این مسیر رایج‌ترین مسیر ترمیم در سلول‌های یوکاریوتی است و در طول چرخه سلولی فعال می‌باشد. در این مسیر، انتهای شکسته شده مستقیماً به یکدیگر متصل می‌شوند، اما این فرآیند اغلب با خطا همراه است و منجر به حذف یا اضافه شدن نوکلئوتیدها (indels) در محل برش می‌گردد (Lieber، ۲۰۱۰). این جهش‌های تصادفی معمولاً باعث ایجاد تغییر در چارچوب خواندن (frameshift) و در نتیجه غیرفعال‌سازی ژن هدف می‌شوند. این مکانیسم برای رویکردهای ناک‌آوت ژنی بسیار مفید است.

مسیر دوم: ترمیم با کمک همولوژی (HDR) - این مسیر در صورت وجود یک الگوی ترمیم با توالی همولوگ با نواحی فلانکنینگ محل برش فعال می‌شود و عمدتاً در مراحل S و G2 چرخه سلولی رخ می‌دهد (Rothstein و Jasin، ۲۰۱۳). در این روش، از یک مولکول DNA دهنده به عنوان الگو برای ترمیم دقیق استفاده می‌شود که امکان درج یا تصحیح توالی‌های خاص را فراهم می‌سازد. کارایی HDR به طور قابل توجهی کمتر از NHEJ است و این یکی از چالش‌های اصلی در ویرایش دقیق ژن محسوب می‌شود (Yeh و همکاران، ۲۰۱۹).

جدول ۱: مقایسه مکانیسم‌های ترمیم DNA پس از برش توسط Cas9-CRISPR

ویژگی	NHEJ (اتصال انتهای غیرهمولوگ)	HDR (ترمیم با کمک همولوژی)
مکانیسم	اتصال مستقیم انتهای شکسته	ترمیم با استفاده از الگوی همولوگ
نیاز به الگوی DNA	خیر	بله (DNA دهنده)
دقت	خطاپذیر (ایجاد indels)	دقیق (تصحیح یا درج هدفمند)
کارایی	بالا (غالب در سلول)	پایین (وابسته به چرخه سلولی)
فاز چرخه سلولی	تمام فازها	عمدتاً S و G2
کاربرد اصلی	ناک‌آوت ژنی	ناک‌این یا تصحیح دقیق ژن
مزیت	سادگی و کارایی بالا	دقت و قابلیت برنامه‌ریزی

۲-۳. نسل‌های جدید ابزارهای ویرایش ژن مبتنی بر CRISPR

با وجود موفقیت‌های چشمگیر Cas9-CRISPR، محدودیت‌هایی مانند ایجاد برش‌های دو رشته‌ای که می‌توانند منجر به حذف‌ها و بازآرایی‌های کروموزومی ناخواسته شوند، محققان را به توسعه نسل‌های جدیدی از ابزارهای ویرایش ژن سوق داده است (Anzalone و همکاران، ۲۰۱۹؛ Gaudelli و همکاران، ۲۰۱۷).

ویرایش‌گرهای باز (BEs - Base Editors): این فناوری که توسط کمپانی‌های Liu و همکاران توسعه یافته است، امکان تبدیل مستقیم یک جفت باز به جفت باز دیگر را بدون ایجاد برش دو رشته‌ای فراهم می‌سازد (Komor و همکاران، ۲۰۱۶؛ Gaudelli و همکاران، ۲۰۱۷). ویرایش‌گرهای باز شامل یک پروتئین Cas9 با فعالیت برش‌دهندگی غیرفعال (dCas9 یا nCas9) هستند که به یک آنزیم ویرایش‌گر باز مانند دآمیناز متصل شده است. دو نوع اصلی ویرایش‌گرهای باز عبارتند از: ویرایش‌گرهای سیتوزینی (CBEs) که تبدیل C→T را انجام می‌دهند و ویرایش‌گرهای آدنینی (ABEs) که تبدیل A→G را ممکن می‌سازند (Liu و Rees، ۲۰۱۸). این ابزارها برای تصحیح جهش‌های نقطی که حدود ۶۰٪ از جهش‌های بیماری‌زا را تشکیل می‌دهند، بسیار مناسب هستند.

ویرایش‌گرهای پرایم (PEs - Prime Editors): این سیستم که توسط Anzalone و همکاران (۲۰۱۹) معرفی شده است، از یک پروتئین Cas9 با فعالیت برش‌دهندگی تک‌رشته‌ای (nCas9) که به یک آنزیم رونوشت‌بردار معکوس متصل است و یک RNA راهنمای پرایمینگ (pegRNA) استفاده می‌کند. pegRNA علاوه بر توالی راهنمای معمول، حاوی توالی‌ای است که به عنوان پرایمر برای رونوشت‌برداری معکوس عمل می‌کند و توالی اصلاح‌شده مورد نظر را به DNA هدف وارد می‌سازد (Anzalone و همکاران، ۲۰۱۹). این سیستم قابلیت انجام تمام ۱۲ نوع تبدیل باز ممکن و همچنین درج و حذف‌های کوچک را دارا است و دقت بسیار بالایی دارد.

این ابزارهای پیشرفته در سال‌های اخیر به طور فعال در درمان بیماری‌های ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و چشم‌انداز جدیدی در زمینه ویرایش دقیق ژن ایجاد کرده‌اند (Bae، ۲۰۲۵؛ Ji و همکاران، ۲۰۲۵).

۳. کاربردهای بالینی CRISPR-Cas9 در درمان بیماری‌های ژنتیکی ارثی

۳-۱. بیماری‌های خونی

بیماری‌های خونی ژنتیکی از جمله اولین و موفق‌ترین اهداف برای درمان با CRISPR-Cas9 بوده‌اند. دلیل این موفقیت را می‌توان در دسترسی آسان به سلول‌های بنیادی خون‌ساز، امکان ویرایش *ex vivo* و بازگرداندن سلول‌های ویرایش‌شده به بیمار، و دانش گسترده در مورد پاتوفیزیولوژی این بیماری‌ها جستجو کرد (Frangoul و همکاران، ۲۰۲۴؛ Locatelli و همکاران، ۲۰۲۴).

۳-۱-۱. کم‌خونی داسی‌شکل و بتا-تالاسمی

کم‌خونی داسی‌شکل (SCD) و بتا-تالاسمی وابسته به تزریق خون (TDT) شایع‌ترین بیماری‌های هموگلوبینوپاتی هستند که ناشی از جهش در ژن بتا-گلوبین می‌باشند (Bauer و Orkin، ۲۰۱۹). درمان‌های موجود شامل تزریق مکرر خون، درمان با شلاتورهای آهن و پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز آلوژنیک هستند که هر یک با محدودیت‌ها و عوارض خاص خود همراه هستند (Kanter و همکاران، ۲۰۲۴).

رویکرد اصلی درمان با CRISPR-Cas9 برای این بیماری‌ها، افزایش تولید هموگلوبین جنینی (HbF) از طریق ایجاد جهش در جایگاه اتصال فاکتور رونویسی BCL11A در پروموتور گاما-گلوبین است. BCL11A یک سرکوب‌کننده رونویسی است که بیان ژن گاما-گلوبین را مهار می‌کند. با ایجاد جهش در جایگاه اتصال این فاکتور، بیان HbF دوباره فعال می‌شود و می‌تواند کمبود هموگلوبین بزرگسال را جبران کند (Frangoul و همکاران، ۲۰۲۴).

داروی CASGEVY (exagamglogene autotemcel) که توسط Vertex و CRISPR Therapeutics و Pharmaceuticals توسعه یافته است، بر اساس همین رویکرد عمل می‌کند. در این روش، سلول‌های بنیادی خون‌ساز CD34+ بیمار جمع‌آوری شده، با استفاده از CRISPR-Cas9 در جایگاه اریترئوئید-ویژه BCL11A ویرایش می‌شوند و سپس به بیمار بازگردانده می‌شوند (Frangoul و همکاران، ۲۰۲۴).

نتایج کارآزمایی‌های بالینی فاز ۳ نشان داده است که در بیماران SCD، میانگین تعداد حملات انسدادی-عروقی (VOC) از ۴.۳ در سال به صفر کاهش یافته و در بیماران TDT، ۹۵٪ از بیماران به استقلال از تزریق خون دست یافته‌اند (Frangoul و همکاران، ۲۰۲۴؛ Locatelli و همکاران، ۲۰۲۴). در یک مطالعه سیستماتیک بر روی ۱۰۱ بیمار با میانگین سنی ۱۸.۱ سال، نتایج مثبتی مشاهده شد به طوری که بیماران TDT به استقلال از تزریق خون رسیدند و رویدادهای انسدادی-عروقی در بیماران SCD به طور قابل توجهی کاهش یافت (El-Sharkawy و همکاران، ۲۰۲۵). با این حال، بروز عوارض جانبی درجه ۳ در ۸۷.۱٪ از بیماران گزارش شده است که شایع‌ترین آنها نوتروپنی تب‌دار بوده است (El-Sharkawy و همکاران، ۲۰۲۵).

در نوامبر ۲۰۲۳، سازمان غذا و داروی بریتانیا (MHRA) اولین مجوز جهانی را برای CASGEVY صادر کرد و چند ماه بعد، سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) نیز این درمان را برای بیماران ۱۲ سال و بالاتر تأیید کرد (Sheridan, ۲۰۲۴). این تأییدیه‌ها نقطه عطفی در تاریخ پزشکی محسوب می‌شوند و راه را برای توسعه درمان‌های مشابه هموار کرده‌اند (Bae, ۲۰۲۵).

۲-۱-۳. هموفیلی

هموفیلی A و B اختلالات خونریزی‌دهنده ارثی هستند که به ترتیب ناشی از کمبود فاکتورهای انعقادی VIII و IX می‌باشند. رویکردهای درمانی با CRISPR-Cas9 برای این بیماری‌ها عمدتاً بر دو استراتژی متمرکز هستند: درج ژن فاکتور انعقادی در مکان‌های امن ژنومی (safe harbor) و تصحیح دقیق جهش‌های نقطه‌ای عامل بیماری (Singh و همکاران, ۲۰۲۴).

در یک مطالعه پیش‌بالینی، محققان با استفاده از CRISPR-Cas9 موفق به درج cDNA فاکتور IX در سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی شدند که پتانسیل درمانی این رویکرد را برای هموفیلی B نشان داد (Al-Haidose و همکاران, ۲۰۲۴). همچنین، کارآزمایی بالینی BEYOND-9 در حال بررسی یک درمان درون تنی مبتنی بر CRISPR-Cas9 برای هموفیلی B است که از نانوذرات لیپیدی برای تحویل CRISPR و وکتورهای AAV برای درج ژن فاکتور IX استفاده می‌کند (ISTH, ۲۰۲۴).

برای هموفیلی A، پژوهش‌هایی بر روی افزایش بیان فاکتور VIII از طریق ویرایش جایگاه‌های تنظیمی ژن F8 متمرکز شده است (Nair و همکاران, ۲۰۲۴). همچنین، استفاده از ویرایش‌گرهای باز برای تصحیح جهش‌های نقطه‌ای در ژن F8 در حال بررسی است.

۲-۳. دیستروفی عضلانی دوشن

دیستروفی عضلانی دوشن (DMD) یک بیماری ارثی وابسته به کروموزوم X است که ناشی از جهش در ژن دیستروفین (DMD) بوده و با تحلیل پیش‌رونده عضلات اسکلتی مشخص می‌شود (Birnkrant و همکاران, ۲۰۱۸). این بیماری یکی از شایع‌ترین دیستروفی‌های عضلانی با شیوع ۱ در ۳۵۰۰-۵۰۰۰ نوزاد پسر است. اندازه بزرگ ژن DMD (۲.۴ مگاباز) و وجود جهش‌های متنوع در آن، درمان این بیماری را با چالش‌های قابل توجهی مواجه کرده است (Duan, ۲۰۱۸).

رویکردهای درمانی با CRISPR-Cas9 برای DMD شامل سه استراتژی اصلی است:

۱. **حذف اگزون (Exon Skipping):** در این روش، با ایجاد برش‌های هدفمند در اینترون‌های فلانکنینگ یک اگزون جهش‌یافته، آن اگزون حذف شده و چارچوب خواندن ژن ترمیم می‌شود. این رویکرد برای جهش‌هایی که منجر به تغییر چارچوب خواندن می‌شوند (حدود ۷۰٪ از موارد)، بسیار مؤثر است (Min و همکاران, ۲۰۱۹).

۲. **ترمیم با کمک همولوژی (HDR):** در این روش، با استفاده از یک الگوی DNA دهنده، جهش دقیقاً تصحیح می‌شود. اگرچه این روش دقیق‌تر است، اما کارایی آن در سلول‌های عضلانی که تقسیم‌پذیری محدودی دارند، پایین است (Long و همکاران, ۲۰۱۶).

۳. ناک‌این دیستروفین کوچک‌شده: در این رویکرد که به عنوان "دیستروفین مینی‌ژن" نیز شناخته می‌شود، یک نسخه کوچک‌شده اما عملکردی از ژن دیستروفین با استفاده از CRISPR-Cas9 در مکان امن ژنومی درج می‌شود (Tabebordbar و همکاران، ۲۰۱۶).

مطالعات متعددی موفقیت این رویکردها را در مدل‌های حیوانی و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) بیماران نشان داده‌اند (Min و همکاران، ۲۰۱۹؛ Long و همکاران، ۲۰۱۶). با این حال، چالش‌های متعددی از جمله تحویل کارآمد به همه عضلات بدن، پاسخ‌های ایمنی، و هزینه‌های بالا، موانع جدی بر سر راه ترجمه بالینی این رویکردها هستند (Nelson و همکاران، ۲۰۱۹؛ Tabebordbar و همکاران، ۲۰۱۶).

۳-۳. فیبروز کیستیک

فیبروز کیستیک (CF) یک بیماری اتوزومال مغلوب ناشی از جهش در ژن CFTR (کیستیک فیبروز ترانس ممبران رساننده) است که منجر به تولید مخاط غلیظ در ریه‌ها، دستگاه گوارش و سایر اندام‌ها می‌شود (Stoltz و همکاران، ۲۰۱۵). شایع‌ترین جهش در این ژن، حذف سه نوکلئوتید $F508\Delta$ است که حدود ۷۰٪ از موارد را در جمعیت‌های اروپایی شامل می‌شود (Riordan و همکاران، ۱۹۸۹).

CRISPR-Cas9 پتانسیل بالایی برای تصحیح مستقیم جهش‌های CFTR دارد. در یک مطالعه سیستماتیک، محققان کاربرد CRISPR-Cas9 را برای فیبروز کیستیک با هدف قرار دادن جهش‌های ژن CFTR بررسی کردند (Al-Bitar و همکاران، ۲۰۲۵). با این حال، چالش‌های متعددی وجود دارد: اندازه بزرگ cDNA ژن CFTR (۴.۴ کیلوباز) که تحویل آن را با محدودیت مواجه می‌کند، تنوع بالای جهش‌ها در جمعیت‌های مختلف (بیش از ۲۰۰۰ جهش شناخته‌شده)، و نیاز به ویرایش کارآمد در سلول‌های اپیتلیال راه‌های هوایی که تقسیم‌پذیری محدودی دارند (Schwank و همکاران، ۲۰۱۳).

رویکردهای نوین شامل استفاده از ویرایش‌گرهای باز برای تصحیح جهش‌های نقطه‌ای و استفاده از سیستم‌های تحویل مبتنی بر نانوذرات لیپیدی و وکتورهای ویروسی با تروپیزم اختصاصی برای سلول‌های اپیتلیال ریه هستند (Geurts و همکاران، ۲۰۲۰).

۳-۴. اختلالات عصبی

بیماری‌های نورودژنراتیو مانند بیماری هانتینگتون، آلزایمر و پارکینسون از جمله چالش‌برانگیزترین اهداف برای درمان با CRISPR-Cas9 هستند (Akyuz و همکاران، ۲۰۲۴). موانع اصلی شامل وجود سد خونی-مغزی، ماهیت غیرقابل تقسیم اکثر سلول‌های عصبی، و نیاز به ویرایش دقیق در جمعیت‌های سلولی خاص مغز می‌باشند (Yang و همکاران، ۲۰۲۴).

بیماری هانتینگتون: این بیماری ناشی از گسترش توالی تکراری CAG در ژن HTT است. استراتژی‌های درمانی شامل ناک‌آوت الل جهش‌یافته به صورت اختصاصی (با استفاده از پلی‌مورفیسم‌های نوکلئوتیدی منفرد)، کاهش بیان هر دو الل (در

صورت غالب بودن جهش)، و تصحیح دقیق توالی تکراری با استفاده از ویرایش‌گرهای پرایم هستند (Shin و همکاران، ۲۰۲۴؛ Yang و همکاران، ۲۰۲۴).

بیماری آنزایمر: CRISPR-Cas9 برای ایجاد مدل‌های سلولی و حیوانی بیماری، بررسی نقش ژن‌های مستعدکننده مانند APOEε₄، و هدف‌گیری مستقیم ژن‌های دخیل در تولید آمیلوئید-بتا و فسفوریلاسیون تاو مورد استفاده قرار گرفته است (Soni و همکاران، ۲۰۲۴). کاهش رسوب آمیلوئید-بتا یا فسفوریلاسیون تاو در سلول‌ها با استفاده از CRISPR-Cas9 گزارش شده است (Park و همکاران، ۲۰۲۴).

سندرم آنجلمن: این سندرم ناشی از نقص در چاپ ژنی (imprinting) ژن UBE3A است. در یک مطالعه پیش‌بالینی، CRISPR-Cas9 با موفقیت برای فعال‌سازی مجدد ال‌خاموش UBE3A در مدل‌های موشی استفاده شده است (Wolter و همکاران، ۲۰۲۴).

۵-۳. بیماری‌های قلبی-عروقی

بیماری‌های قلبی-عروقی ژنتیکی شامل کاردیومیوپاتی‌ها، هیپرکلسترولمی خانوادگی و آمیلوئیدوز ترانستایرین (ATTR) هستند که CRISPR-Cas9 پتانسیل بالایی برای درمان آنها دارد (Katsuki و همکاران، ۲۰۲۴؛ Longhurst و همکاران، ۲۰۲۴).

آمیلوئیدوز ترانستایرین (ATTR-CM): در یک کارآزمایی بالینی فاز ۱، داروی nexiguran ziclumeran (nex-Z) که یک ویرایش‌گر مبتنی بر CRISPR-Cas9 برای هدف‌گیری ژن TTR است، در ۳۶ بیمار مبتلا به ATTR-CM مورد بررسی قرار گرفت (Gillmore و همکاران، ۲۰۲۴). نتایج نشان داد که یک دوز واحد از nex-Z با کاهش سریع، مداوم و پایدار در سطح سرمی TTR همراه بود، هرچند واکنش‌های مرتبط با انفوزیون نیز مشاهده شد (Gillmore و همکاران، ۲۰۲۴).

هیپرکلسترولمی خانوادگی: هدف‌گیری ژن PCSK9 با استفاده از CRISPR-Cas9 به عنوان یک رویکرد امیدوارکننده برای کاهش سطح LDL کلسترول در بیماران مبتلا به هیپرکلسترولمی خانوادگی هموزیگوت (HoFH) در حال بررسی است (Musunuru و همکاران، ۲۰۲۴). در یک مطالعه، استفاده از PsCas9 مهندسی‌شده با نانوذرات لیپیدی منجر به کاهش سطح Pcsk9 در پلاسمای خون موش‌ها شد (Wang و همکاران، ۲۰۲۴).

جدول ۲: خلاصه کارآزمایی‌های بالینی مهم CRISPR-Cas9 برای بیماری‌های ژنتیکی

بیماری	نام درمان	فاز کارآزمایی	استراتژی ویرایش	نتایج کلیدی	مرجع
کم‌خونی داسی‌شکل	exa-CASGEVY (cel)	فاز ۳ (تأییدشده)	ناک‌آوت BCL11A	کاهش VOC به صفر	Frangoul و همکاران، ۲۰۲۴
بتا-تالاسمی وابسته	exa-CASGEVY (cel)	فاز ۳ (تأییدشده)	ناک‌آوت BCL11A	استقلال از تزریق خون در ۹۵٪	Locatelli و همکاران، ۲۰۲۴
ATTR-CM	Nexiguran ziclumeran	فاز ۱	ناک‌آوت TTR	کاهش پایدار TTR	Gillmore و همکاران، ۲۰۲۴
آنژیوادم ارثی	NTLA-۲۰۰۲	فاز ۲/۱	ناک‌آوت KLKB1	کاهش حملات آنژیوادم	Longhurst و همکاران، ۲۰۲۴
هموفیلی B	REGV۱۳۱-LNP۱۲۶۵	فاز ۲/۱ (در حال انجام)	درج F9	در حال ارزیابی	ISTH، ۲۰۲۴

۳-۶. سایر بیماری‌ها

علاوه بر بیماری‌های فوق، CRISPR-Cas9 برای طیف وسیعی از بیماری‌های ژنتیکی دیگر از جمله دیستروفی شبکه، بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی، و بیماری‌های میتوکندریایی در حال بررسی است (Campagne و همکاران، ۲۰۲۴؛ Laurent و همکاران، ۲۰۲۴).

۴. چالش‌های پیش روی کاربرد بالینی CRISPR-Cas9

۴-۱. اثرات خارج از هدف (Off-Target Effects)

یکی از مهم‌ترین نگرانی‌ها در مورد کاربرد بالینی CRISPR-Cas9، احتمال ایجاد برش‌های ناخواسته در مکان‌های غیرهدف ژنوم است که می‌تواند منجر به جهش‌های تصادفی و حتی سرطان‌زایی شود (Yang و همکاران، ۲۰۲۴؛ Anderson و همکاران، ۲۰۲۴).

اگرچه Cas9 به طور طبیعی دارای اختصاصیت بالایی است، اما تحقیقات نشان داده است که برش‌های خارج از هدف می‌توانند در مکان‌هایی با شباهت توالی تا ۵-۴ نوکلئوتید با توالی هدف رخ دهند (Hsu و همکاران، ۲۰۱۳). روش‌های متعددی برای شناسایی و کاهش اثرات خارج از هدف توسعه یافته‌اند که شامل ابزارهای *in silico* مانند CRISPROff و روش‌های تجربی مانند Digenome-seq، CIRCLE-seq، و کشف سراسری برش‌های خارج از هدف (GUIDE-seq) می‌باشند (Anderson و همکاران، ۲۰۲۴).

یک چالش اساسی در پیش‌بینی اثرات خارج از هدف، عدم تعادل شدید بین کلاس‌ها در دیتاست‌های خارج از هدف است که دقت پیش‌بینی را به شدت کاهش می‌دهد. Yang و همکاران (۲۰۲۴) یک استراتژی جدید به نام ESB (Efficiency and Specificity-Based) برای رفع این عدم تعادل ارائه کرده‌اند که همراه با مدل CRISPR-MCA، دقت پیش‌بینی اثرات خارج از هدف را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد.

علاوه بر این، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که ویرایش‌گرهای باز آدینینی (ABE) نیز می‌توانند باعث ایجاد تغییرات ساختاری خارج از هدف در جنین موش و سلول‌های T اولیه انسانی شوند که نیاز به توسعه ابزارهای ویرایش با وفاداری بالا را بیش از پیش ضروری می‌سازد (Lee و همکاران، ۲۰۲۴).

۲-۴. پاسخ‌های ایمنی و ایمنی‌زایی

پروتئین Cas9 که از باکتری‌ها منشأ گرفته است، می‌تواند به عنوان یک آنتی‌ژن خارجی توسط سیستم ایمنی انسان شناسایی شده و پاسخ‌های ایمنی را تحریک کند (Wagner و همکاران، ۲۰۲۴). این مسئله به ویژه در مورد ویرایش درون‌تنی که در آن پروتئین Cas9 مستقیماً به بدن تزریق می‌شود، اهمیت دارد.

مطالعات نشان داده است که آنتی‌بادی‌های ضد Cas9 و سلول‌های T واکنش‌دهنده به Cas9 در جمعیت انسانی وجود دارند که می‌توانند کارایی درمان را کاهش دهند یا عوارض جانبی ایمنی ایجاد کنند (Charlesworth و همکاران، ۲۰۱۹؛ Wagner و همکاران، ۲۰۲۴). برای کاهش ایمنی‌زایی، استراتژی‌های مختلفی از جمله مهندسی پروتئین Cas9 برای حذف اپی‌توپ‌های ایمنی‌زا، استفاده از سیستم‌های تحویل غیرویروسی که تماس با پروتئین را محدود می‌کنند، و استفاده از پروتئین‌های Cas9 با منشأ انسانی‌شده در حال توسعه هستند (Wagner و همکاران، ۲۰۲۴).

همچنین، وکتورهای ویروسی مانند AAV که به طور گسترده برای تحویل CRISPR استفاده می‌شوند، خود می‌توانند پاسخ‌های ایمنی را تحریک کنند (Wang و همکاران، ۲۰۲۴). توسعه وکتورهای با ایمنی‌زایی کمتر و استفاده از سیستم‌های تحویل غیرویروسی مانند نانوذرات لیپیدی (LNPs) از جمله راهکارهای مورد بررسی در این زمینه هستند.

۳-۴. چالش‌های تحویل (Delivery)

تحویل کارآمد و اختصاصی اجزای CRISPR-Cas9 به سلول‌ها و بافت‌های هدف، یکی از بزرگترین موانع بر سر راه کاربرد بالینی این فناوری است (Li و همکاران، ۲۰۲۴). روش‌های تحویل به دو دسته کلی ویروسی و غیرویروسی تقسیم می‌شوند:

روش‌های ویروسی: وکتورهای AAV به دلیل ایمنی نسبی و قابلیت ترانسفکشن سلول‌های غیرتقسیم‌شونده، رایج‌ترین وکتورهای مورد استفاده برای تحویل CRISPR هستند (Wang و همکاران، ۲۰۲۴). با این حال، محدودیت ظرفیت ژنی AAV (حدود ۴.۷ کیلوباز) که کمتر از اندازه مورد نیاز برای کد کردن SpCas9 (حدود ۴.۲ کیلوباز) به همراه sgRNA و پروموتور است، چالش مهمی محسوب می‌شود. برای رفع این مشکل، از Cas9های کوچک‌تر مانند SaCas9 (۳.۳ کیلوباز) و CjCas9 استفاده می‌شود (Ran و همکاران، ۲۰۱۵).

روش‌های غیرویروسی: نانوذرات لیپیدی (LNPs) به عنوان یکی از امیدوارکننده‌ترین روش‌های تحویل غیرویروسی مطرح هستند. در یک مطالعه پیشگامانه، محققان با استفاده از LNPs حاوی ریبونوکلوپروتئین‌های CRISPR-Cas9(RNPs)، موفق به ایجاد ویرایش ژن در کبد و ریه موش‌ها با کارایی ۱۶-۳۷٪ شدند (Kawamata و همکاران، ۲۰۲۵). استفاده از RNPs به جای mRNA یا پلاسمید، مزایایی از جمله کاهش ایمنی‌زایی، کاهش اثرات خارج از هدف به دلیل نیمه‌عمر کوتاه‌تر پروتئین، و حذف خطر ادغام ژنی را دارد (Kawamata و همکاران، ۲۰۲۵).

سایر روش‌های غیرویروسی شامل پپتیدهای نفوذکننده به سلول (CPPs) و وزیکول‌های خارج‌سلولی (EVs) هستند که هر یک مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند (Li و همکاران، ۲۰۲۴).

جدول ۳: مقایسه روش‌های تحویل CRISPR-Cas9

روش تحویل	مزایا	معایب	کاربرد
AAV	کارایی بالا، تروپیسم بافتی	ظرفیت محدود، ایمنی‌زایی	کبد، عضله، CNS
لنتوویروس	ظرفیت بالا، ادغام طولانی‌مدت	خطر ادغام، جهش‌زایی	سلول‌های بنیادی خون‌ساز
نانوذرات لیپیدی (LNP)	ایمنی‌زایی کم، ظرفیت بالا	کارایی کمتر در برخی بافت‌ها	کبد، ریه
وزیکول‌های خارج‌سلولی	سازگاری زیستی بالا	کارایی پایین	بافت‌های مختلف
پپتیدهای نفوذکننده	سادگی، هزینه کم	اختصاصیت محدود	کشت سلولی

۴-۴. ملاحظات اخلاقی و قانونی

کاربرد CRISPR-Cas9 برای ویرایش ژن‌های انسانی، به ویژه در مورد سلول‌های زایا (germline) که تغییرات آن به نسل‌های آینده منتقل می‌شود، مسائل اخلاقی پیچیده‌ای را ایجاد کرده است (Kleiderman و همکاران، ۲۰۲۴؛ WHO، ۲۰۲۴).

ویرایش سلول‌های سوماتیک: ویرایش سلول‌های غیرزایا که تغییرات آن به نسل‌های آینده منتقل نمی‌شود، به طور کلی با حمایت اخلاقی و قانونی بیشتری مواجه است (Kleiderman و همکاران، ۲۰۲۴). با این حال، چالش‌هایی مانند هزینه‌های بالا و دسترسی نابرابر به این درمان‌ها همچنان وجود دارد.

ویرایش سلول‌های زایا: این حوزه به دلیل نگرانی‌های مربوط به تغییرات ارثی، پیامدهای نسل‌های آینده و احتمال ایجاد "نوزادان طراح" (designer babies)، با مخالفت‌های گسترده‌ای مواجه است (Kleiderman و همکاران، ۲۰۲۴). در ژوئیه ۲۰۲۴، وزارت علوم چین تمام تحقیقات بالینی مربوط به ویرایش سلول‌های زایا را ممنوع اعلام کرد (China Ministry of Science، ۲۰۲۴). سازمان بهداشت جهانی نیز در چارچوب راهنمایی خود برای حکمرانی ویرایش ژنوم انسانی، بر اهمیت همسوسازی پژوهش و سیاست‌گذاری با ارزش‌های عمومی تأکید کرده است (WHO، ۲۰۲۴).

یک مرور نظامند از مطالعات مشارکت عمومی در مورد ویرایش سلول‌های زایا نشان داد که اگرچه تلاش‌های متعددی برای جلب مشارکت عمومی انجام شده است، اما همچنان نیاز به تلاش‌های هم‌آفرینانه‌تر برای شامل‌شدن گروه‌های محروم و تبدیل مشارکت به تأثیر اجتماعی ملموس وجود دارد (Kleiderman و همکاران، ۲۰۲۴).

۵. چشم‌انداز آینده و روندهای نوظهور

۵-۱. ویرایش‌گرهای نسل جدید

توسعه ویرایش‌گرهای باز و ویرایش‌گرهای پرایم، امکان ویرایش دقیق‌تر و ایمن‌تر ژنوم را بدون نیاز به ایجاد برش‌های دو رشته‌ای فراهم کرده است (Bae، ۲۰۲۵؛ Al و همکاران، ۲۰۲۵). این ابزارها به ویژه برای تصحیح جهش‌های نقطه‌ای که حدود ۶۰٪ از جهش‌های بیماری‌زا را تشکیل می‌دهند، بسیار مناسب هستند. در سال‌های اخیر، کارآزمایی‌های بالینی متعددی با استفاده از ویرایش‌گرهای باز در حال انجام است و انتظار می‌رود در آینده نزدیک، اولین درمان‌های مبتنی بر این فناوری وارد بازار شوند (Bae، ۲۰۲۵).

۵-۲. ویرایش اپی‌ژنتیک

فراتر از تغییر توالی DNA، CRISPR-Cas۹ می‌تواند برای ویرایش اپی‌ژنتیک نیز مورد استفاده قرار گیرد. با استفاده از Cas۹ غیرفعال (dCas۹) متصل به آنزیم‌های اصلاح‌کننده اپی‌ژنتیک مانند متیل ترانسفرازها و استیل ترانسفرازها، می‌توان بیان ژن‌ها را بدون تغییر توالی DNA تنظیم کرد (Nakamura و همکاران، ۲۰۲۴). این رویکرد برای بیماری‌هایی که ناشی از تنظیم نادرست بیان ژن هستند، بسیار جذاب است.

۵-۳. ویرایش RNA

ابزارهای ویرایش RNA مبتنی بر CRISPR مانند Cas۱۳ و CasV-II، امکان ایجاد تغییرات موقت در RNA را بدون ایجاد تغییرات دائمی در DNA فراهم می‌کنند (آلو همکاران، ۲۰۲۵). این رویکرد برای بیماری‌هایی که تغییرات دائمی DNA مطلوب نیست یا خطرناک است، مانند بیماری‌های عصبی و التهابی، بسیار مفید است.

۵-۴. تحویل هدفمند و اختصاصی بافتی

پیشرفت‌های اخیر در طراحی نانوذرات لیپیدی و مهندسی وکتورهای ویروسی، امکان تحویل اختصاصی تر CRISPR-Cas۹ به بافت‌های هدف را فراهم کرده است (Kawamata و همکاران، ۲۰۲۵). استفاده از لیگاندهای هدفمند بر روی سطح نانوذرات و استفاده از پروموتورهای اختصاصی بافتی از جمله راهکارهای مورد بررسی هستند.

۵-۵. کاهش هزینه‌ها و افزایش دسترسی

هزینه‌های بالای درمان‌های مبتنی بر CRISPR-Cas9 (بیش از ۲ میلیون دلار برای CASGEVY) یکی از موانع اصلی دسترسی به این درمان‌ها است (Kleiderman و همکاران، ۲۰۲۴). توسعه روش‌های تولید کارآمدتر، افزایش رقابت در بازار، و ایجاد مکانیسم‌های تأمین مالی نوآورانه از جمله راهکارهای کاهش هزینه و افزایش دسترسی هستند.

۶. نتیجه‌گیری

فناوری CRISPR-Cas9 انقلابی در حوزه ویرایش ژن و درمان بیماری‌های ژنتیکی ارثی ایجاد کرده است. از زمان معرفی این فناوری در سال ۲۰۱۲، پیشرفت‌های چشمگیری در درک مکانیسم‌های مولکولی، بهبود کارایی و اختصاصیت، و ترجمه بالینی آن صورت گرفته است. تأیید اولین داروی مبتنی بر CRISPR-Cas9 (CASGEVY) برای درمان کم‌خونی داسی‌شکل و بتا-تالاسمی در سال ۲۰۲۳، نقطه عطفی در تاریخ پزشکی محسوب می‌شود و راه را برای توسعه درمان‌های مشابه برای طیف وسیعی از بیماری‌های ژنتیکی هموار کرده است.

با وجود این موفقیت‌ها، چالش‌های متعددی بر سر راه کاربرد گسترده این فناوری وجود دارد. اثرات خارج از هدف، پاسخ‌های ایمنی، روش‌های تحویل ناکارآمد، هزینه‌های بالا، و ملاحظات اخلاقی از جمله مهم‌ترین این چالش‌ها هستند. توسعه ویرایش‌گرهای نسل جدید مانند ویرایش‌گرهای باز و پرایم، بهبود روش‌های تحویل، و ایجاد چارچوب‌های قانونی و اخلاقی مناسب، می‌تواند به رفع این چالش‌ها کمک کند.

آینده CRISPR-Cas9 در درمان بیماری‌های ژنتیکی بسیار روشن به نظر می‌رسد. با ادامه تحقیقات و توسعه فناوری‌های مکمل، انتظار می‌رود در دهه آینده شاهد ورود درمان‌های متعدد دیگری به بازار باشیم که می‌توانند زندگی میلیون‌ها نفر را در سراسر جهان متحول سازند. با این حال، موفقیت پایدار این فناوری نیازمند رویکردی متوازن است که همزمان به پیشرفت علمی، ایمنی بیماران، و ملاحظات اخلاقی و اجتماعی توجه داشته باشد.

۷. منابع

Al-Bitar, M. A., Al-Rawi, A. A., & Al-Haidose, A. (۲۰۲۵). Unlocking the potential of CRISPR-Cas9 for cystic fibrosis: A systematic literature review. *PubMed*.

Al-Haidose, A., et al. (۲۰۲۴). CRISPR/Cas9 edition of the F9 gene in human mesenchymal stem cells for hemophilia B therapy. *PMC*.

Anderson, K. R., et al. (۲۰۲۴). Beyond precision: evaluation of off-target CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Cytotherapy*, ۲۷(۳), ۲۷۹-۲۸۶.

Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., et al. ۲۰۱۹. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, ۵۷۱(۷۷۸۵), ۱۴۹-۱۵۷.

Bae, S. ۲۰۲۵. Therapeutic applications of genome editing tools for genetic diseases. *Journal of Electrodiagnosis and Neuromuscular Diseases*, ۲۷(۱), ۱-۵.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., et al. ۲۰۰۷. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, ۳۱۵(۵۸۱۹), ۱۷۰۹-۱۷۱۲.

Birnkrant, D. J., Bushby, K., Bann, C. M., et al. ۲۰۱۸. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part ۱: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *The Lancet Neurology*, ۱۷(۳), ۲۵۱-۲۶۷.

Campagne, L. ۲۰۲۴. Current approaches in CRISPR-Cas systems for hereditary diseases. *ScienceDirect*.

Charlesworth, C. T., Deshpande, P. S., Dever, D. P., et al. ۲۰۱۹. Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. *Nature Medicine*, ۲۵(۲), ۲۴۹-۲۵۴.

China Ministry of Science. ۲۰۲۴. Prohibition of all clinical research involving germ-line editing. *Official Announcement*.

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., et al. ۲۰۱۳. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, ۳۳۹(۶۱۲۱), ۸۱۹-۸۲۳.

Doudna, J. A., & Charpentier, E. ۲۰۱۴. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, ۳۴۱(۶۱۳۷), ۱۲۵۸-۱۲۶۵.

Duan, D. ۲۰۱۸. Systemic AAV micro-dystrophin gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Molecular Therapy*, ۲۷(۱۰), ۲۳۳۷-۲۳۳۹.

El-Sharkawy, M., et al. ۲۰۲۵. CRISPR/Cas9 gene editing in transfusion-dependent β -thalassemia and sickle cell disease: A systematic review of non-randomized clinical trials. *Journal of Translational Medicine*, ۲۷, ۱۷۷.

Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., et al. ۲۰۲۴. Exagamglogene autotemcel for severe sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, ۳۹۰(۱۸), ۱۶۴۹-۱۶۶۲.

Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., et al. ۲۰۱۷. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, ۵۵۱(۷۶۸۱), ۴۶۸-۴۷۱.

Geurts, M. H., de Poel, E., Pleguezuelos-Manzano, C., et al. ۲۰۲۰. CRISPR-based adenine editors correct nonsense mutations in a cystic fibrosis organoid biobank. *Cell Stem Cell*, ۲۶(۴), ۵۰۳-۵۱۰.

Gillmore, J. D., et al. ۲۰۲۴. CRISPR-Cas9 gene editing with nexiguran ziclumeran for ATTR cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*.

Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., et al. ۲۰۱۳. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, ۳۱(۹), ۸۲۷-۸۳۲.

ISTH. ۲۰۲۴. BEYOND-9: A two-part open-label study of an in vivo CRISPR/Cas9-based coagulation factor IX targeted gene insertion therapy for hemophilia B.

Jasin, M., & Rothstein, R. ۲۰۱۳. Repair of strand breaks by homologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, ۵(۱۱), a۰۱۲۷۸۰.

Ji, R., et al. ۲۰۲۵. Emerging trends in gene and cell therapy: CRISPR in DNA editing and beyond. *Cell Reports Medicine*, ۷(۱), ۱۰۶۸۵۹.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., et al. ۲۰۱۲. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, ۳۳۷(۶۰۹۶), ۸۱۶-۸۲۱.

Kanter, J., et al. ۲۰۲۴. Novel gene therapies for sickle cell disease. *JAAPA*.

Katsuki, S., et al. ۲۰۲۴. Integrating prime editing and cellular reprogramming as novel strategies for genetic cardiac disease modeling and treatment. *PMC*.

Kawamata, M., et al. ۲۰۲۵. Lung and liver editing by lipid nanoparticle delivery of a stable CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein. *Nature Biotechnology*, ۴۳, ۱۴۴۵-۱۴۵۷.

Kleiderman, E., et al. ۲۰۲۴. (A decade of public engagement regarding human germline gene editing: a systematic scoping review. *European Journal of Human Genetics*, ۳۳)۵۷۰-۵۷۹.

Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., et al. ۲۰۱۶. (Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, ۵۳۳)۷۶۰-۳۷۴.

Laurent, M., et al. ۲۰۲۴. (Recent advances and applications of the CRISPR-Cas system in the gene therapy of blood disorders. *ScienceDirect*.

Lee, H., et al. ۲۰۲۴. (Adenine base editors induce off-target structure variations in mouse embryos and primary human T cells. *Genome Biology*.

Li, Y., et al. ۲۰۲۴. (Unlocking genome editing: Advances and obstacles in CRISPR/Cas delivery technologies. *PubMed*.

Lieber, M. R. ۲۰۱۰. (The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual Review of Biochemistry*, ۷۹, ۱۸۱-۲۱۱).

Locatelli, F., Lang, P., Wall, D., et al. ۲۰۲۴. (Exagamglogene autotemcel for transfusion-dependent β -thalassemia. *New England Journal of Medicine*, ۳۹۰)۱۸۷۶-۱۷۶۳.

Long, C., Amoasii, L., Mireault, A. A., et al. ۲۰۱۶. (Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science*, ۳۵۱)۶۲۷۱۷-۷۱۰.

Longhurst, H. J., Lindsay, K., Petersen, R. S., et al. ۲۰۲۴. (CRISPR-Cas9 in vivo gene editing of KLKB1 for hereditary angioedema. *New England Journal of Medicine*.

Min, Y. L., Li, H., Rodriguez-Caycedo, C., et al. ۲۰۱۹. (CRISPR-Cas9 corrects Duchenne muscular dystrophy in mice by restoring dystrophin expression. *Nature Biomedical Engineering*, ۳)۷۲۷-۷۳۷.

Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. ۲۰۰۹. (Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, ۱۵۵)۷۳۳-۷۴۰.

- Musunuru, K., et al. ۲۰۲۴. Therapeutic gene editing in dyslipidemias. *OUCI*.
- Nair, N., et al. ۲۰۲۴. Targeted genome engineering based on CRISPR/Cas9 system to enhance FVIII expression in vitro. *Pesquisa*.
- Nakamura, M., et al. ۲۰۲۴. On RNA-programmable gene modulation as a versatile set of principles targeting muscular dystrophies. *PMC*.
- Nelson, C. E., Hakim, C. H., Ousterout, D. G., et al. ۲۰۱۹. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, ۳۵۱(۶۲۷۱), ۴۰۳-۴۰۷.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., et al. ۲۰۱۴. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, ۱۵۶(۵), ۹۳۵-۹۴۹.
- Orkin, S. H., & Bauer, D. E. ۲۰۱۹. Emerging genetic therapies for hemoglobinopathies. *Blood*, ۱۳۳(۲۵), ۲۶۳۵-۲۶۴۲.
- Park, B. S., Lee, M., Kim, J., & Kim, T. ۲۰۲۴. Perturbomics: CRISPR-Cas screening-based functional genomics approach for drug target discovery. *Nature Reviews Genetics*.
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., et al. ۲۰۱۵. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, ۵۲۰(۷۵۴۶), ۱۸۶-۱۹۱.
- Rees, H. A., & Liu, D. R. ۲۰۱۸. Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. *Nature Reviews Genetics*, ۱۹(۱۲), ۷۷۰-۷۸۸.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., et al. ۱۹۸۹. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, ۲۴۵(۴۹۲۲), ۱۰۶۶-۱۰۷۳.
- Schwank, G., Koo, B. K., Sasselli, V., et al. ۲۰۱۳. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell*, ۱۳(۶), ۶۵۳-۶۵۸.
- Sheridan, C. ۲۰۲۴. The first CRISPR therapy is approved. *Nature Biotechnology*, ۴۲, ۱-۳.

Shin, J. H., et al. ۲۰۲۴. CRISPR-based gene editing techniques in pediatric neurological disorders. *Pediatric Neurology*, ۱۵۳, ۱۶۶-۱۷۴.

Singh, A., et al. ۲۰۲۴. CRISPR-Cas9 system: a novel and promising era of gene therapy for beta-hemoglobinopathies, hematological malignancy, and hemophilia. *Pesquisa*.

Soni, N., Kar, I., Narendrasinh, J. D., & Kumar, S. ۲۰۲۴. Role and application of CRISPR-Cas9 in the management of Alzheimer's disease. *Annals of Medicine & Surgery*, ۱۶۳, ۱۵۱۷-۱۵۲۱.

Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., et al. ۲۰۱۴. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, ۵۰۷(۷۴۹۰), ۶۷-۷۱.

Stoltz, D. A., Meyerholz, D. K., & Welsh, M. J. ۲۰۱۵. Origins of cystic fibrosis lung disease. *New England Journal of Medicine*, ۳۷۲(۴), ۳۵۱-۳۶۲.

Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J. K., et al. ۲۰۱۶. In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, ۳۵۱(۶۲۷۱), ۴۰۷-۴۱۱.

Wagner, D. L., et al. ۲۰۲۴. Reduced immunogenicity variants of Cas9 and Cas12a nucleases. *Nature Biotechnology*.

Wang, Y., et al. ۲۰۲۴. Engineered PsCas9 enables therapeutic genome editing in mouse liver with lipid nanoparticles. *Nature Communications*.

WHO (World Health Organization). ۲۰۲۴. WHO framework for governance of human genome editing.

Wolter, M., et al. ۲۰۲۴. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*.

Yang, Y., Zheng, Y., Zou, Q., Li, J., & Feng, H. ۲۰۲۴. Overcoming CRISPR-Cas9 off-target prediction hurdles: A novel approach with ESB rebalancing strategy and CRISPR-MCA model. *PLOS Computational Biology*.

Yeh, C. D., Richardson, C. D., & Corn, J. E. ۲۰۱۹. Advances in genome editing through control of DNA repair pathways. *Nature Cell Biology*, ۲۱(۱۲), ۱۴۶۸-۱۴۷۸.