



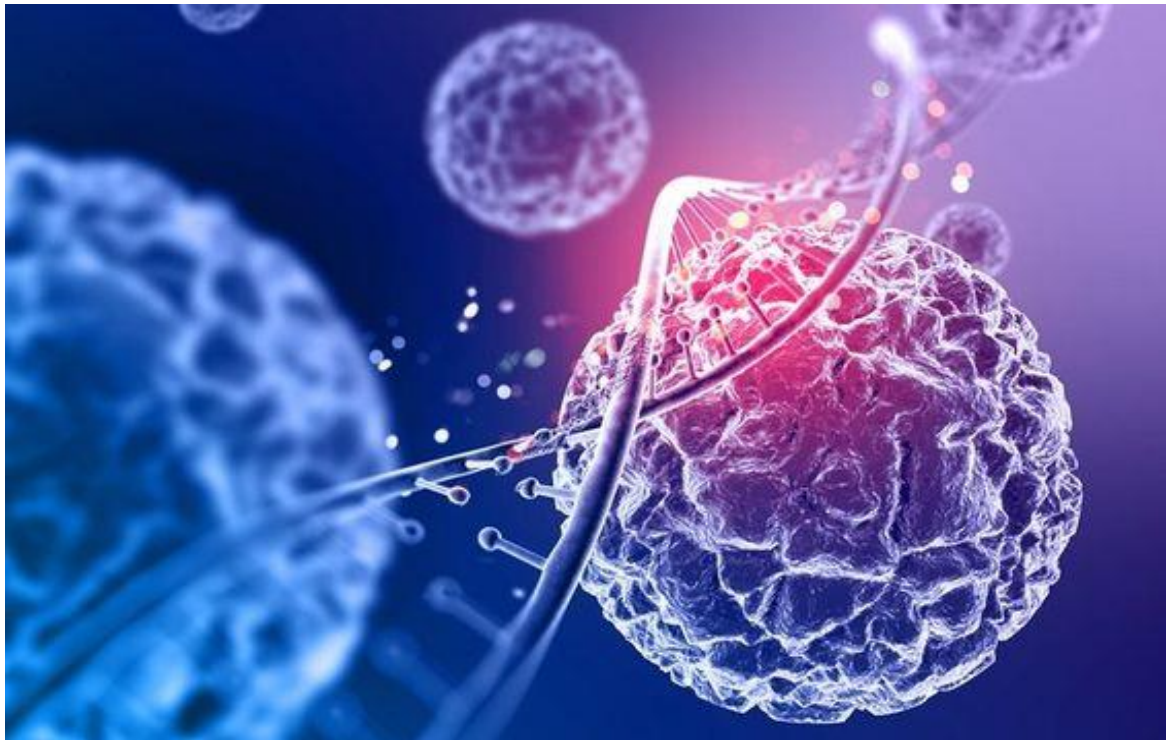
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η χρήση ιικών φορέων στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας



Όνοματεπώνυμο φοιτητή (Α.Μ.)

Παλάσκα Ρηγούλα (19678229)

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΑ

Δρ. Άννα Κολλιοπούλου

Αθήνα, 2023

Πηγή εικόνας εξωφύλλου: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRm9ELw1r2m8fdRVSNYS E4Kc-ru5gjCN6M6Qw&usqp=CAU>



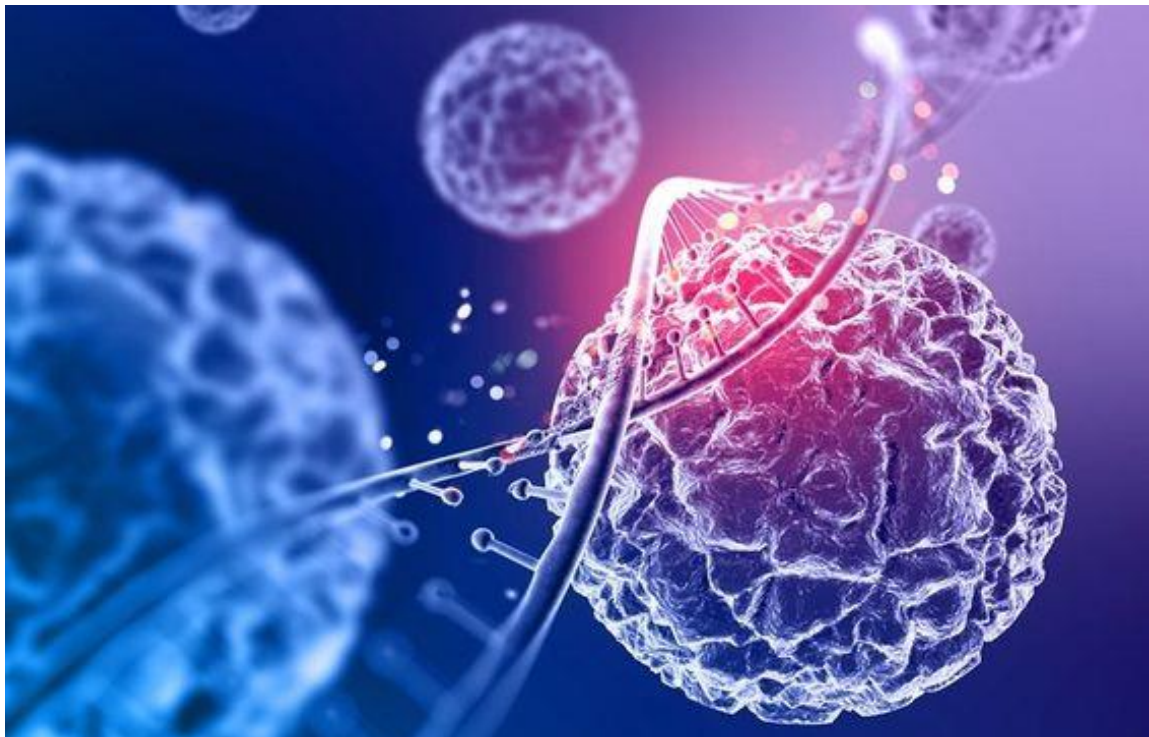
UNIVERSITY OF WEST ATTICA
FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES



Section of Medical Laboratories

DISSERTATION

The use of virus vectors in the context of gene therapy



Student Name (C.N.)

Palaska Rigoula (19678229)

Name of Supervisor

Dr. Anna Kolliopoulou

Athens, 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Άννα Κολλιοπούλου** Ακαδημαϊκή Υπότροφος, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
- Απόστολος Μπελούκας** Αναπληρωτής Καθηγητής, Αντιπρόεδρος Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών, Διευθυντής του Εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας και Ανοσολογίας, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής
- Χρυσάνθη Βογιατζάκη** Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Τομέας Ιατρικών Εργαστηρίων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

EXAMINATION COMMITTEE MEMBERSHIP

Anna Kolliopoulou Academic Fellow, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica

Apostolos Beloukas Associate Professor, Vice President of the Department of Biomedical Sciences, Director of the Laboratory of Molecular Microbiology and Immunology, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica

Chrysanthi Voyiatzaki Assistant Professor, Department of Biomedical Sciences, Section of Medical Laboratories, University of West Attica

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογράφουσα ΠΑΛΑΣΚΑ ΡΗΓΟΥΛΑ του ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ με αριθμό μητρώου 19678229 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ του Τμήματος ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Παλάσκα Ρηγούλα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου Δρ. Άννα Κολλιοπούλου για την βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Οι συμβουλές και η υποστήριξη της με βοήθησαν να ολοκληρώσω με επιτυχία την εργασία μου και εκτίμησα ιδιαίτερα τον χρόνο και την προθυμία της να απαντήσει στα ερωτήματά μου και να με καθοδηγήσει προς τις σωστές πηγές πληροφοριών. Εκτίμησα επίσης την αφοσίωση και την ανοιχτή συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Η ποιότητα της δουλειάς μου βελτιώθηκε σημαντικά χάρη στην σταθερή υποστήριξη και συμβουλές. Ευχαριστώ και πάλι για όλα και ελπίζω να έχουμε την ευκαιρία να συνεργαστούμε ξανά στο μέλλον.

Φυσικά θέλω επίσης να ευχαριστήσω και τα αξιότιμα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής τον κ. Μπελούκα Απόστολο και την κα. Βογιατζάκη Χρυσάνθη. Είναι μεγάλη μου τιμή και χαρά που δέχθηκαν να αξιολογήσουν τη Διπλωματική μου Εργασία.

Παλάσκα Ρηγούλα
29 /09/2023

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAV: Adeno-Associated Viruses, Αδενο-Σχετιζόμενοι Ιοί

AB: Amyloid-B, Αμυλοειδές

AcMNPV: Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus, Πολλαπλός Νουκλεοπολυεδρικός Ιός Autographa californica

AD: Alzheimer Disease, Νόσος Αλτσχάιμερ

ADA-SCID: Adenosine Deaminase Deficiency of Severe Combined Immunodeficiency, Ανεπάρκεια Απαμινάσης Αδενοσίνης Σοβαρής Συνδυασμένης Ανοσοανεπάρκειας

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome, Σύνδρομο Επίκτητης Ανοσοανεπάρκειας

ApoE: Apolipoprotein E, Απολιποπρωτεΐνη E

ASPA: Aspartoacylase, Γονίδιο Ασπαρτοακυλάσης

AVs: Adenoviruses, Αδενοϊοί

BAACD: Aromatic L-amino Acid Decarboxylase Deficiency, Έλλειψη Αποκαρβοξυλάσης Αρωματικών L-Αμινοξέων

BEVS: Baculovirus Expression Vector System, Σύστημα Έκφρασης Βακουλοϊών

BV: Budded Virions, Εκβλαστημένα Ιοσωμάτια

BCC: *Burkholderia cepacia*

BMD: Becker Muscular Dystrophy, Μυϊκή Δυστροφία Becker

B2F: Bac-2-the-Future, Σύστημα «πίσω στο Μέλλον»

CD: Canavan-Disease, Νόσος Canavan

CAR: Chimeric Antigen Receptor, Χιμαιρικός Υποδοχέας Αντιγόνου

CAS9: CRISPR-Associated Protein 9, Πρωτεΐνη 9 Που Σχετίζεται Με Το Σύστημα CRISPR

CF: Cystic Fibrosis, Κυστική Ίνωση

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, Διαμεμβρανικός Ρυθμιστής Αγωγιμότητας Κυστικής Ίνωσης

CGD: Chronic-Granulomatous-Disease, Χρόνια κοκκιωματώδης Νόσος

DGC: Dystrophin-Glycoprotein Complex, σύμπλοκο δυστροφίνης-γλυκοπρωτεΐνης

DMD: Duchenne-Muscular-Dystrophy, Μυϊκή Δυστροφία Duchenne

EMA: European-Medicine-Agency, Ευρωπαϊκή Ιατρική Υπηρεσία

EBV: Epstein - Barr virus, ιός Epstein-Barr

ESCs: Embryonic Stem Cells, εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα

FGFR-1: Fibroblast Growth Factor Receptor, Υποδοχέας Του Αυξητικού Παράγοντα Ινοβλαστών

FDA: Food and Drug Administration, Οργανισμός Τροφίμων Και Φαρμάκων

GAD: Glutamate Decarboxylase, Αποκαρβοξυλάση Γλουταμικού Οξέος

G-CSF: Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor, Παράγοντας Διέγερσης Αποικίας Κοκκιοκυττάρων

GDNF: Cell Line-Derived Neurotrophic Factor, Νευροτροφικός Παράγοντας Προερχόμενος από Κυτταρική Σειρά

G6PD: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, Αφυδρογονάση 6-φωσφορικής Γλυκόζης

HMBG2: High-Mobility Group Protein B2, Πρωτεΐνη B2 Υψηλής Κινητικότητας

HR: Homologous Recombination, Ομόλογος ανασυνδυασμός

HIV: Human Immunodeficiency Virus, Ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας

HBV: Hepatitis B Virus, ιός ηπατίτιδας B

hESCs: Human Embryonic Stem Cells, Ανθρώπινα Εμβρυϊκά Βλαστοκύτταρα

IN: Integrase, Ιντεγκράση

ITR: Inverted Terminal Repeat, Ανεστραμμένη Τερματική Επανάληψη

iPSCs: Induced Pluripotent Stem Cells, Επαγόμενα Πολυδύναμα Βλαστικά Κύτταρα

LTRs: Long Terminal Repeats, Μακριές Τερματικές Επαναλήψεις

LVs: Lentiviruses, Δεντοϊοί

LNPs: Lipid-based Nanoparticles, Νανοσωματίδια Λιπιδίων

mAbs: Monoclonal Antibodies, Μονοκλωνικά Αντισώματα

MD: Muscular Dystrophy, Μυϊκή Δυστροφία

MLV: Murine Leukemia Virus, Ιός Της Λευχαιμίας Των Ποντικών

mRNA: Messenger RNA, Αγγελιοφόρο RNA

NADPO: Nicotinamide Adenine Dnucleotide Phosphate Oxidase, Φωσφορική Οξειδάση Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

NIH: National Institute Of Health, Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας

NES1: Epithelial Cell Specific 1, Ειδικό Γονίδιο-1 των Φυσιολογικών Επιθηλιακών Κυττάρων

NTN: N-terminal nucleophile, N-τελικό Πυρηνόφιλο

ODV: Occlusion-Derived Virions, Έγκλειστα Ιοσωμάτια

ORF: Open Reading Frame, Ανοιχτό Πλαίσιο Ανάγνωσης

PA: Rheumatoid-Arthritis, Ρευματοειδής αρθρίτιδα

PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells, Μονοπύρρηνα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος

PD: Parkinson-Disease, Νόσος Πάρκινσον

PFU: Plaque-Forming Unit, Μονάδες Σχηματισμού Πλάκας

PR: Reverse Protease, Πρωτεάση HIV

rAAV: Recombinant AAV, Ανασυνδυασμένος AAV

RD: Replication-Defective, Ελαττωματικό ως προς την Αντιγραφή

RNA: Ribonucleic Acid, Ριβονουκλεϊκό Οξύ

RNP: Ribonucleoprotein, Ριβονουκλεοπρωτεϊνικό

RP: Retinitis-Pigmentosa, Μελαγχρωστική αμφιβληστροειδίτιδα

RPE65: Retinal Pigment Epithelium-specific, Χρωστική Ειδική για το Επιθήλιο

RT: Reverse Transcriptase, Αντίστροφη Μεταγραφή

SCID: Severe Combined Immunodeficiency, Σοβαρή Συνδυασμένη Ανοσοανεπάρκεια

ScAAV: Self-Complementary Adeno-Associated Virus, Αυτο-συμπληρωματικός Αδενο-σχετιζόμενος Ιός

SMA: Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία, Spinal-Muscular-Atrophy

SMN: Spinal-Muscular-Neuron, Νωτιαίος Μυϊκός Νευρώνας

TXTL: Cell-Free Transcription-Translation, Αντιγραφή-Μετάφραση ανεξάρτητη Κυττάρων

VLPs: Virus-Like Particles, Ιόμορφα Σωματίδια

VSV-G: Vesicular Stomatitis Virus-Glycoprotein, γλυκοπρωτεΐνη του φακέλου του ιού της φουσαλιδώδους στοματίτιδας

WAAR: World Alliance Against Antibiotic Resistance, Παγκόσμια Συμμαχία κατά της Αντίστασης στα Αντιβιοτικά

XLMTM: X-Linked-Myotubular-Myopathy, Μυοσωληναριακή Μυοπάθεια συνδεδεμένη με το χρωμόσωμα X

X-SCID: X-linked Severe Combined Immunodeficiency, βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια συνδεδεμένη με το χρωμόσωμα X

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	1
EXAMINATION COMMITTEE MEMBERSHIP	2
ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1.Γονιδιακή θεραπεία: Από την ιδέα στην πραγματικότητα	16
1.1.1.Εισαγωγικά στοιχεία.....	16
1.1.2. Γονιδιακή μεταφορά: Η ιδέα της επιδιόρθωσης μιας γενετικής διαταραχής με την εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου.....	17
1.1.3. Οι πρώτες εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας και η ανάγκη εύρεσης κατάλληλων φορέων μεταφοράς του θεραπευτικού γονιδίου	18
1.1.4. Οι πρώτοι εγκεκριμένοι ιικοί φορείς με κλινική εφαρμογή.....	19
1.1.4.1. Όγκο-ρετροϊικοί φορείς που προήλθαν από λευχαιμία.....	19
1.1.4.2. Αδενοϊοί που εκφράζουν τον άγριο τύπο-ρ53	20
1.1.5. Η ανακάλυψη των βακτηριοφάγων	21
1.1.5.1. Οι πρώτες κλινικές δοκιμές και η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των φάγων	21
1.1.6. Ανάπτυξη φορέων με ικανότητα γενετικής επιδιόρθωσης	22
ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
2.1. Κατηγοριοποίηση ιικών φορέων	28
2.1.1. Αδενο-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς (AAV, Adeno-Associated Viruses).....	28
2.1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	28
2.1.1.2. Γονιδιωματική βάση του ιού	29
2.1.1.3. Πρωτεϊνική σύσταση του ιού	31
2.1.1.4. Ταξινόμηση AAV φορέων.....	33
2.1.2. Ρετροϊοί	39
2.1.2.1. Η γονιδιακή δομή του ιού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του	39
2.1.2.2. Κύκλος πολλαπλασιασμού και εισαγωγή του ιού στα κύτταρα	40
2.1.2.3. Κατηγοριοποίηση ρετροϊών με βάση τη θεραπευτική τους δράση	41
2.1.3. Αδενοϊοί (Adenovirus, Ad)	47
2.1.3.1. Γενική περιγραφή του ιού	47

2.1.3.2. Παραγωγή αδενοϊκών φορέων και θεραπευτικές χρήσεις τους	48
2.1.4. Βακουλοϊοί.....	49
2.1.4.1. Η δομή των βακουλοϊών και η είσοδός τους με τη μεσολάβηση του ιικού υποδοχέα GP64 σε κύτταρα θηλαστικών	49
2.1.4.3. Βακουλοϊοί ως συστήματα παράδοσης γονιδίων.....	50
2.1.5. Βακτηριοφάγοι	54
2.1.5.1. Δομή γονιδιώματος	54
2.1.5.2. Αντιγραφή	55
2.1.5.3. Η Λοιμογόνος δράση των βακτηριοφάγων	56
2.1.5.4. Ιογενής φαγοθεραπεία για την καταπολέμηση παθογόνων βακτηριακών λοιμώξεων	57
2.2. Μέθοδοι επεξεργασίας του γενετικού υλικού	59
2.2.1. Γονιδιωματική επεξεργασία με το σύστημα CRISPR/Cas9 τύπου II	59
2.2.1.1. Παράδοση συστατικών στοιχείων του συστήματος CRISPR/Cas9 με τη χρήση ιικών φορέων	59
2.3. Η προσέγγιση της γονιδιακής θεραπείας για την παράδοση θεραπευτικών γονιδίων ...	60
2.3.1. Ex vivo παράδοση.....	60
2.3.2. In vivo παράδοση.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	62
3.1. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ.....	63
3.1.1. AAV (αδενο-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς).....	63
3.1.1.1. Νευρομυϊκές διαταραχές.....	63
3.1.1.2. Αιμορροφιλία B.....	67
3.1.1.3. Νοσήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος.....	69
3.1.1.3. Κληρονομική μελαγχρωστική αμφιβληστροειδίτιδα.....	73
<i>(Retinitis-Pigmentosa ή RP)</i>	73
3.1.1.4. Περαιτέρω κλινικές εφαρμογές της in vivo γονιδιακής θεραπείας με AAVs	74
3.1.2. Ρετροϊοί	74
3.1.2.1. Λεντοϊκοί φορείς	75
.....	84
3.1.3. Αδενοϊοί.....	84
3.1.3.1. Πειραματικές κλινικές εφαρμογές έναντι του καρκίνου	84
3.1.3.2. <i>Λοιπές εφαρμογές των αδενοϊών στη γονιδιακή θεραπεία</i>	86
3.1.4. Βακουλοϊοί	88
3.1.5. Βακτηριοφάγοι.....	90
3.1.5.1. Βακτηριακή αντοχή και ανάγκη εφαρμογής της φαγοθεραπείας.....	90

3.1.5.3. Βακτηριοφάγοι ως φορείς παράδοσης θεραπευτικών γονιδίων	92
3.1.5.5. Τελευταίες εξελίξεις	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
4.1. Προκλήσεις μεθόδων γονιδιακής θεραπείας που βασίζονται σε ιικούς φορείς	101
4.1.1. Πεδία που αναμένονται μελλοντικές βελτιώσεις	103
4.1.1.1. Το μέλλον για τους φορείς AAV	104
4.1.1.2. Προκλήσεις στη χρήση των AAV	106
4.1.2.1. Το μέλλον για τους λεντοϊκούς φορείς	107
4.1.2.2. Μειονεκτήματα χρήσης των λεντοϊκών φορέων	108
4.1.3. Περαιτέρω χρήση ιικών φορέων στη γονιδιακή θεραπεία	108
4.1.3.1. Αδενοϊοί.....	108
4.1.3.2. Βακυλοϊοί	109
4.1.3.3. Βακτηριοφάγοι.....	109
4.1.3. Το μέλλον της θεραπείας με φάγους.....	110
4.2. Ηθικοί προβληματισμοί	111
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	113
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	116
ABSTRACT.....	118
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	120

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.Γονιδιακή Θεραπεία: Από την ιδέα στην πραγματικότητα

1.1.1.Εισαγωγικά στοιχεία

Με την ανακάλυψη του DNA στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, που οδήγησε στο χαρακτηρισμό του ως μονάδα κληρονομικότητας του γενετικού υλικού του ανθρώπου, οι επιστήμονες επιδίωξαν με πειραματικές μεθόδους να ανακαλύψουν τις περαιτέρω δυνατότητές του. Όπως ταυτοποιήθηκε και από τους ίδιους τους επιστήμονες της εποχής, το DNA αποτελεί το μόριο-κλειδί για το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας, σύμφωνα με το οποίο το DNA μεταγράφεται σε RNA και το RNA μεταφράζεται σε πρωτεΐνες (Zhao et al., 2020). Με το πέρασμα των χρόνων δεν άργησε να έρθει και η ανακάλυψη εργαλείων μοριακής βιολογίας, τα οποία υπήρξαν πρωταρχικής σημασίας για τις πρώτες παρεμβατικές αλλαγές στο DNA και τη δημιουργία της γονιδιακής θεραπείας. Ειδικότερα, η ιδέα της γονιδιακής θεραπείας σχεδιάστηκε αρχικά το 1972 και υλοποιήθηκε από τον Martin Cline το 1980 στα πλαίσια της θεραπείας της β-θαλασσαιμίας. Αυτή η πρώτη προσπάθεια για μια ex-vivo γονιδιακή θεραπεία αν και υπήρξε πρωτοποριακή για εκείνη την εποχή ήταν τελικά ανεπιτυχής (Sun, 1981). Όμως οι προσπάθειες ενσωμάτωσης ενός φυσιολογικού αντιγράφου του γονιδίου δεν σταμάτησαν εκεί. Οι πολλαπλές προσπάθειες για επεξεργασία και ενσωμάτωση γονιδίων έφεραν στο φως τη χρήση των πλασμιδίων ως φορέων ενσωμάτωσης φυσιολογικών γονιδίων, η οποία δημιούργησε μια νέα εποχή στον τομέα της γενετικής.

Παράλληλα με τις συνεχόμενες κλινικές εφαρμογές σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού, ήρθε στο φως η δυνατότητα των ομόλογων μορίων DNA να μπορούν να ανασυνδυάζονται και να εισάγονται σε καθορισμένες χρωμοσωμικές θέσεις σε γονιδιώματα θηλαστικών (Smithies, 2015). Αυτή αποτέλεσε την πρώτη επιτυχή μεταφορά γονιδίων σε άλλους οργανισμούς. Στη συνέχεια ακολούθησαν περαιτέρω κλινικές μελέτες υψίστης σημασίας. Σε κλινική δοκιμή, που πραγματοποιήθηκε το 1974, αποδείχθηκε η ενσωμάτωση και η παραμονή του DNA του ιού Polyoma SV40 στο DNA υγιούς ενήλικου ποντικού μετά από μικροέγχυση στο στάδιο της βλαστοκύστης (Jaenisch & Mintz, 1974). Όλα τα παραπάνω λειτούργησαν καθοριστικά και εισήγαγαν καινοτόμες τεχνολογίες γενετικής τροποποίησης. Τέτοιες τεχνικές είναι η εξάλειψη γονιδίων (knock out) με ομόλογο ανασυνδυασμό σε εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (Embryonic Stem Cells, ES) και η ανάπτυξη του συστήματος τοποειδικού ανασυνδυασμού Cre/Lox. Αυτές επέτρεψαν τη διερεύνηση της λειτουργίας χιλιάδων γονιδίων (Sauer, 1987) και έδωσαν τη δυνατότητα στους επιστήμονες να χειρίζονται πλέον τα γονίδια με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, σε συγκεκριμένα όργανα ή σε πολλαπλά συστήματα οργάνων καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των οργανισμών.

1.1.2. Γονιδιακή μεταφορά: Η ιδέα της επιδιόρθωσης μιας γενετικής διαταραχής με την εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου

Στις αρχές του 1950, ο Stanfield Rogers και οι συνάδελφοί του στο Τμήμα Βιολογίας του Εθνικού Εργαστηρίου Oak Ridge στο Τενεσί μελετούσαν τις ιδιότητες του ιού των θηλωμάτων Shope (Friedmann, 2001). Ο συγκεκριμένος ιός ήταν γνωστό ότι προκαλεί κονδυλώματα όταν εφαρμοστεί τοπικά στο δέρμα κουνελίων. Στα τέλη της δεκαετίας του 1950 ο Rogers και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η μόλυνση του δέρματος του κουνελιού με τον ιό είχε ως αποτέλεσμα στην εμφάνιση μιας ενεργότητας θερμοσταθερής αργινάσης με ανοσολογικές και κινητικές ιδιότητες διαφορετικές από αυτές της ηπατικής αργινάσης (Lemonie et al., 1968). Συνεπώς θεωρήθηκε ότι ο ιός Shope είναι ικανός να προκαλέσει ενεργότητα αργινάσης (ένζυμο που καταλύει το τελικό στάδιο του κύκλου της ουρίας και μετατρέπει την τοξική για τον οργανισμό αμμωνία σε ουρία) σε μολυσμένα κύτταρα, αλλά και ότι τα αυξημένα επίπεδα αργινάσης πιθανώς να αντανάκλουν μια αύξηση στη σύνθεση, τη σταθερότητα ή την κατανομή ισοενζύμων του μόνιμου κυτταρικού ενζύμου και όχι ενός ιού. Η προφανής ερμηνεία αυτών των μελετών ήταν ότι ο ιός Shope ήταν ικανός να εισάγει ένα νέο ένζυμο αργινάσης που κωδικοποιείται από τον ιό σε μολυσμένα κύτταρα και ότι η έκφραση του νέου γονιδίου, όπως αποδείχθηκε, ήταν μακροπρόθεσμη. Το συγκεκριμένο μοντέλο θα μπορούσε επομένως να αφομοιωθεί και να χρησιμοποιηθεί και από άλλους ιικούς φορείς και να εισάγουν άλλα, και δυνητικά θεραπευτικά, είδη «ξένων» γενετικών πληροφοριών σε κύτταρα θηλαστικών και όχι μόνο (Mossman et al., 1995). Στη θεωρία, μπορεί κανείς να χρησιμοποιήσει πληροφορίες που είτε αποτελούν εγγενώς μέρος του ιού, είτε ως αποτέλεσμα σύνθεσης στο εργαστήριο, όπου γίνεται η σύνδεση με κάποιο ιικό νουκλεϊκό όξυ, με τον ιό να είναι ο φορέας, είτε μεταβιβάζονται από άλλα γονιδιώματα.

Με βάση τις παρατηρήσεις του Rogers, ξεκίνησαν μελέτες σχετικά με τρόπους με τους οποίους ένα φυσικά απαντώμενο ιικό γονιδίωμα του ιού Shope θα μπορούσε να τροποποιηθεί σκόπιμα με σκοπό να επιτρέψει στον ιό να δράσει ως φορέας για να εισάγει στον επιλεγόμενο οργανισμό ένα νέο θεραπευτικό γονίδιο (Friedman-Kien et al., 1976). Μετά από αρκετές κλινικές μελέτες ο Rogers και οι συνεργάτες του κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μπορούν να ενσωματωθούν *in vitro* στο RNA του ιού ο οποίος στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί ως φορέας για τη μετάδοση της επιθυμητής ιδιότητας. Όταν πλέον έγινε γνωστό ότι τόσο το RNA όσο και το DNA των ιών μπορούν να αντιγράφονται *in vitro*, το επόμενο βήμα ήταν η δημιουργία ενός τροποποιημένου ιού που θα εκφράζει το ενσωματωμένο επιθυμητό γονίδιο, η αναπαραγωγή του στην ποσότητα που απαιτείται και η χρήση του για τη μετάδοση της πληροφορίας.

1.1.3. Οι πρώτες εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας και η ανάγκη εύρεσης κατάλληλων φορέων μεταφοράς του θεραπευτικού γονιδίου

Όπως είναι γνωστό, μια γενετική ασθένεια έχει ως υπόβαθρο τη μεταλλαγή της αλληλουχίας του φυσιολογικού DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη φυσιολογικών γονιδίων. Η γονιδιακή θεραπεία έχει ως στόχο τη παράδοση του φυσιολογικού γονιδίου σε άτομα με γενετικές διαταραχές. Η γονιδιακή θεραπεία, προκειμένου να παρέχει τα μη μεταλλαγμένα αντίγραφα αυτών των γονιδίων, χρησιμοποιεί ειδικούς ιούς (Athanasopoulos et al., 2017).

Συνεπώς κρίθηκε αναγκαίο να βρεθούν οι κατάλληλες μέθοδοι μέσω των οποίων οι επιστήμονες θα κατασκεύαζαν τους κατάλληλους φορείς. Για να αποτελέσει ένα είδος ιού ιδανικός φορέας για την παράδοση γονιδίων θα πρέπει να παρέχει: υψηλή χωρητικότητα ωφέλιμου φορτίου, τροπισμό για την εξειδίκευση με διαφορετικούς τύπους κυττάρων-στόχων, υψηλή μεταγωγική αποτελεσματικότητα, ελάχιστη ή και μηδαμινή κυτταροτοξικότητα και γονοτοξικότητα και πρόκληση ελάχιστης ανοσολογικής απόκρισης (Smith et al., 2017). Η ολοκληρωμένη και σαφής κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μηχανισμών έφερε γρήγορα την ανάπτυξη εξαιρετικά εξελιγμένων εργαλείων μεταφοράς γονιδίων με βέλτιστη ασφάλεια και κυρίως θεραπευτική αποτελεσματικότητα.

Στις αρχές του '90 έγινε η πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια γονιδιακής θεραπείας με τη χρήση ιικών φορέων, με επικεφαλής τους French Anderson, Michael Blaese και Steven Rosenberg. Η διαδικασία που ακολούθησαν βασιζόταν στην *ex vivo* θεραπεία ασθενούς που έπασχε από τη ανεπάρκεια Απαμινάσης Αδενοσίνης Σοβαρής Συνδυασμένης Ανοσοανεπάρκειας ADA-SCID (Adenosine deaminase deficiency of severe combined immunodeficiency), η οποία είχε ως αποτέλεσμα την έλλειψη απαμινάσης της αδενοσίνης (ADA) (Sung-Yung, 2021). Συγκεκριμένα, στην ασθενή πραγματοποιήθηκαν εγχύσεις T κυττάρων, ενώ ο ιικός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό των κυττάρων ήταν ένας ανασυνδυασμένος ρετροϊός, ο οποίος έφερε το φυσιολογικό γονίδιο ADA (Miller, 1990). Η εκτέλεση του παραπάνω πρωτοκόλλου είχε θεραπευτικά αποτελέσματα και θεωρείται ως η πρώτη επιτυχημένη γονιδιακή θεραπεία στον άνθρωπο. Με τη χρήση των μέχρι τότε γνωστών τεχνικών της γονιδιακής θεραπείας οι επιστήμονες κατόρθωσαν να ενσωματώσουν το γονίδιο για την αλυσίδα κυτοκίνης (η έλλειψη του οποίου είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση της νόσου ADA-SCID) χρησιμοποιώντας ογκο-ρετροϊικούς φορείς. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τα γενετικώς τροποποιημένα κύτταρα να αυξηθούν αριθμητικά και να προκύψει έντονος πολλαπλασιασμός στους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία (Miller, 1990).

1.1.4. Οι πρώτοι εγκεκριμένοι ιικοί φορείς με κλινική εφαρμογή

1.1.4.1. Όγκο-ρετροϊικοί φορείς που προήλθαν από λευχαιμία

Μετά το χαρακτηρισμό των ρετροϊών από βιολογικής άποψης (Varmus, 1988; Temin and Mizutani, 1970), κατέστη σαφές ότι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς για την ενσωμάτωση και την έκφραση ενός διαγονιδίου σε κύτταρα-στόχους. Συνεπώς οι ογκο-ρετροϊικοί φορείς αποτέλεσαν την επιλογή των επιστημόνων της εποχής. Η πρώτη γενετική τροποποίηση ιικού γονιδιώματος πραγματοποιήθηκε το 1970 όταν οι Rogers και Pfuderer πρότειναν την εισαγωγή φυσιολογικού DNA με τη χρήση ικών φορέων (ογκο-ρετροϊικοί φορείς που προέρχονται από λευχαιμία), με σκοπό την αντικατάσταση του ελαττωματικού γενετικού υλικού σε άτομα που υποφέρουν από γενετικές αλλαγές (Mohammadi et al., 2018). Οι ρετροϊικοί φορείς επιλέχθηκαν επειδή ήταν οι πρώτοι που αναλύθηκαν πλήρως, ενώ μελέτες έδειξαν ότι η αλληλουχία αυτών των ιών ήταν η βέλτιστη ώστε να παραχθούν ρετροϊοί ικανοί να αναπαράγονται χωρίς να προκαλούν μεταλλαξιγένεση, που εκείνη την εποχή θεωρούνταν ο μεγαλύτερος κίνδυνος. Ακόμη το μοτίβο ενσωμάτωσης των ογκορετροϊών στη γονιδιακή θεραπεία αναμενόταν να είναι τυχαίο (Sung-Yung, 2021), συνεπώς και οι ρετροϊοί αναμενόταν να στοχεύουν κυρίως σε μη κωδικοποιητικές περιοχές του γονιδιώματος.

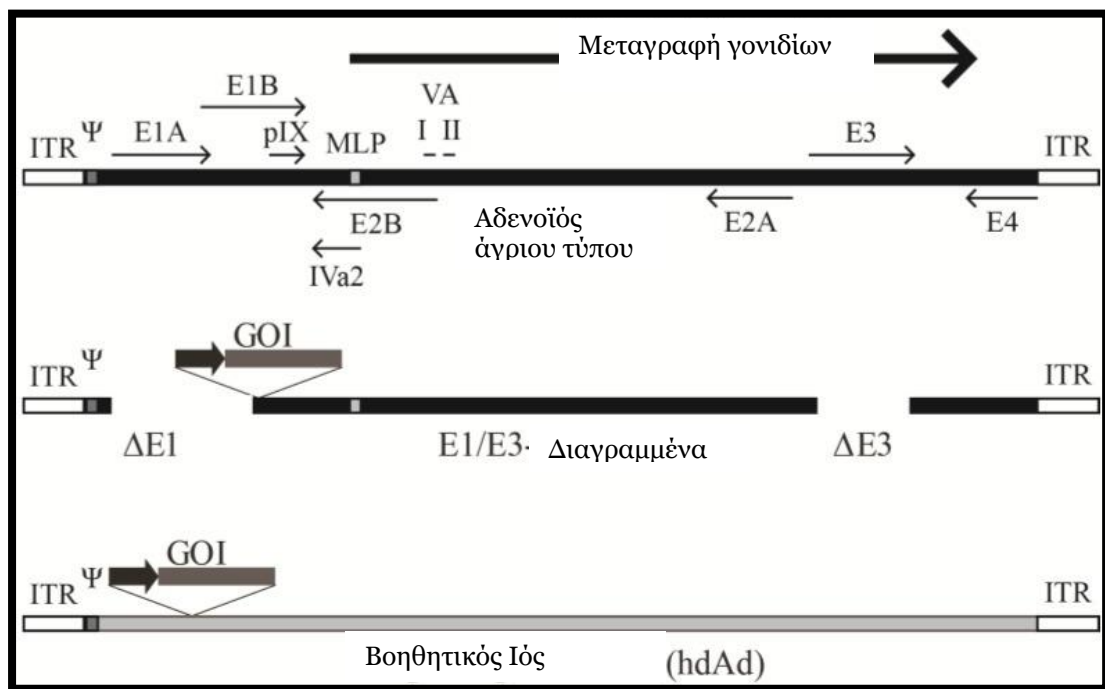
Η νόσος που επιλέχθηκε να δράσουν ως φορείς ήταν η SCID (Cossu, 2010), καθώς εκείνη την εποχή είχαν εντοπιστεί τα γονίδια που σχετίζονταν με τη νόσο, η παθοφυσιολογία της νόσου ήταν πιο ξεκάθαρη σε σύγκριση με άλλες γενετικές διαταραχές και, το πιο σημαντικό, τα πρωτόκολλα κυτταρικής μεταγωγής είχαν βελτιωθεί, γεγονός που οδήγησε στα πρώτα θεραπευτικά αποτελέσματα.

Μετά τη θεραπεία έγιναν περαιτέρω εξετάσεις για να εξακριβωθεί η χρονική διάρκεια των αποτελεσμάτων και οι επιπτώσεις της θεραπείας στον ανθρώπινο οργανισμό. Περαιτέρω εξετάσεις που βασίζονταν στους ογκο-ρετροϊικούς φορείς έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική ανασύσταση του ανοσοποιητικού συστήματος με την πάροδο του χρόνου σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία. Βέβαια, παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα, εμφανίστηκε λευχαιμία που σχετιζόταν με τους φορείς (Hacein-Bey et al., 2008). Συμπερασματικά, η γονιδιακή θεραπεία κρίθηκε επιτυχής και διόρθωσε τις βλάβες των T κυττάρων, όμως αναφορικά με τα κύτταρα φυσικούς φονείς και τα B κύτταρα, οι βλάβες τους αποκαταστάθηκαν μόνο εν μέρει, πιθανότατα λόγω απουσίας θεραπευτικής αγωγής (Cossu, 2010).

1.1.4.2. Αδενοϊοί που εκφράζουν τον άγριο τύπο-ρ53

Ο φυσικός τύπος αδενοϊού, στον οποίο συμπεριλαμβάνεται και ο ανθρώπινος αδενοϊός τύπου ρ53, σχετίζεται με μερικές ήπιες διαταραχές, όπως λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού οι οποίες θεωρούνται αυτοπεριοριζόμενες. Από όλους τους ορότυπους, ο τύπος 53 είναι από τους πιο εκτενώς μελετημένους (Yamashita et al., 1999). Ήδη από τις αρχές της δεκαετίας του 1920 υπήρχαν επαρκείς γνώσεις σχετικά με τη βιολογία του ιού, τις κυτταρικές διεργασίες του και την αλληλεπίδρασή του με το αντίστοιχο κύτταρο-ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης. Η πολύ καλή κατανόηση του ιού τον έκανε ιδανικό για την παράδοση των φυσιολογικών γονιδίων στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας. Μετά την επιτυχή τους χρήση στα πλαίσια κλινικών δοκιμών, θεωρήθηκαν αποτελεσματικοί στην παράδοση γονιδίων σε κύτταρα θηλαστικών προκειμένου να επιτευχθεί έκφραση διαγονιδίων σε υψηλά επίπεδα.

Κατά τη γενετική τροποποίηση των πρώτων αδενοϊών έγινε απαλοιφή της βασικής πρώιμης περιοχής 1 (E1), η οποία καθιστά αυτούς τους φορείς μη ικανούς προς αναπαραγωγή στις περισσότερες κυτταρικές σειρές (Qualikene et al., 1995). Τα αποτελέσματα των πρώτων κλινικών δοκιμών έδειξαν ότι οι αδενοϊοί από τους οποίους είχε απαλειφθεί το τμήμα E1 είναι κατάλληλοι για θεραπεία όταν απαιτείται βραχυπρόθεσμη έκφραση του διαγονιδίου *in vitro* και *in vivo*. Σε ορισμένες μελέτες δείχθηκε ότι η αφαίρεση του τμήματος E1 από τον αδενοϊό άγριου τύπου, που προκάλεσε μείωση του συνολικού μεγέθους του γονιδιώματος του από 36 σε 30kb, είχε ως αποτέλεσμα η έκφραση του ιού να επιτυγχάνεται στα επιθυμητά όρια, και αυτή η ανακάλυψη αποτέλεσε στη συνέχεια το δόγμα για τη δημιουργία πιο αποτελεσματικών ιικών φορέων (Yamashita et al. 1999) **(Εικόνα 1)**.



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του γονιδιώματος του αδενοϊού και διαφόρων αδενοϊκών φορέων. Στο πάνω μέρος εικόνας: φαίνεται το γονιδίωμα Ad5 (όχι σε κλίμακα). Οι γενετικές περιοχές σημειώνονται ως E1-E4 μαζί με το μεγάλο μεταγραφικό τμήμα, πλήρους μήκους, όπου μεταγράφονται και παράγονται οι πρωτεΐνες L1-L5, με εναλλακτικής συρραφής [Προσαρμογή από (Yamashita et al., 1999)].

1.1.5. Η ανακάλυψη των βακτηριοφάγων

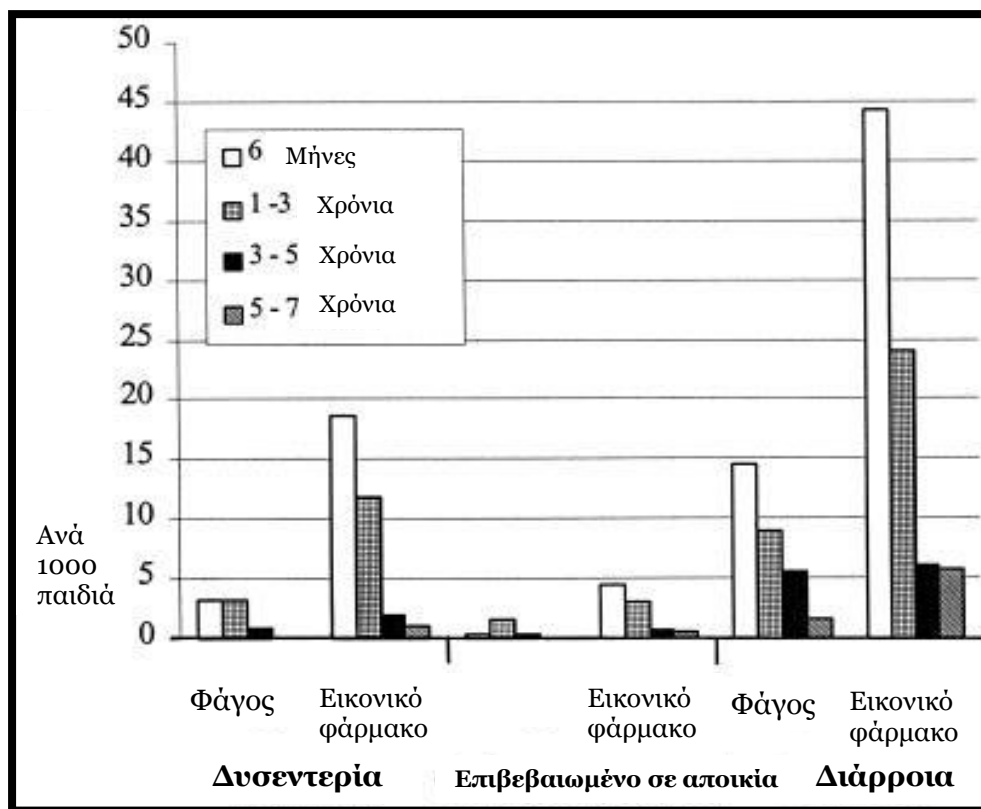
1.1.5.1. Οι πρώτες κλινικές δοκιμές και η θεραπευτική αποτελεσματικότητα των φάγων

Οι φάγοι ανακαλύφθηκαν το 1896 όταν ο Ernest Hanbury Hankin ανέφερε ότι στα νερά των ποταμών Γάγγη και Jumna της Ινδίας υπήρχε ένας παράγοντας με αντιβακτηριακή δράση. Πρότεινε ότι μια τότε άγνωστη ουσία ευθυνόταν για τη δράση ενάντια στη χολέρα και για την εν γένει θεραπευτική δράση. Από το 1898 έως το 1918, αρκετοί επιστήμονες έκαναν παρόμοιες παρατηρήσεις και υποθέσεις σχετικά με το φαινόμενο των βακτηριοφάγων (Harada et al., 2018). Ωστόσο, το 1914 ένας άλλος Βρετανός βακτηριολόγος, ο Frederick Twort, πρότεινε ότι το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται σε έναν ιό. Το 1917 ο d'Herelle άρχισε να πραγματοποιεί δοκιμές με τη χρήση φάγων σε ασθενείς. Υπό την επίβλεψη του καθηγητή Οι παραπάνω κλινικές δοκιμές έγιναν υπό την επίβλεψη των Victor-Herni Hutinel στο Hospital des Enfants-Malades στο Παρίσι, και σχετίζονται με την κατάπωση των φάγων. Μετά από λίγες μέρες αποδείχθηκε η αποτελεσματικότητά τους κατόπιν χορήγησης φάγων σε 12χρονο αγόρι που έλασχε από σοβαρή δυσεντερία, με τα συμπτώματα να σταματούν μετά από μία μόνο θεραπεία και τον ασθενή να οδηγείται σε πλήρη ανάρρωση. Στη συνέχεια, ο ίδιος φάγος χορηγήθηκε σε τρεις ακόμα ανθρώπους, με όλους να επιδεικνύουν σημάδια ανάρρωσης μέσα σε 24 ώρες από τη θεραπεία με τους φάγους (Summers, 2017). Ακόμα, δύο γιατροί από το Κολλέγιο Ιατρικής του Πανεπιστημίου Baylor το 1923 στις Ηνωμένες Πολιτείες, ανέφεραν επιτυχή αποτελέσματα σε μια από τις θεραπευτικές δοκιμές με φάγους που και κατέληξαν στο βασικό συμπέρασμα ότι οι βακτηριοφάγοι έχουν τεράστιες δυνατότητες ως ένα νέο όπλο για την καταπολέμηση μολυσματικών ασθενειών (Golkar et al., 2014) (**Εικόνα 2**).

Όπως φαίνεται, οι φάγοι αποτέλεσαν αντιβακτηριακό παράγοντα, ο οποίος μετά τις επιτυχημένες κλινικές δοκιμές εμφάνισε πολλές προοπτικές για την καταπολέμηση ασθενειών. Μετά από γενετική τροποποίηση, οι ερευνητές ανέπτυξαν γενετικά μετασχηματισμένους φάγους (Gibb et al., 2021). Η τροποποίηση αφορούσε την προσθήκη γονιδίων έναντι βακτηριακών μηχανισμών αντοχής με στόχο μια έντονη αντιβακτηριακή δράση μετά την μόλυνσή των βακτηρίων από τον αντίστοιχο φάγο. Ειδικότερα, ενσωμάτωσαν γονίδια στο γενετικό υλικό των φάγων που είναι υπεύθυνα για τη λύση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, για την έκφραση ενζύμων που

διασπούν τα βιοϋμένια (βιοφίλμ) και για συγκεκριμένες δομικές πρωτεΐνες των φάγων.

Η επίδραση των βακτηριοφάγων στις γενετικές ιδιότητες των βακτηρίων-ξενιστών, και ιδιαίτερα στη μεταφορά ξένων γενετικών πληροφοριών σε αυτά, είχε ήδη γίνει σαφής, όταν άρχισαν να εμφανίζονται προτάσεις για επέκταση της εφαρμογής αυτού του τύπου γενετικού ελέγχου σε ανώτερους οργανισμούς (Gibb et al., 2021).



Εικόνα 2: Συχνότητα εμφάνισης κλινικής δυσεντερίας. Η συχνότητα εμφάνισης της κλινικής δυσεντερίας επιβεβαιώνεται με καλλιέργεια του υπεύθυνου βακτηρίου (εκείνη την περίοδο το υπεύθυνο βακτήριο δεν είχε χαρακτηριστεί) σε παιδιά ηλικίας από 6 μηνών έως 7 ετών που έλαβαν αγωγή με φάγους ή που δεν έλαβαν καμία θεραπεία. [Προσαρμογή από (Zhabiz Golkar et al., 2014)].

1.1.6. Ανάπτυξη φορέων με ικανότητα γενετικής επιδιόρθωσης

Οι ιικοί φορείς έχουν παίξει πολύ σημαντικό ρόλο στη γονιδιακή θεραπεία, καθώς είναι αποτελεσματικοί στο να βρίσκουν το δρόμο τους στα κύτταρα, κυρίως λόγω της φυσικής τους ικανότητας να παραδίδουν γονίδια, που ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε γονιδιακής θεραπείας μπορούν να έχουν βραχυπρόθεσμη ή μακροπρόθεσμη δράση (Lukashev et al., 2016). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, ανάλογα με τον τύπο της νόσου, είτε με την μείωση των επιπέδων των επιβλαβών ελαττωματικών γονιδιακών προϊόντων, χρησιμοποιώντας πάντα μοντέρνα και ελεγχόμενα εργαλεία όπως οι ιικοί

φορείς, είτε με τη χορήγηση ενός θεραπευτικού, λειτουργικού γονιδίου ως υποκατάστατο του γονιδίου που λείπει ή του αντίστοιχου ενδογενούς ελαττωματικού γονιδίου. Οι φορείς είναι ουσιαστικά «οχήματα» τα οποία έχουν σχεδιαστεί για να παρέχουν το φυσιολογικό γονίδιο στα κύτταρα του ασθενή που πάσχει από μια γενετική ασθένεια. Η επεξεργασία του γονιδιώματος βρίσκεται στην πρώτη γραμμή, όχι μόνο για να προσφέρει καινοτόμες θεραπευτικές λύσεις αλλά κυρίως για την ανάπτυξη πειραματικών κυτταρικών και ζωικών μοντέλων, απαραίτητων στη μεταφραστική ιατρική (Augusta & Goncalves, 2017). Αν και υπάρχουν πολλά ακόμα που απαιτείται να γίνουν, κυρίως όσον αφορά τα εργαλεία για την *in vivo* παράδοση νουκλεϊκών οξέων και μορίων επεξεργασίας του γονιδιώματος, τα εμπόδια και οι περιορισμοί φαίνεται πως είναι διαχειρίσιμα, δίνοντας ελπίδες για το μέλλον.

ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η ανακάλυψη συστημάτων επεξεργασίας του ανθρώπινου γονιδιώματος ήταν καθοριστική για την καταπολέμηση γενετικών ασθενειών και όχι μόνο. Την ιδέα ότι η εισαγωγή του φυσιολογικού γονιδίου μπορεί να θεραπεύσει ασθένειες, ακολούθησε και η πράξη όπου καθιερώθηκε και επίσημα ο όρος της γονιδιακής θεραπείας.

Η παρούσα εργασία αναλύει αρχικά τη σημασία της γονιδιακής θεραπείας και την ανάγκη εξεύρεσης αποτελεσματικών τρόπων μεταφοράς γονιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό. Εξετάζει τους διάφορους τύπους ιών που χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό, με έμφαση στους αδeno-σχετιζόμενους ιούς και τους λεντοϊούς, και περιγράφει τα πλεονεκτήματα και τους περιορισμούς τους. Ακολούθως, η εργασία επικεντρώνεται στην χρήση των ιών ως φορέων παράδοσης του φυσιολογικού γονιδίου στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας και στην κατανόηση του συστήματος αυτού.

Ο σκοπός αυτής της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση και η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο οι ιοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποδοτικοί μεσολαβητές για τη μεταφορά και την ενσωμάτωση γονιδίων στον ανθρώπινο οργανισμό, με στόχο τη θεραπεία γενετικών ασθενειών. Δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στις γενετικές τεχνικές τροποποίησης των ιών και τους τρόπους χρήσης τους, οι οποίοι, όπως τονίζεται στη συνέχεια, διαφέρουν ανάλογα τόσο με το είδος του ιού όσο και με τη γενετική ταυτότητα της εκάστοτε νόσου. Ένα από τα κύρια θέματα που αναλύονται είναι οι μηχανισμοί μεταφοράς γονιδίων από αυτούς τους ιούς στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού. Ακόμη, εξετάζεται πώς ακριβώς λειτουργούν αυτοί οι ιοί για να μεταφέρουν γονίδια, η διαδικασία ενσωμάτωσής τους και οι αλληλεπιδράσεις με το γενετικό υλικό του ανθρώπου.

Το κυριότερο ζήτημα που πραγματεύεται η μελέτη αυτή είναι η πληθώρα δυνατοτήτων που προσφέρουν οι ιοί στις εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας για την αντιμετώπιση ενός πλήθους ασθενειών με ασφάλεια και ακρίβεια. Αναφέρονται αρκετά παραδείγματα που αποδεικνύουν τη θεραπευτική δράση των ιικών φορέων σε κλινικές εφαρμογές, νευρομυϊκών διαταραχών, διάφορων τύπων καρκίνου, καθώς και τις αιματολογικές και νευρολογικές διαταραχές. Επιπλέον, παρουσιάζονται τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα μέχρι στιγμής, οι προκλήσεις που τα συνοδεύουν και αποκτάται μια σφαιρική εικόνα για τις προοπτικές που παρουσιάζουν οι ιικοί φορείς στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας. Ακόμη, εξετάζονται τα αποτελέσματα και η πρόοδος που έχει σημειωθεί στη θεραπεία αυτών των ασθενειών σε κλινικές δοκιμές, ενώ εξετάζεται και η ασφάλεια της γονιδιακής θεραπείας με ιούς, αντιμετωπίζοντας τις πιθανές προκλήσεις, που αφορούν την ανεπιθύμητη αντίδραση του οργανισμού και την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Τέλος, αναλύονται οι μελλοντικές εξελίξεις στον τομέα, συμπεριλαμβανομένων των τεχνολογιών επεξεργασίας CRISPR σε

συνδυασμό με τις προσδοκίες για την περαιτέρω ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών θεραπειών για γενετικές ασθένειες.

Συνοψίζοντας, αυτή η εργασία αναδεικνύει τη σημασία των ιών ως εργαλείων στην προώθηση της γονιδιακής θεραπείας και τη θεραπεία γενετικών ασθενειών. Παραθέτοντας πλούσιες λεπτομέρειες, σε συνδυασμό με διεξοδική ανάλυση των δεδομένων της βιβλιογραφίας, δίνεται η δυνατότητα για την καλύτερη κατανόηση των μεθόδων εφαρμογής των ιικών φορέων στη γονιδιακή θεραπεία και της επίδρασής τους στην ανθρώπινη υγεία. Κατά συνέπεια, δίνεται ένα έναυσμα για διεύρυνση του φάσματος της ιατρικής έρευνας, ενώ δημιουργούνται εύλογες προσδοκίες για την αντιμετώπιση ασθενειών που συχνά παραμένουν μη αντιμετωπίσιμες από τις συμβατικές θεραπείες. Η γονιδιακή θεραπεία με ιούς αναμένεται να συνεχίσει να εξελίσσεται, προσφέροντας περισσότερες επιλογές για τη θεραπεία γενετικών ασθενειών και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των ατόμων που πάσχουν από αυτές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Κατηγοριοποίηση ιικών φορέων

2.1.1. Αδενο-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς (AAV, Adeno-Associated Viruses)

2.1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί (AAV) ανήκουν στο γένος *Dependovirus* της οικογένειας Parvoviridae, όπως αναγνωρίστηκε τη δεκαετία του 1960 στα εργαστήρια του Bob Atchison στο Πίτσμπουργκ και του Wallace Rowe στο NIH (National Institute Of Health, Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας) (Meyer & Chapman, 2022). Αρχικά πιστευόταν ότι ο ίδιος ο ιός αποτελούσε μολυσματικό παράγοντα για τους ανθρώπους, όμως σήμερα γνωρίζουμε ότι προκαλεί μόνο μια ήπια ανοσολογική απόκριση, χωρίς να προκαλεί κάποια γνωστή ασθένεια. Μόνο οι AAV ιοί άγριου τύπου μολύνουν ασθενείς ηλικίας 1 ως 3 ετών, χωρίς όμως πάλι να σχετίζονται με κάποια γνωστή ασθένεια.

Ο αδενο-σχετιζόμενος ιός είναι ένας μικρός σε μέγεθος ιός (25nm) με μονόκλωνο δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (ssDNA), θετικής και αρνητικής πολικότητας με μήκος περίπου 4,7Kb (Meyer & Chapman, 2022). Δεν περιβάλλεται από φάκελο και αποτελείται από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο. Το γεγονός ότι οι AAV ιοί ανήκουν στο γένος των *Dependovirus* τους καθιστά μη ανεξάρτητους ιούς, δηλαδή αναπαράγονται μόνο παρουσία βοηθητικών ιών, όπως ο αδενοϊός, ο ιός του έρπητα, ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων και ο ιός της δαμαλίτιδας. Η πρώτη κατηγορία ιών που περιγράφηκε ότι βοηθάει στην έκφραση των AAV ιών ήταν οι αδενοϊοί (από τους οποίους προήλθε το όνομα των AAV ιών) και το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι κατά τη μόλυνση στον άνθρωπο επίσης δεν ελάγουν έντονη ανοσολογική απόκριση. Αυτό το χαρακτηριστικό ήθελαν να εκμεταλλευτούν οι επιστήμονες, γιατί σε περιπτώσεις γονιδιακής θεραπείας ο κίνδυνος να εμφανιστεί κάποια παθολογία που σχετίζεται με το ανοσοποιητικό σύστημα μετά τη μόλυνση με AAV φορείς μειωνόταν σημαντικά (Chandrasekaran et al., 2018; Vannucci et al., 2013). Συγκεκριμένα, η έμφυτη ανοσολογική απόκριση του ιού χαρακτηρίστηκε σε ζωικά μοντέλα. Μετά από ενδοφλέβια χορήγηση AAV ιών σε ποντίκια παρατηρήθηκε παραγωγή κυτοκινών και παροδική παραγωγή ουδετερόφιλων και λευκοκυττάρων στο ήπαρ, τα οποία ήταν ικανά να δεσμεύουν τα παραγόμενα ιικά σωματίδια. Βέβαια τα επίπεδα των διαλυτών παραγόντων και της κυτταρικής διήθησης επανέρχονταν στο φυσιολογικό μέσα σε 6 έως 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Ακόμα, στα ζωικά μοντέλα το γονιδίωμα των AAV είχε παρατηρηθεί να παραμένει για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε ιστούς, σε επισωματική μορφή (μια κυκλική διαμόρφωση του γονιδιώματος) σε ηρεμία και ο ιός δεν πολλαπλασιάζεται (Carter et al., 2004; Yip et al., 2020).

Οι κλινικές μελέτες που ακολούθησαν μελέτησαν τον κύκλο μόλυνσης του ιού, και δείχθηκε ότι ο κύκλος ζωής των AAV περιλαμβάνει πολλά βήματα από τη μόλυνση ενός

κυττάρου μέχρι και την παραγωγή των ικών σωματίων (Daya & Berns et al., 2008; Yip et al., 2020). Συνοπτικά, τα βήματα μόλυνσης των AAV φορέων είναι η προσκόλληση στην κυτταρική μεμβράνη (προσδένεται στα κύτταρα μέσω της πρωτεογλυκάνης θειϊκής ελαράνης, του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF-R) και της ιντεγκρίνης), η ενδοκυττάρωση μέσω των υποδοχέων, η διαφυγή από τυχόν λυσοσώματα, η μετατόπιση των ικών σωματίων στον πυρήνα, ο σχηματισμός δίκλωνου DNA (αντιγραφική μορφή του γονιδιώματος AAV) και η έκφραση των γονιδίων *rep* (Meyer & Charman, 2022). Έπειτα ακολουθεί η αντιγραφή του γενετικού υλικού, η έκφραση των γονιδίων *cap*, η σύνθεση σωματίων που περιέχουν ssDNA, και τελικά γίνεται η συναρμολόγηση και η απελευθέρωση των ικών σωματίων από το μολυσμένο κύτταρο.

Ανάλογα με την παρουσία βοηθητικού ιού ή όχι, ο κύκλος ζωής του AAV ακολουθεί είτε τη λυτική, είτε τη λυσιγονική οδό, αντίστοιχα. Σε περίπτωση παρουσίας βοηθητικού ιού, οι αδενο-σχετιζόμενοι ιοί ακολουθούν τον λυτικό τρόπο αναπαραγωγής, σύμφωνα με τον οποίο ενεργοποιείται η DNA πολυμεράση του κυττάρου-ξενιστή, ο βοηθητικός ιός σκοτώνει το κύτταρο-ξενιστή και απελευθερώνονται νέα ικά σωματία AAV (Meyer & Charman, 2022). Εάν δεν υπάρχει βοηθητικός ιός, ο AAV παρουσιάζει λυσιγονικό τρόπο αντιγραφής, όπου όταν ο AAV ιός μολύνει ένα κύτταρο, η γονιδιακή του έκφραση καταστέλλεται (ο AAV ιός δεν αντιγράφεται) και το γονιδιώμα του ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή, και ειδικότερα στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 19. Αυτό το χαρακτηριστικό αποδίδεται στην παρουσία μιας θέσης πρόσδεσης της πρωτεΐνης *rep* στο χρωμόσωμα αυτό. Σε κάποιες σπάνιες περιπτώσεις, η λύση του κυττάρου-ξενιστή μπορεί να συμβεί απουσία βοηθητικού ιού, αλλά συνήθως ο AAV ιός δεν μπορεί να αναπαραχθεί και να σκοτώσει ένα κύτταρο από μόνος του. Βέβαια το ελάχιστο σύνολο των αδενο-ικών γονιδίων που απαιτούνται για την αποτελεσματική παραγωγή ικών σωματίων AAV (Carter et al., 2004; Yip et al., 2020), ήταν μια ανακάλυψη που επέτρεψε νέες μεθόδους παραγωγής ανασυνδυασμένου AAV, οι οποίες δεν απαιτούν ταυτόχρονη μόλυνση των κυττάρων που παράγουν AAV με αδενοϊό. Σε αυτήν την περίπτωση, η ενσωμάτωση μεσολαβείται από τις πρωτεΐνες Rep78 και Rep68, γεγονός που απαιτεί και την παρουσία αλληλουχιών ITR (παλίνδρομες ανεστραμμένες τερματικές αλληλουχίες, Inverted Terminal Repeat) που πλαισιώνουν την περιοχή που ενσωματώνεται.

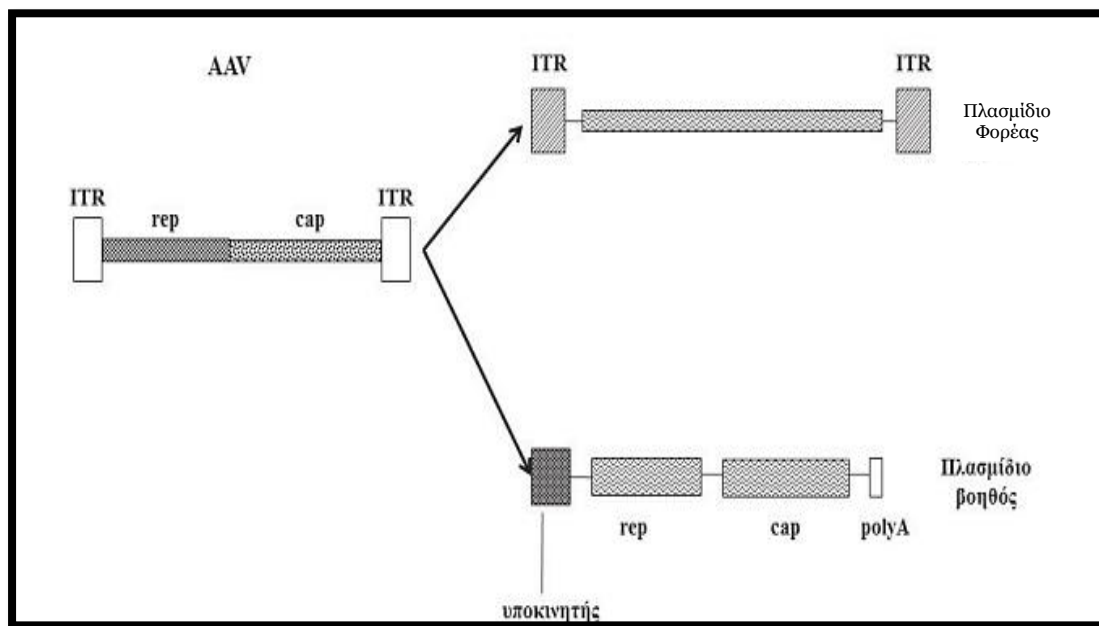
2.1.1.2. Γονιδιωματική βάση του ιού

Το γονιδίωμα των αδενο-σχετιζόμενων ιών αποτελείται από τις δύο κύριες γονιδιακές περιοχές *rep* και *cap*, οι οποίες πλαισιώνονται από δύο παλίνδρομες

ανεστραμμένες τερματικές επαναλήψεις ITR που περιλαμβάνουν 145 βάσεις η καθεμία (Meyer & Charman, 2022). Οι αλληλουχίες ITR που υπάρχουν σε κάθε άκρο του γονιδιώματος προκαλούν το σχηματισμό δευτερευουσών δομών σχήματος T (δομή φουρκέτας), που χρησιμεύουν κυρίως ως αφετηρίες αντιγραφής κατά τη διάρκεια της παραγωγικής μόλυνσης λόγω της δράσης του ενζύμου πριμάση και ως θέσεις εκκίνησης για την DNA πολυμεράση του κυττάρου-ξενιστή, ώστε να ξεκινήσει η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου. Κατασκευάζονται τόσο θετικές όσο και αρνητικές αλυσίδες DNA και σχηματίζονται ενδιάμεσα δίκλινα μόρια σε όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγής του ιού, με αποτέλεσμα οι δύο κλώνοι με τη θετική και την αρνητική πολικότητα να συνδυάζονται (Meyer & Charman, 2022). Οι αλληλουχίες ITR αποδείχθηκε επίσης ότι είναι υπεύθυνες τόσο για την ενσωμάτωση του DNA του AAV ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή (19^ο χρωμόσωμα στον άνθρωπο), καθώς και για την αποτελεσματική ενθυλάκωση του DNA των AAV ιών, σε συνδυασμό με τη δημιουργία πλήρων ιικών σωματίων. Το γονίδιο *rep* κωδικοποιεί πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την αντιγραφή του DNA του ιού, το πακετάρισμα των γονιδίων AAV και την ενσωμάτωση του ιικού γονιδιώματος στο DNA του ξενιστή. Το γονίδιο *rep* εκφράζει τέσσερις διαφορετικές, μη δομικές, ρυθμιστικές πρωτεΐνες, που όλες βοηθούν στην αντιγραφή του γονιδιώματος. Αυτές τις πρωτεΐνες τις κατατάσσουμε με βάση το μοριακό τους βάρος και αντίστοιχα είναι οι Rep78, Rep68, Rep52 και Rep40. Αντίστοιχα, το γονίδιο *cap* κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες Vp1, Vp2 και Vp3, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό του καψιδίου, την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης AAP (Adeno-associated protein) που ενεργοποιεί την συναρμολόγηση και την ενεργοποίηση της μεμβρανικής αδενο-σχετιζόμενης πρωτεΐνης MAAP (membrane-associated accessory protein), η οποία έχει ταυτοποιηθεί πρόσφατα.

Στους ανασυνδυασμένους ιικούς φορείς AAV (recombinant AAV ή rAAV) οι γονιδιακές περιοχές *rep* και *cap* αντικαθίστανται από το επιθυμητό DNA, το οποίο πλαισιώνεται από τις ήδη υπάρχουσες αλληλουχίες ITR (**Εικόνα 3**). Αυτή η γενετική αλλαγή εξυπηρετεί τους σκοπούς της γονιδιακής θεραπείας και αναφέρεται ως κασέτα έκφρασης διαγονιδίων (Yang et al., 2016; Yip et al., 2020). Όσον αφορά τη γονιδιακή θεραπεία, οι ITR φαίνεται να είναι οι μόνες αλληλουχίες που εξ' ορισμού απαιτείται να βρίσκονται *in cis*, δηλαδή σε γειτονική θέση σε σχέση με το θεραπευτικό γονίδιο, προκειμένου να παραχθούν τα ιικά σωματίδια. Οι δομικές πρωτεΐνες (*cap*) και οι πρωτεΐνες συσκευασίας (*rep*) μπορούν να χορηγηθούν *in trans* (Yip et al., 2020), καθώς παρέχονται εξωγενώς ή κωδικοποιούνται από κάποιο άλλο μόριο DNA, υποκαθιστώντας ουσιαστικά με αυτό τον τρόπο ορισμένες απαραίτητες λειτουργίες του ιικού φορέα. Με βάση αυτή την προϋπόθεση αφομιώθηκαν πολλές μέθοδοι για την λειτουργική παραγωγή ανασυνδυασμένων φορέων AAV (rAAV) που έχουν

ενσωματωμένο ένα γονίδιο αναφοράς ή ακόμα και ένα θεραπευτικό γονίδιο. Ωστόσο, πρόσφατα δημοσιεύτηκε ότι οι αλληλουχίες ITR δεν είναι τα μόνα απαιτούμενα στοιχεία (*cis*) για την αποτελεσματική αντιγραφή και ενθυλάκωση του γονιδίου. Κάποιες πρόσφατες έρευνες έχουν εντοπίσει μια αλληλουχία που βρίσκεται μέσα στην κωδικοποιητική αλληλουχία του γονιδίου *rep* και ορίζεται ως *cis-acting Rep-εξαρτώμενο στοιχείο* (CARE) (Ma et al., 2019; Yip et al., 2020). Το CARE αποδείχθηκε ότι αυξάνει την αντιγραφή και την ενθυλάκωση όταν υπάρχει *in cis*.



Εικόνα 3: Η οργάνωση του γονιδιώματος των ανασυνδυασμένων AAV φορέων. Οι αγρίου τύπου AAV διαθέτουν ένα μονόκλωνο μόριο DNA ως γονιδίωμα με μήκος περίπου 4,7 kb το οποίο φέρει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τα *rep* και *cap*, που κωδικοποιούν 4 πρωτεΐνες πολλαπλασιασμού και 3 πρωτεΐνες υπεύθυνες για την κατασκευή του καψιδίου. Το γονιδίωμα πλασιώνεται από δύο ανεστραμμένες τερματικές επαναλήψεις (ITR), οι οποίες αποτελούν τις μόνες απαραίτητες δομές *in cis* για την ική αντιγραφή και τη συναρμολόγηση του ισοματίου. Αυτές οι αλληλουχίες διατηρούνται στο πλασμίδιο-φορέα, ενώ το υπόλοιπο ικό γονιδίωμα υποκαθίσταται από τις αλληλουχίες του διαγονιδίου [Προσαρμογή από (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018)].

2.1.1.3. Πρωτεϊνική σύσταση του ιού

Όσον αφορά το γονίδιο *rep* του αδενο-σχετιζόμενου ιού, αυτό κωδικοποιεί τέσσερις πρωτεΐνες και παίζουν βασικό ρόλο στην ενεργοποίηση της αντιγραφής του AAV ιού. Στην αρχή του γονιδιώματος υπάρχει η γενετική πληροφορία για την παραγωγή δύο μορίων mRNA διαφορετικού μήκους (Lundstrom & Boulikas, 2003). Υπεύθυνοι για την παραγωγή είναι δύο υποκινητές, ο ρ5 και ο ρ19. Κάθε ένα mRNA περιέχει ένα εσώνιο το οποίο είτε μπορεί να αφαιρεθεί με μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, είτε όχι. Έτσι ανάλογα με την τροποποίηση των μορίων mRNA προκύπτουν 4 διαφορετικές πρωτεΐνες (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40) με διαφορετική λειτουργία η καθεμία. Όλες

μπορούν να δεσμεύουν το ATP και να δρουν παρόμοια με το ένζυμο ελικάση, που χρησιμοποιεί συνήθως ATP ως πηγή ενέργειας με σκοπό την εκτύλιξη της διπλής έλικας που σχηματίζουν τα μόρια DNA ή RNA. Μπορούν επίσης να ρυθμίζουν τη μεταγραφή των υποκινητών p40, p5 και p19. Οι πρωτεΐνες Rep78 και Rep68 έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να συνδέονται ειδικά με τη φουρκέτα που δημιουργούν οι αλληλουχίες ITR (Gardlík, et al., 2005).

Η δεξιά πλευρά του γενετικού υλικού του AAV ιού (γονίδιο *cap*) κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες καψιδίου, η σύνθεση των οποίων ξεκινάει από τον υποκινητή p40. Οι κύριες αυτές πρωτεΐνες είναι οι VP, οι οποίες μεταγράφονται από το ίδιο mRNA. Αν το παραγόμενο mRNA προκύψει από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις λόγω της ύπαρξης εσωνίου, δημιουργούνται ανάλογα με την αποκοπή ή όχι του εσωνίου δύο διαφορετικές πρωτεΐνες. Το μήκος των μορίων mRNA είναι 2,3Kb και 2,6Kb, και παρουσία αδενοϊού προτιμάται το mRNA μήκους 2,3kb. Σε αυτό το mRNA το κωδικόνιο έναρξης (AUG), από το οποίο ξεκινά και η σύνθεση της πρωτεΐνης VP1, κόβεται με αποτέλεσμα να προκύψει ένα μικρότερου μήκους πρωτεϊνικό μόριο VP1. Το κωδικόνιο έναρξης αποτελεί το πρώτο κωδικόνιο (AUG) που παραμένει στο μόριο για την σύνθεση της πρωτεΐνης VP3 (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018). Βέβαια, αντί αυτού του κωδικονίου στο αντίστοιχο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης περιβάλλεται από ένα πλαίσιο Kozak η αλληλουχία ACG (που κωδικοποιεί τη θρεονίνη). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση της πρωτεΐνης VP2, η οποία αποτελεί τη πρωτεΐνη VP3 με επιπρόσθετα αμινοτελικά κατάλοιπα, όπως και η VP1. Έτσι προκύπτουν οι πρωτεΐνες VP1 (87kD), VP2 (72kD) και VP3 (62kD). Ακόμα έχει βρεθεί στο γονιδίωμα του AAV ιού και η πρωτεΐνη ενεργοποίησης συναρμολόγησης (AAP) η οποία είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση του καψιδίου. Βέβαια, η διαδικασία συναρμολόγησης και η δομή της πρωτεΐνης AAP δεν έχει βρεθεί ακόμα (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018).

2.1.1.4. Ταξινόμηση AAV φορέων

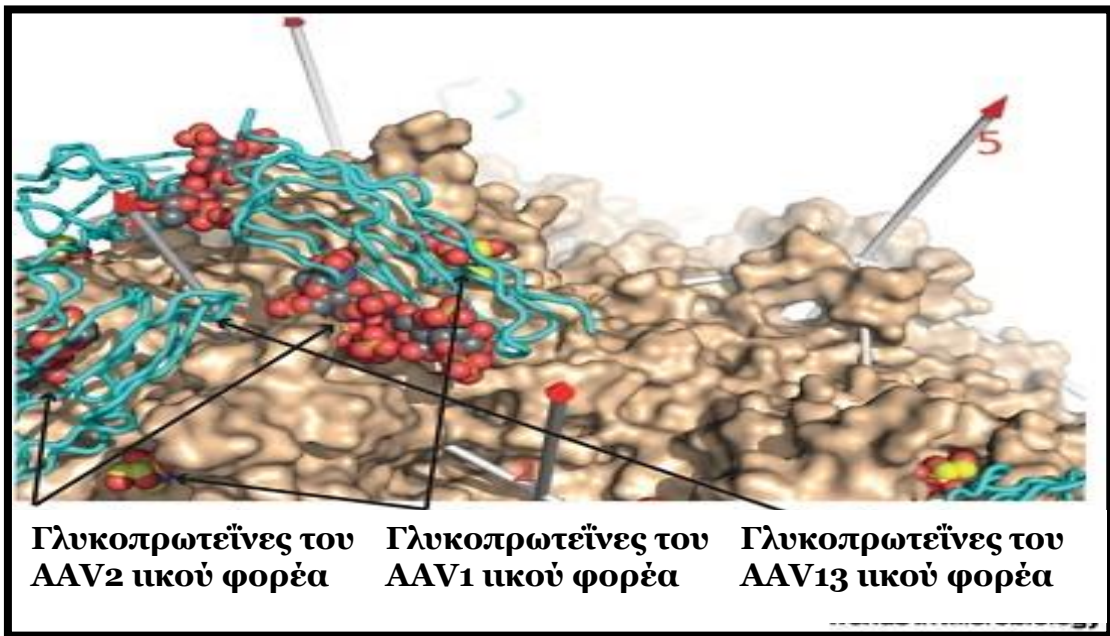
2.1.1.4.1. Ταξινόμηση σύμφωνα με τους ορότυπους και τον εγγενή τροπισμό τους

Σήμερα διαθέτουμε ένα μεγάλο πλήθος πληροφοριών όσον αφορά τα διαφορετικά είδη των AAV φορέων, καθώς υπάρχουν αρκετές μελέτες για τους παράγοντες και τους υποδοχείς προσκόλλησης των AAV ιών στο κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Όπως έχει περιγραφεί, οι ιοί AAV συνδέονται με γλυκάνες στην κυτταρική επιφάνεια του ξενιστή και, με τη βοήθεια διαμεμβρανικού υποδοχέα, διαμεσολαμβάνεται η είσοδος του ιού στο κύτταρο. Αρκετοί ερευνητές έχουν εκμεταλλευτεί τη στρατηγική του ετερόλογου ανασυνδυασμού για να συγκρίνουν τις αποτελεσματικότητες μεταγωγής των ορότυπων φορέων AAV σε διαφορετικούς ιστούς (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018). Ενώ τα αποτελέσματα που σχετίζονται με τον τροπισμό των ιστών του ορότυπου AAV είναι γενικά δύσκολο να ερμηνευτούν, λόγω διακυμάνσεων μεταξύ των μελετών στους τίτλους και τις δόσεις των φορέων, τους υποκινητές και τα διαγονίδια, έχει καθιερωθεί μια γενική ιεραρχία για την αποτελεσματική μεταγωγή σε κύριους ιστούς.

Ο πρώτος ορότυπος που περιεγράφηκε το 1982 ήταν ο AAV2 (Hirsch, et al., 2016). Οι ιικοί φορείς AAV2 μετά την αποκάλυψη τους, λόγω της έλλειψης παθογονικότητας στον ανθρώπινο οργανισμό και του μεγάλου εύρους μολυσματικότητας, απέκτησαν μεγάλη δημοτικότητα σε εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας και ήταν ικανοί να προκαλούν γονιδιακή έκφραση μεγάλης διάρκειας. Έχουν γίνει πάρα πολλές κλινικές δοκιμές με χρήση AAV2 ιικών φορέων για πολλές γενετικές ασθένειες, από τις οποίες οι 20 έχουν ολοκληρωθεί ή βρίσκονται σε πολύ καλή πορεία (Chen, et al., 2018). Ο AAV2 παρουσιάζει φυσικό τροπισμό προς τους σκελετικούς μύες, τους νευρώνες, τα αγγειακά λεία μυϊκά κύτταρα και τα ηπατοκύτταρα, ενώ έχουν περιγραφεί τρεις υποδοχείς του ιού και η λειτουργία τους. Σε αυτούς τους υποδοχείς ανήκει ο κυτταρικός υποδοχέας της πρωτεογλυκάνης θειϊκής ηπαρίνης (HSPG, Heparan Sulfate Proteoglycans), ο οποίος λειτουργεί ως πρωτεύων υποδοχέας για την ενδοκυττάρωση του ιού στο κύτταρο-ξενιστή, ο υποδοχέας της ιντεγκρίνης β και ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR-1, Fibroblast Growth Factor Receptor 1) οι οποίοι έχουν δραστηριότητα συν-υποδοχέα ώστε να επιτευχθεί η ενδοκυττάρωση. Έντεκα ορότυποι του AAV έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής, με καλύτερα και πιο συχνά χρησιμοποιούμενο τον AAV2 (Chen, et al., 2018). Αυτοί οι ορότυποι διαφέρουν ως προς τον τροπισμό τους ή τους τύπους κυττάρων που μολύνουν, καθιστώντας το AAV ένα πολύ χρήσιμο σύστημα για την κατ' επιλογή μεταγωγή συγκεκριμένων τύπων κυττάρων. Ο ορότυπος AAV5 απομονώθηκε από δείγματα κονδυλομάτων πέους, ενώ οι ορότυποι AAV1 μέχρι και AAV6 βρέθηκαν σε

εργαστηριακά δείγματα αδενοϊού. Μεταξύ αυτών, οι AAV 2, 3 και 5 πιστεύεται ότι προέρχονται από τον άνθρωπο με βάση τον επιπολασμό των εξουδετερωτικών αντισωμάτων στον ανθρώπινο πληθυσμό. Αντίθετα, ο ορότυπος AAV4 φαίνεται να προέρχεται από πιθήκους, καθώς τα αντισώματα κατά του AAV4 είναι κοινά σε πρωτεύοντα πέραν του ανθρώπου (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Εάν ο AAV1 προήλθε από ανθρώπινα ή μη ανθρώπινα πρωτεύοντα παραμένει ασαφές. Είναι ενδιαφέρον ότι ο ορότυπος AAV6 πιστεύεται ότι αποτελεί έναν υβριδικό ανασυνδυασμό μεταξύ των AAV1 και AAV2, αφού οι αλληλουχίες ITR που βρίσκονται αριστερά και ο υποκινητής p5 είναι ουσιαστικά πανομοιότυποι με τις αντίστοιχες αλληλουχίες του AAV2, ενώ το υπόλοιπο γονιδίωμα είναι σχεδόν πανομοιότυπο με αυτό του AAV1. Πρόσφατα, οι AAV που βρέθηκαν σε απομονώσεις αδενοϊού πιθήκου έδειξαν μεγαλύτερη από 96% ομολογία με τους ορότυπους AAV1 και AAV6. Στους σκελετικούς μύες, οι AAV1 και AAV7 είναι γνωστό ότι έχουν καλή απόδοση με ταχεία έναρξη και υψηλά επίπεδα μεταγωγής (Lukashev & Zamyatnin, 2016) **(Εικόνα 4)**. Ο AAV6 έχει επίσης δείξει μια τάση για μεταγωγή των σκελετικών μυών. Επί του παρόντος βρίσκονται σε εξέλιξη μελέτες για την αποσαφήνιση της αποτελεσματικότητας της μεταγωγής και των τροπισμών των ιστών άλλων ορότυπων.

Η μελέτη των διαφορετικών ορότυπων AAV είναι πολύ σημαντική για τη γονιδιακή θεραπεία. Η χρήση εναλλακτικών ορότυπων AAV μπορεί όχι μόνο να μειώσει το φορτίο του φορέα λόγω της υψηλότερης αποτελεσματικότητάς τους στη μεταγωγή, αλλά επίσης να βοηθήσει στην αποφυγή προϋπαρχόντων εξουδετερωτικών αντισωμάτων που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της χυμικής ανοσολογικής απόκρισης σε φυσική μόλυνση ή σε προηγούμενη θεραπεία με φορείς AAV (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Επιπλέον, οι ορότυποι και οι παραλλαγές του AAV μπορούν να χρησιμεύσουν ως πρότυπα για το σχεδιασμό κατασκευής καψιδίου που θα στοχεύει στον ιστό στον οποίο επιθυμούμε να επιτύχουμε το θεραπευτικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 4: Σύγκριση θέσεων σύνδεσης υποδοχέα αδενο-σχετιζόμενου ιού (AAVR) και προσκόλλησης γλυκάνης [Προσαρμογή από (Myer & Chapman, 2020)].

2.1.1.4.2. Υβριδικά στελέχη AAV

Όπως προαναφέρθηκε, η ανακάλυψη νέων ορότυπων είναι πολύ σημαντική για την αποτελεσματικότητα της γονιδιακής θεραπείας. Όμως αρκετές φορές οι AAV φορείς δεν είχαν τις επιθυμητές δράσεις και ορισμένες βελτιώσεις είναι απαραίτητες ώστε να έχουμε το μέγιστο δυνατό αποτέλεσμα (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020). Λόγω κλινικών και ερευνητικών σκοπών, έχουν γίνει πολλές μελέτες για τη σχεδίαση και τη βελτίωση νέων παραλλαγών AAV. Τέτοιες μελέτες έγιναν κυρίως για την αποφυγή ανίχνευσης τους από το ανοσοποιητικό σύστημα και αποτελούν την έρευνα νέων τροπισμών, τη στόχευση συγκεκριμένων ιστών και γενετικά τροποποιημένων επιφανειακών αλλαγών στα κύτταρα. Οι ερευνητές έχουν μελετήσει τα βήματα και τις τεχνικές δημιουργίας υβριδικών στελεχών AAV (rAAV) για την προσέγγιση ενός ακόμη πιο επιλεκτικού στόχου πέρα από την επιλογή συγκεκριμένων στελεχών ανασυνδυασμένου AAV (rAAV) για τη στόχευση συγκεκριμένων κυττάρων (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Οι γενετικές τροποποιήσεις των AAV φορέων περιλαμβάνουν την παραγωγή συνθετικών καψιδίων και την ανάμειξη καψιδίων/ITR από διαφορετικούς ορότυπους των AAV ιών για τη δημιουργία υβριδικών ιών με νέες ιδιότητες.

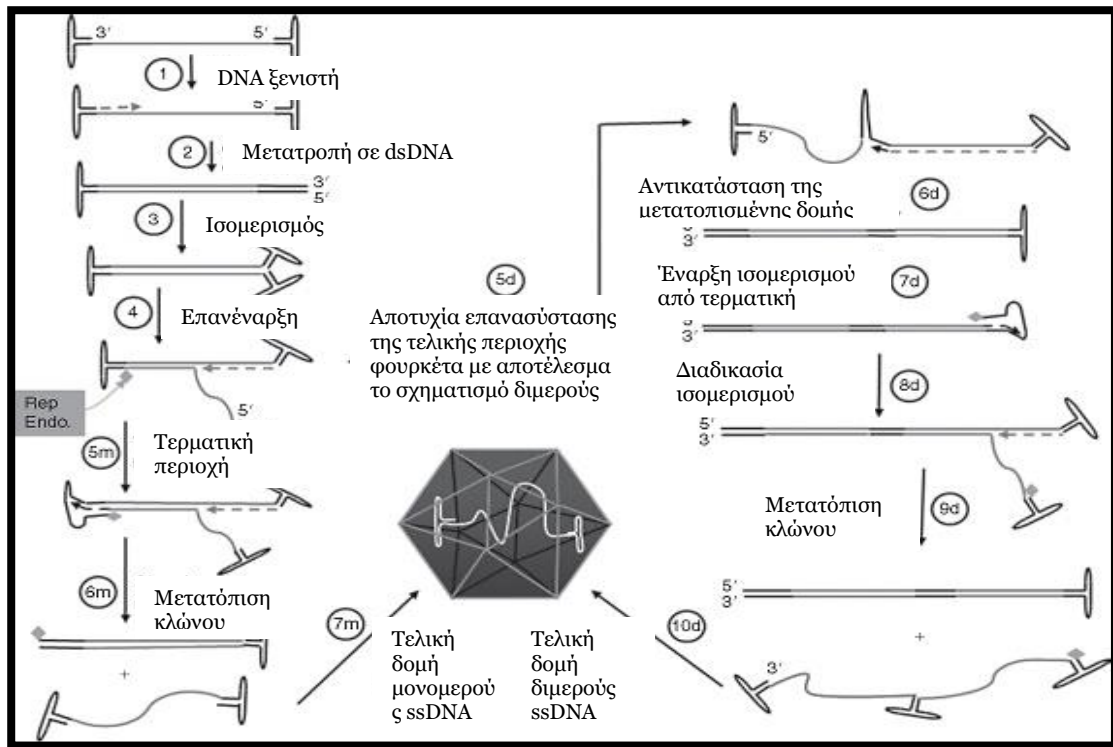
2.1.1.4.2.1. Αυτοσυμπληρωματικός AAV (self-complementary adeno-associated virus ή scAAV)

Ένα περιοριστικό βήμα για την παραγωγή rAAV φορέων είναι ο ρυθμός κατά τον οποίο το γονιδίωμα AAV συνθέτει το δίκλωνο DNA, γιατί το γονιδίωμα του AAV είναι

ένα μονόκλωνο DNA (McCarty, 2020). Συγκεκριμένα ο AVV απαιτεί την ύπαρξη βοηθητικού ιού και για την αντιγραφή του, όπου απαραίτητη είναι η δράση ενζύμων αντιγραφής του κυττάρου-ξενιστή, με αποτέλεσμα την καθυστέρηση στη γονιδιακή έκφραση απουσία αυτών των ενζύμων (Myer & Charman, 2020).

Για να ξεπεραστεί αυτό, οι επιστήμονες με γενετικές τροποποιήσεις ανέπτυξαν ένα νέο στέλεχος ιού το οποίο περιέχει αλληλουχίες ικανές να αντιγράφονται αυθόρμητα κατά τη μόλυνση χωρίς τη χρήση του μηχανισμού αντιγραφής του ξενιστή. Αυτό τον τύπο ιικού φορέα αποτελεί ο scAAV, δηλαδή ο αυτοσυμπληρωματικός αδενο-σχετιζόμενος ιός, που είναι ένας ιικός φορέας και ένας γενετικά τροποποιημένος αδενο-σχετιζόμενος ιός (AAV) (McCarty et al., 2020). Ο συγκεκριμένος εργαστηριακός ανασυνδυασμένος ιικός φορέας του rAAV ονομάζεται «αυτοσυμπληρωματικός» γιατί η κωδικοποιητική περιοχή έχει τροποποιηθεί έτσι ώστε να δημιουργεί ένα ενδομοριακό δίκλωνο πρότυπο μόριο DNA. Κατά τη μόλυνση, αντί να καθυστερεί η κυτταρική σύνθεση του δεύτερου κλώνου, τα δύο συμπληρωματικά μισά του scAAV θα συνδεθούν για να σχηματίσουν μια μονάδα δίκλωνου DNA (dsDNA, Double Stranded DNA) που είναι έτοιμη για άμεση αντιγραφή και μεταγραφή (**Εικόνα 5**). Η ιδιαιτερότητα αυτής της κατασκευής είναι ότι αντί της πλήρους χωρητικότητας κωδικοποίησης που επιτρέπεται στους rAAV φορείς (4,7–6 kb) οι scAAV φορείς μπορούν να δεχτούν μόνο περίπου το ήμισυ αυτής της ποσότητας ($\approx 2,4$ kb).

Ο scAAV είναι ένας ελκυστικός φορέας για χρήση στη γονιδιακή θεραπεία καθώς πλεονεκτεί εξαιτίας της αυξημένης και παρατεταμένης έκφρασης του διαγονιδίου *in vitro* και *in vivo*. Λόγω μιας ποικιλίας διαθέσιμων ορότυπων scAAV, οι επιστήμονες μπορούν να επιλέξουν έναν ορότυπο που να έχει επιθυμητές ιδιότητες για τη θεραπεία τους (Hirsch, et al., 2016). Η επιλογή μόνο ενός υποσυνόλου κυττάρων βελτιώνει την εξειδίκευση και μειώνει τον κίνδυνο αναστολής του από το ανοσοποιητικό σύστημα. Διαφορετικοί ορότυποι scAAV και AAV μπορούν να επιμολύνουν αποτελεσματικά μια ποικιλία κυτταρικών στόχων. Βέβαια ένα μειονέκτημα που αντιμετωπίζει ο scAAV είναι ότι λόγω της ισχυρής γονιδιακής έκφρασης, τα διαγονιδιακά προϊόντα που παρέχονται μέσω scAAV προκαλούν ισχυρότερη ανοσολογική απόκριση σε σχέση με τα ίδια διαγονίδια που παρέχονται μέσω ενός μονόκλωνου φορέα AAV (McCarty, 2020).

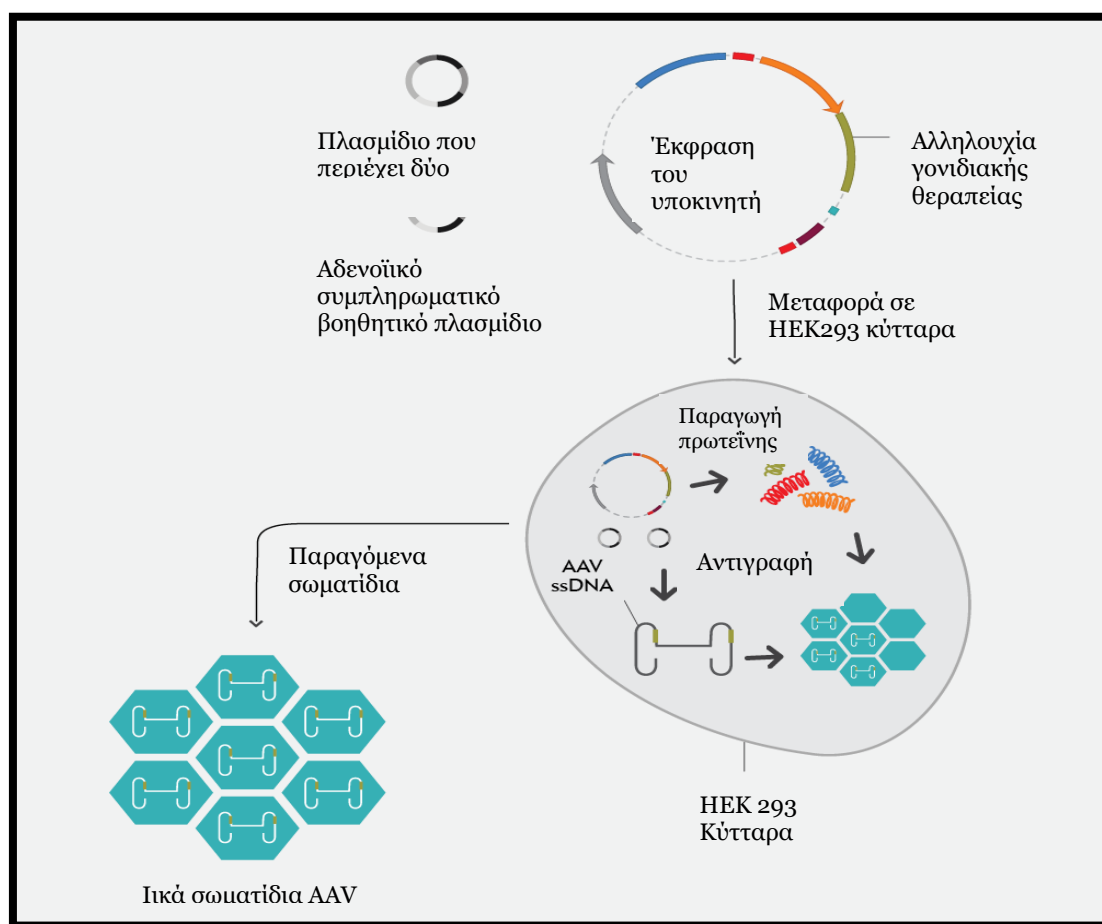


Εικόνα 5: Κύκλος αντιγραφής αδeno-σχετιζόμενου ιού (AAV) και σχηματισμός διμερών ανεστραμμένων επαναλαμβανόμενων γονιδιωμάτων (scAAV). Το μονόκλωνο DNA του ιού εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή και η αλληλουχία (ITR) που βρίσκεται στο 3' άκρο δρα ως εκκινήτρια με αποτέλεσμα τη δράση της DNA πολυμεράσης του ξενιστή. (1) Ο εκκινήτης 3'-ITR μετατοπίζεται και ξεκινάει η αντιγραφή στο ITR στο άκρο 5'. (2) Το διπλό τώρα ITR αναδιπλώνεται σε διαμόρφωση διπλής φουρκέτας και σχηματίζει έναν νέο εκκινήτη για τη σύνθεση DNA. (3). Η πρωτεΐνη AAV του Rep αναγνωρίζει και δεσμεύεται στην αλληλουχία ITR (4). Για να δημιουργήσει πλήρη μονομερή γονιδιώματα, η ενδονουκλεάση Rep κόβει την τερματική θέση ανάλυσης (trs) του ITR, ξεκινώντας ένα δεύτερο σύμπλοκο αντιγραφής DNA. Το αρχικό σύμπλοκο αντιγραφής εκτοπίζει τον θυγατρικό κλώνο, και ολοκληρώνει την αντιγραφή μέχρι το τέλος του γονιδιώματος, αναδημιουργώντας το πρότυπο για ισομερισμό. (6m). Το μεταλλαγμένο μονόκλωνο γονιδίωμα συσκευάζεται στο AAV καψίδιο (7 m). Τα διμερή γονιδιώματα δημιουργούνται όταν ο Rep αποτυγχάνει να παράξει το trs πριν φτάσει στο σύμπλεγμα αντιγραφής από το άλλο άκρο. (5δ) Ο αναδιπλασιασμός συνεχίζεται μέσω του ITR και του μετατοπισμένου κλώνου, για τη δημιουργία ενός διμερούς πρότυπου dsDNA (6d) το οποίο μπορεί να ξεκινήσει έναν νέο κύκλο σύνθεσης DNA είτε με ισομερισμό του ανοιχτού άκρου (βήμα 4) είτε με τελική ανάλυση του άκρου της φουρκέτας (7δ). Ο ισομερισμός αυτός ξεκινά τη σύνθεση του DNA από το διαχωρισμένο άκρο (8d) και η αντιγραφή του διμερούς εκμαγείου εκτοπίζει ένα μονόκλωνο διμερές ανεστραμμένο επαναλαμβανόμενο γονιδίωμα (9d), το οποίο μπορεί στη συνέχεια να συσκευαστεί στο ισοστάσιο AAV (10 d) [Προσαρμογή από (McCarty, 2020)].

2.1.1.4.2.2. Παραγωγή ικών φορέων στα κύτταρα HEK293

Η προσθήκη γονιδίων μεγάλου μεγέθους είναι αναγκαία στη γονιδιακή θεραπεία και επειδή οι κλασικοί ιικοί φορείς AAV δεν επιτρέπουν κάτι τέτοιο, χρειάστηκε να τροποποιηθούν γενετικά (Bloh et al., 2021). Η τεχνική η οποία είναι ικανή να εκφράσει γονίδια μεγάλου μεγέθους με τη μέγιστη δυνατή αποτελεσματικότητα είναι ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Σε αυτή τη μέθοδο, ένα γονίδιο διαιρείται μεταξύ δύο πλασμιδίων μεταφοράς, αλλά με σημαντική επικάλυψη αλληλουχίας. Η συν-έκφραση

προκαλεί ομόλογο ανασυνδυασμό και την έκφραση του διαγονιδίου αλλά σε πολύ χαμηλή απόδοση (<1% του άγριου τύπου). Η παραγωγή του φορέα προϋποθέτει τη συνδιαμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα και με ένα βοηθητικό πλασμίδιο, που κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες Rep και Cap, παρουσία αδενοϊού σε στοχευμένες κυτταρικές σειρές (κυτταρική σειρά HEK293). Σε έναν τυπικό πλασμιδιακό AAV φορέα έχουν διατηρηθεί μόνο οι αλληλουχίες ITR, ενώ όλο το γονιδίωμα του AAV έχει αντικατασταθεί από το διαγονίδιο και τον υποκινητή του (Bloh et al, 2021). Τα κύτταρα λύνονται 2 με 3 μέρες αργότερα και ο ικός φορέας συγκεντρώνεται μετά από φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας με χλωριούχο καΐσιο (CsCl). Ο υπολειμματικός αδενοϊός που μπορεί να παραμένει στο συγκεντρωμένο φορέα αδρανοποιείται μετά από θερμική επεξεργασία.



Εικόνα 6: Παραγωγή ικών φορέων στα κύτταρα HEK293. Τα κύτταρα HEK293 χρησιμοποιούνται κυρίως λόγω του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξης τους, της υψηλής ικανότητάς διαμόλυνσής τους και της ικανότητας τους να αναπτύσσονται σε καλλιέργεια αιωρήματος χωρίς ορό. Ο άγριου τύπου AAV διαθέτει ένα μονόκλωνο μόριο DNA ως γονιδίωμα με μήκος περίπου 4,7 kb το οποίο φέρει δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης, τα *rep* και *cap*. Το γονιδίωμα πλαισιώνεται από δύο ανεστραμμένες ακραίες επαναλήψεις (ITR), οι οποίες αποτελούν τις μόνες απαραίτητες δομές *in cis* για την ική αντιγραφή και συναρμολόγηση του ισοσωματίου. Αυτές οι αλληλουχίες διατηρούνται στο πλασμίδιο φορέα, ενώ το υπόλοιπο ικό γονιδίωμα υποκαθίσταται από τις αλληλουχίες του διαγονιδίου. Το πλασμίδιο βοηθός εκφράζει υπό τον έλεγχο ενός ισχυρού υποκινητή τις βοηθητικές πρωτεΐνες και από τα γονίδια *rep* και *cap*. Για την τελική παραγωγή του AAV φορέα, τα πλασμίδια φορέας και βοηθός συν-διαμολύνουν μια κυτταρική σειρά παρουσία αδενοϊού, ο οποίος παρέχει όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες για την

παραγωγή του AAV ιικού φορέα. Μετά από 2-3 ημέρες τα κύτταρα λύνονται και ο AAV ιικός φορέας απομονώνεται με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας με CsCl, ενώ ο αδενοϊός που υπολείπεται απομακρύνεται μέσω θερμικής αδρανοποίησης [Προσαρμογή από (Bloh et al., 2021)].

2.1.1.4.2.3. Το υβριδικό καψίδιο AAV-DJ

Ο AAV-DJ, δημιουργήθηκε μέσω του τυχαίου ομόλογου ανσυνδυασμού και αποτελεί τον καταλυλότερο φορέα για την γονιδιακή θεραπεία στο ήπρα και τον χαρακτηρίζεται από κατευθυνόμενη εξέλιξη, ειδικεύοντας τον τροπισμό του ήπατος *in vivo* (McCarty, 2020). Το AAV είναι αποτέλεσμα συνδυασμού των καλύτερων χαρακτηριστικών των ορότυπων AAV-2, AAV-8 και AAV-9 και συνδιαποτελεί ένα υβριδικό καψίδιο από ακόμα οκτώ διαφορετικά στελέχη AAV, επιτυγχάνοντας αυξημένη στόχευση των ηπατικών κυττάρων. Ως εκ τούτου, μπορεί να μολύνει διαφορετικά κύτταρα σε πολλές περιοχές του σώματος, μια ιδιότητα που δεν θα διέθετε ένα μοναδικό στέλεχος AAV με περιορισμένο τροπισμό. Περαιτέρω προσπάθειες για τη βελτίωση νέων παραλλαγών AAV αποτελούν την προγονική ανακατασκευή των παραλλαγών του ιού, για τη δημιουργία νέων ιικών φορέων με βελτιωμένες ιδιότητες για εφαρμογή τους σε κλινικές μελέτες (McCarty, 2020).

2.1.2. Ρετροϊοί

2.1.2.1. Η γονιδιακή δομή του ιού και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες ρετροϊών: οι λεντοϊοί (όπως ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας - HIV), οι ογκοϊοί (όπως ο ιός της λευχαιμίας του επίμουσ - MLV) και οι αφροϊοί (HFV) (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Το γονιδίωμα του ρετροϊού είναι ένα μονόκλωνο RNA και διαχωρίζεται σε τρεις γονιδιακές περιοχές. Τα χαρακτηριστικά αυτά γονίδια των ρετροϊών είναι το *gag*, το *pol* και το *env*. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από το γονίδιο *gag* είναι υπεύθυνες για την παραγωγή του καψιδίου του ιού. Συγκεκριμένα το γονίδιο *gag* κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη *gag*, και εφόσον έχουν επέλθει οι απαραίτητες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τελικά παράγονται οι πρωτεΐνες MA (πρωτεΐνη μήτρας, p17), CA (πρωτεΐνη καψιδίου, p24), SP1 (διαχωριστικό πεπτιδίο 1, p2), NC (πρωτεΐνη νουκλεοκαψιδίου, p7), SP2 (διαχωριστικό πεπτιδίο 2, p1) και P6. Το καψίδιο έχει δύο περιοχές που ενώνεται με νουκλεϊκό οξύ (Blaese et al., 1995). Αυτές είναι η περιοχή MA (μήτρας) και η περιοχή NC (νουκλεοκαψιδίου). Η συγκεκριμένη ένωση του ρετροϊού είναι υπεύθυνη για τη συναρμολόγηση ιοσωματίων, μία από τις σημαντικές λειτουργίες της πρωτεΐνης *gag*. Οι πρωτεΐνες *env* είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση, την

είσοδο και την έξοδο του λεντοϊού από το κύτταρο που έχει μολύνει, δηλαδή επιτρέπουν στο λεντοϊό να μολύνει ένα κύτταρο.

Το γονίδιο *env* κωδικοποιεί την επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη, gp120 ή SU, η οποία προσκολλάται στους υποδοχείς CD4 που υπάρχουν στα λεμφοκύτταρα, η οποία ενσωματώνεται στον ιικό φάκελο και επιτρέπει στον ιό να προσκολληθεί και να ενωθεί με τα κύτταρα-στόχους, ενώ η δυνατότητα του ρετροϊού να εισέρχεται στο κύτταρο προσδίδεται από το αγκυρωμένο διαμεμβρανικό συστατικό (Keeler, et al., 2017). Το γονίδιο *pol* κωδικοποιεί συγκεκριμένα ιικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση του ιικού DNA και την ενσωμάτωσή του στο κύτταρο-ξενιστή αμέσως μετά τη μόλυνση. Αυτά αποτελούν την αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase ή RT), την RNase, την ιντεγκράση (Integrase ή IN) και την πρωτεάση HIV (Reverse Protease ή PR). Η RT είναι σημαντική για τη μεταγραφή του DNA από το ιικό RNA, η IN είναι σημαντική στο να ενσωματωθεί το τελικό παραγόμενο δίκλωνο ιικό DNA στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή και τη πρωτεάση HIV, που είναι απαραίτητη για τη διάσπαση της πολυπρωτεΐνης gag και την παραγωγή των δομικών ιικών πρωτεϊνών. Το μη μεταφραζόμενο σήμα πακεταρίσματος ψ απαιτείται για την οργάνωση και τη συναρμολόγηση του ιικού RNA στο ιοσωμάτιο.

Όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιού, η εξωτερική επιφάνεια καλύπτεται από τον ιικό φάκελο που διαθέτει ένα διαμεμβρανικό και ένα επιφανειακό τμήμα, τα οποία λειτουργούν για την πρόσδεση του ιοσωματίου σε συγκεκριμένους υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή και είναι υπεύθυνα για τον τροπισμό του ιού (Herzog & Popplewell, 2020). Τα ιικά γονίδια περιβάλλονται από 2 ακραίες επιμήκειες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Long Terminal Repeat ή LTR) που εξυπηρετούν την ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ξενιστή ενώ λειτουργούν και σαν υποκινητές. Στον πυρήνα του ιού βρίσκονται οι δύο αλυσίδες RNA οι οποίες περιβάλλονται από το νουκλεοκαψίδιο.

2.1.2.2. Κύκλος πολλαπλασιασμού και εισαγωγή του ιού στα κύτταρα

Τα στάδια πολλαπλασιασμού των ρετροϊών ακολουθούν την ίδια πορεία και καταλύονται από τρία ένζυμα. Την πρωτεάση, την αντίστροφη μεταγραφάση και την ιντεγκράση (Choi & Samulski, 2010). Μετά την σύνδεση της γλυκοπρωτεΐνης του ιικού φακέλου στην πρωτεΐνη-υποδοχέα, η μεμβράνη του ρετροϊού αποικοδομείται, γίνεται μέρος του κυττάρου-ξενιστή και το RNA εισέρχεται στο κύτταρο. Η αντίστροφη μεταγραφάση μεταγράφει το RNA σε DNA (γνωστό ως cDNA) ενώ στη συνέχεια η πρωτεΐνη ιντεγκράση μεταφέρει το σύμπλοκο προ-ένθεσης του DNA του ιού που είναι συμπλεγμένο με τις ιικές πρωτεΐνες στον πυρήνα και το ενσωματώνει στο DNA του κυττάρου-ξενιστή. Με την ενσωμάτωση του ρετροϊού στο γονιδίωμα του κυττάρου, ο

ιός χρησιμοποιεί τον LTR υποκινητή του για να κατευθύνει την έκφραση των γονιδίων του (Choi & Samulski, 2010). Το 5' LTR πυροδοτεί τη μεταγραφή ενός μορίου RNA πλήρους μήκους που εξυπηρετεί δύο λειτουργίες: στη συρραμμένη του μορφή αποτελεί εκμαγείο για την παραγωγή των ικών πρωτεϊνών, ενώ στη μη συρραμμένη του μορφή αποτελεί το μόριο RNA που προορίζεται για τη δημιουργία ενός νέου ιικού σωματίου, εφόσον φέρει την αλληλουχία ψ. Μετά την αυτο-οργάνωση του ρετροϊκού σωματίου στο κυτταρόπλασμα, ο ιός εκβλαστάνει μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και περιβάλλεται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα προερχόμενη από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή (Rohini, 2014).

2.1.2.3. Κατηγοριοποίηση ρετροϊών με βάση τη θεραπευτική τους δράση

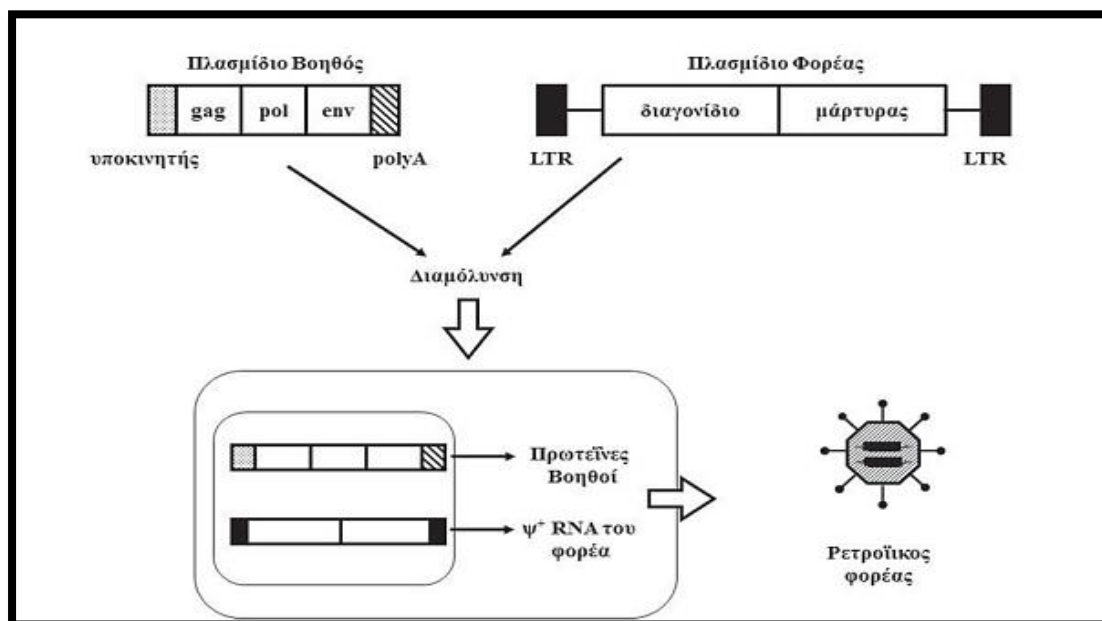
2.1.2.3.1. Ο ογκοϊός της λευχαιμίας του επίμυος (MLV, Murine Leukemia Virus)

2.1.2.3.1.1. Παραγωγή θεραπευτικών ρετροϊκών φορέων για τη χρωμοσωμική ενσωμάτωση των μεταφερόμενων γονιδίων

Το ικό γονιδίωμα των ρετροϊών μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο λειτουργικές μονάδες: αυτές που απαιτούνται *in cis* και αυτές που παρέχονται *in trans* (Honarparamooz et al., 2008). Οι *in cis* αλληλουχίες δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά είναι σημαντικές για την εγκαψιδίωση, την αντιγραφή και την εισαγωγή του ρετροϊού στο κύτταρο-ξενιστή. Σε αυτές περιλαμβάνονται οι ικές αλληλουχίες LTR, οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής, το σήμα πακεταρίσματος ψ και το τρινουκλεοτίδιο att που είναι παρόν στο άκρο των LTR, τα οποία απαιτούνται για την ένθεση του ικού γονιδιώματος.

Η παραγωγή των λειτουργικών φορέων προκύπτει με το διαχωρισμό του ικού γονιδιώματος σε δύο πλασμίδια που αντιστοιχούν στις λειτουργικές οντότητες *trans* και *cis* (**Εικόνα 7**). Το ένα πλασμίδιο αποτελεί το πλασμίδιο μεταφοράς ή πλασμίδιο-φορέα στο οποίο πλαισιώνονται μεταξύ των LTR αλληλουχιών οι *in cis* αλληλουχίες, το προς έκφραση γονίδιο και ένα γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικό (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018). Όταν γίνει η συνδιαμόλυνση των δύο πλασμιδίων σε ένα κύτταρο-στόχο, το πλασμίδιο-φορέας παράγει ένα μόριο RNA που φέρει την αλληλουχία ψ. Ο σχηματισμός του μορίου ψ+RNA επικαλύπτεται από τις ρετροϊκές πρωτεΐνες και απελευθερώνεται από τα κύτταρα ως ένα ρετροϊκό σωματίο (Parrington, et al., 2011). Το δεύτερο πλασμίδιο παράγει όλες τις ικές πρωτεΐνες και αποτελεί το βοηθητικό πλασμίδιο ή πλασμίδιο πακεταρίσματος. Μετά την

συνδιαμόλυνση το ιοσωμάτιο είναι ικανό να μολύνει ένα άλλο κύτταρο αλλά, εφόσον δεν κωδικοποιεί στο γενετικό του υλικό κανένα άλλο δομικό ή λειτουργικό ιικό γονίδιο, περιορίζεται σε έναν μόνο κύκλο αντιγραφής. Όταν τα βοηθητικά πλασμίδια εντεθούν μόνιμα σε μία κυτταρική σειρά, και εκφράζουν τα γονίδια *gag*, *pol* και *env* ονομάζονται κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος (Darbey & Smith, 2018).



Εικόνα 7: Ο διαχωρισμός του ιικού RNA σε 2 πλασμίδια. Τα γονίδια που αναφέρονται αριστερά της εικόνας αντικατοπτρίζουν το πλασμίδιο βοηθό, που περιέχει τα απαραίτητα γονίδια για την παραγωγή ιικών πρωτεϊνών υπό τον αντίστοιχο υποκινητή έκφρασης. Το πλασμίδιο φορέας που φαίνεται δεξιά της εικόνας περιέχει το διαγονίδιο και το γονίδιο αντοχής σε αντιβιοτικό, που διευκολύνει στην επιλογή των σωστών ρετροϊκών φορέων. Από την συνδιαμόλυνση των δύο πλασμιδίων στο κύτταρο εκλογής προκύπτει ο τελικός ρετροϊκός φορέας [Προσαρμογή από (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018)].

Η παραγωγή ρετροϊκών φορέων με τη συνδιαμόλυνση των δύο πλασμιδίων οδηγεί πολλές φορές σε χαμηλούς ιικούς τίτλους και χρειάζεται βελτίωση, η οποία επιτυγχάνεται με ένα δεύτερο βήμα που αποσκοπεί στην απομόνωση κλώνων που παράγουν υψηλό φορτίο ιικών σωματίων (Darbey & Smith, 2018). Σε αυτό το στάδιο οι φορείς που προέκυψαν από τη διαμόλυνση, επιμολύνουν ξανά μια κυτταρική σειρά. Τα κύτταρα που προκύπτουν επιλέγονται εξαιτίας της ανθεκτικότητάς τους στο αντιβιοτικό (το γονίδιο ανθεκτικότητας πρέπει να κωδικοποιείται από τον ιικό φορέα) και οι ανθεκτικοί κλώνοι έπειτα ελέγχονται για την αλληλουχία τους και τον αριθμό των ιικών σωματίων που παρήχθησαν. Αυτοί οι κλώνοι-παραγωγοί αποτελούν μια αστείρευτη πηγή κυττάρων παραγωγής ιοσωματίων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε επαναλαμβανόμενα πειράματα (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018).

2.1.2.2.2. Λεντοϊοί (Lentivirus, LV)

2.1.2.2.2.1. Μορφολογικά χαρακτηριστικά του ιού

Οι λεντοϊοί ανήκουν στους ρετροϊούς, και είναι υπεύθυνοι για πολλές ασθένειες που χαρακτηρίζονται από αργή και προοδευτική πορεία. Μια από αυτές αποτελεί και το AIDS (acquired immune deficiency syndrome) (Sakuma, et al., 2012). Ένα από τα κυριότερα χαρακτηριστικά του είναι οι μεγάλες περίοδοι επώασης, γιατί μπορεί να ενσωματώσει ένα μεγάλο μέρος του ιικού συμπληρωματικού DNA του στο DNA του κυττάρου-ξενιστή (Nóbrega et al., 2020). Χαρακτηριστικά των λεντοϊών που τους ξεχωρίζουν από τους άλλους ρετροϊούς είναι ότι στο γονιδίωμά τους συμπεριλαμβάνονται πολλά μοναδικά βοηθητικά γονίδια, έχουν μια χαρακτηριστική σύνθεση νουκλεοτιδίων και μπορούν να μολύνουν μη διαιρούμενα κύτταρα-στόχους. Όσον αφορά τα ιοσωμάτια, περιβάλλονται από ιικό φάκελο και το σχήμα τους είναι σφαιρικό με διάμετρο 80-100 nm και στο περίβλημά τους προεξέχουν γλυκοπρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση με άλλα κύτταρα (Nóbrega et al., 2020). Τα τελευταία χρόνια οι λεντοϊικοί φορείς χρησιμοποιούνται ως ερευνητικά εργαλεία για την εισαγωγή γονιδίων. Οι λεντοϊοί μπορούν να μολύνουν ενδογενώς, καθώς ενσωματώνονται στο γονιδίωμα της βλαστικής σειράς του ξενιστή με αποτέλεσμα ο ιός να κληρονομείται και στους απογόνους. Αυτούς τους μηχανισμούς μόλυνσης των λεντοϊών χρησιμοποιεί η γονιδιακή θεραπεία για την εισαγωγή ή την αφαίρεση γονιδίων από το κύτταρο-ξενιστή, ώστε να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα.

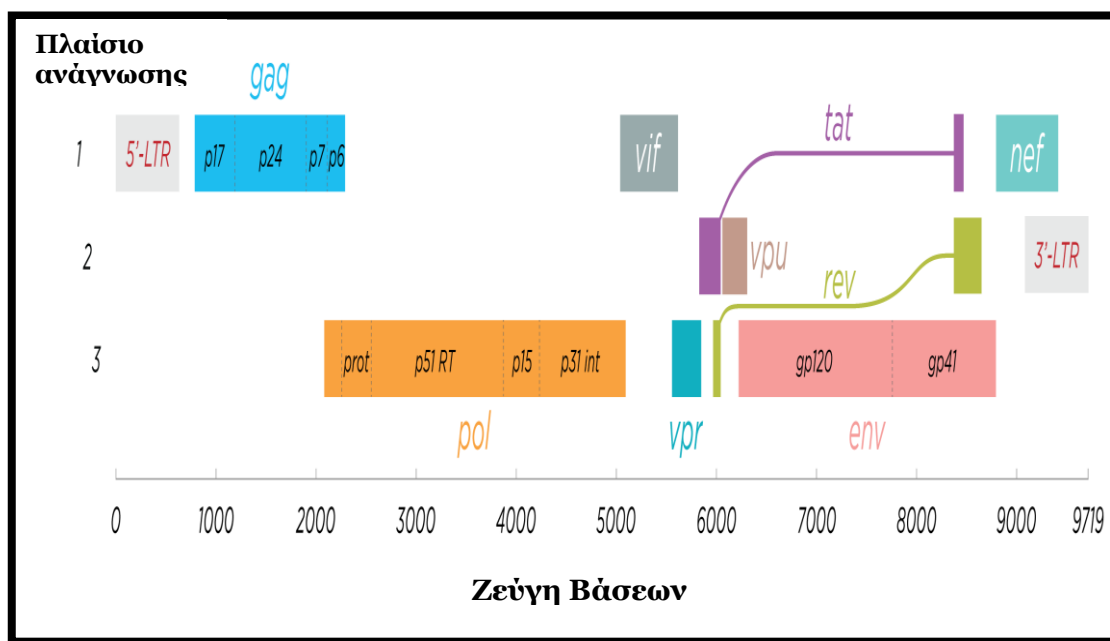
2.1.2.2.2.2. Οργάνωση του γονιδιώματος και πρωτεϊνική σύσταση

Επειδή οι λεντοϊοί ανήκουν στους ρετροϊούς, το γονιδίωμά τους αποτελείται από τα ίδια γονίδια, ενώ κωδικοποιούν δύο επιπλέον ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Tat και Rev) και τέσσερις βοηθητικές πρωτεΐνες (Vpr, Vif, Vpru και Nef). Όσο αφορά τη βοηθητική πρωτεΐνη Vpr, μαζί με την πρωτεΐνη ιντεγκράση και τις πρωτεΐνες της μήτρας, προσδίδουν από κοινού στους λεντοϊούς τη μοναδική ικανότητα να επιμολύνουν μη διαιρούμενα κύτταρα. Έτσι, οι λεντοϊοί μπορούν να μολύνουν ένα κύτταρο χωρίς να αποικοδομηθεί η πυρηνική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή (Sakuma, et al., 2012).

Η vpr (πρωτεΐνη R λεντοϊού) είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο στην αναπαραγωγή του ιού, και συγκεκριμένα στην πυρηνική εισαγωγή του συμπλέγματος προενσωμάτωσης. Μελέτες δείχνουν ότι η Vpr εξαναγκάζει τα κύτταρα-ξενιστές να σταματήσουν τον κυτταρικό τους κύκλο στη φάση G2. Έχει αναφερθεί ότι ο HIV-1 απαιτεί τη Vif για τη σύνθεση μολυσματικών ιών σε λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και συγκεκριμένες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Η πρωτεΐνη Nef (N-τερματική μυριστοϋλιωμένη φωσφοπρωτεΐνη) σχετίζεται με τη

μεμβράνη και εμπλέκεται σε πολλαπλές λειτουργίες κατά τη διάρκεια του κύκλου αναπαραγωγής του ιού. Η Vpu (κατηγορία I, ολιγομερής ενσωματωμένη φωσφοπρωτεΐνη μεμβράνης) είναι ειδική για τον HIV-1 και εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του υποδοχέα CD4 που περιλαμβάνει την οδό πρωτεασώματος, της ουβικιτίνης, καθώς και στη σωστή απελευθέρωση ισοσωματίων από τα μολυσμένα κύτταρα.

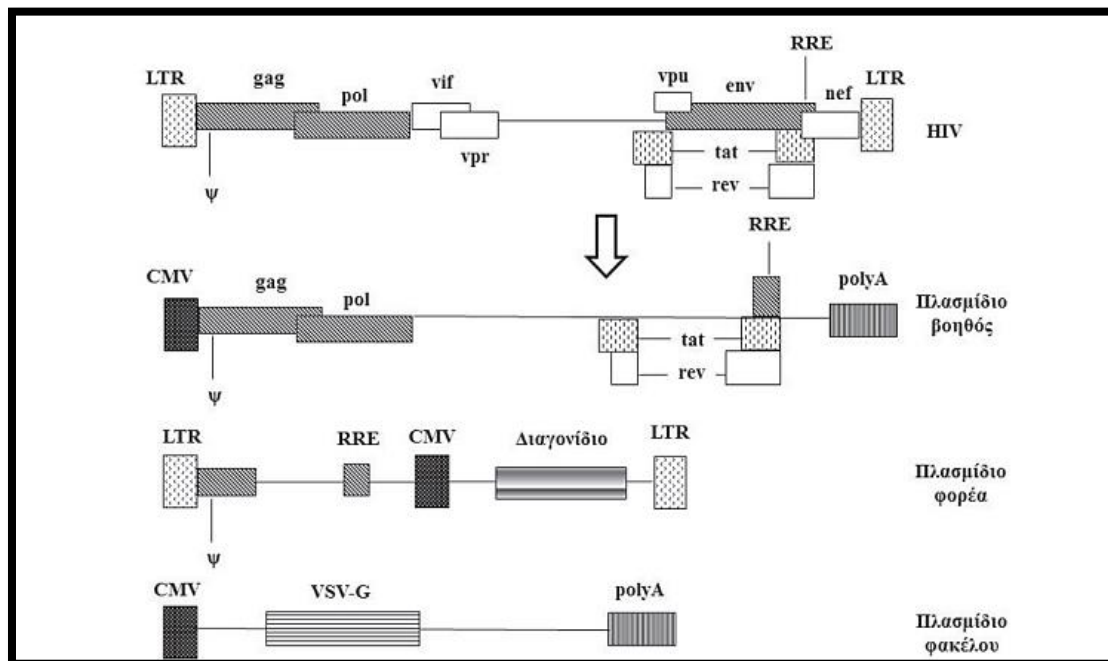
Το γονίδιο *tat* (HIV trans-ενεργοποιητής της μεταγραφής) βρίσκεται μόνο σε λίγα στελέχη HIV-1. Το γονίδιο *tat* ρυθμίζει την απελευθέρωση ισοσωματίων από μολυσμένα κύτταρα με την έκφραση της αντίστροφης μεταγραφής του RNA του ιικού γονιδιώματος, που εξασφαλίζει την τελική σύνθεση των ιικών mRNAs. Το γονίδιο *Rev* (ρυθμιστής έκφρασης πρωτεϊνών ισοσωματίων) κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *Rev* που δεσμεύεται στο γονιδίωμα του ιού μέσω ενός πλούσιου σε αργινίνη μοτίβου δέσμησης RNA το οποίο δρα επίσης ως NES (Nuclear export signal, σήμα εξόδου από τον πυρήνα) και απαιτείται για τη μεταφορά του *Rev* από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα κατά την αναπαραγωγή του ιού. Ακόμα το γονίδιο *Rev* είναι σημαντικό για τη σύνθεση των κύριων ιικών πρωτεϊνών, και ως εκ τούτου είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του ιού.



Εικόνα 8: Το χαρακτηριστικό γονιδίωμα ενός λεντοϊού. Έμφαση πρέπει να δοθεί στα μοναδικά γονίδια του ιού που τον ξεχωρίζουν από τους υπόλοιπους ρετροϊούς. Πρόκειται για αυτά που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες (*Tat* και *Rev*) και τέσσερις βοηθητικές πρωτεΐνες (*Vpr*, *Vif*, *Vpu* και *Nef*) [Προσαρμογή από (Splettstoesser 2014)].

2.1.2.2.3. Η χρήση τους ως φορείς για την παράδοση γονιδίων

Όσον αφορά την κλινική έρευνα, έχουν χρησιμοποιηθεί στη γονιδιακή θεραπεία ως φορείς για τη θεραπεία ασθενειών όπως η αιμορροφιλία A, ο καρκίνος του προστάτη, οι αγγειακές παθήσεις και ο σακχαρώδης διαβήτης (Herzog & Popplewell, 2020). Επειδή ο λεντοϊός αποτελεί παθογόνος ιός για τον άνθρωπο, πρέπει πρώτα να τροποποιηθεί γενετικά, ώστε να αφαιρεθούν οι παθογονικές ιδιότητές του, δηλαδή η ικανότητά του να αναπαράγεται τόσο έντονα (Milone & O'Doherty et al., 2018). Αυτό γίνεται με την απαλοιφή ικών γονιδίων που δεν είναι απαραίτητα για τη μεταφορά των θεραπευτικών διαγονιδίων για τη γονιδιακή θεραπεία (Yip et al., 2020; Kotterman et al., 2015). Πλέον αυτό που γίνεται στην πράξη είναι η απαλοιφή γονιδίων από τις γενετικές περιοχές *Gag* και *Env* καθώς έχει αποδεχθεί ότι ο ιός χάνει τη μολυσματικότητά του, χωρίς όμως να χάσει την αποτελεσματικότητά του στη γονιδιακή θεραπεία. Η γενετική τροποποίηση του λεντοϊού για την παραγωγή ενός αποτελεσματικού φορέα πλέον περιλαμβάνει λεντοϊικούς φορείς τρίτης γενιάς, που αποτελούνται από τρία πλασμίδια (Εικόνα 9). Ειδικότερα περιλαμβάνουν δύο ξεχωριστά πλασμίδια συσκευασίας (ένα για την κωδικοποίηση των γονιδίων *Gag* και *Pol*, και ένα για την κωδικοποίηση των γονιδίων *Rev*), καθώς και ένα επιπλέον πλασμίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη φακέλου, που προέρχεται από τον VSV-G (vesicular stomatitis virus, ιός φυσαλιδώδους στοματίτιδας) (Maetzig, et al., 2011).



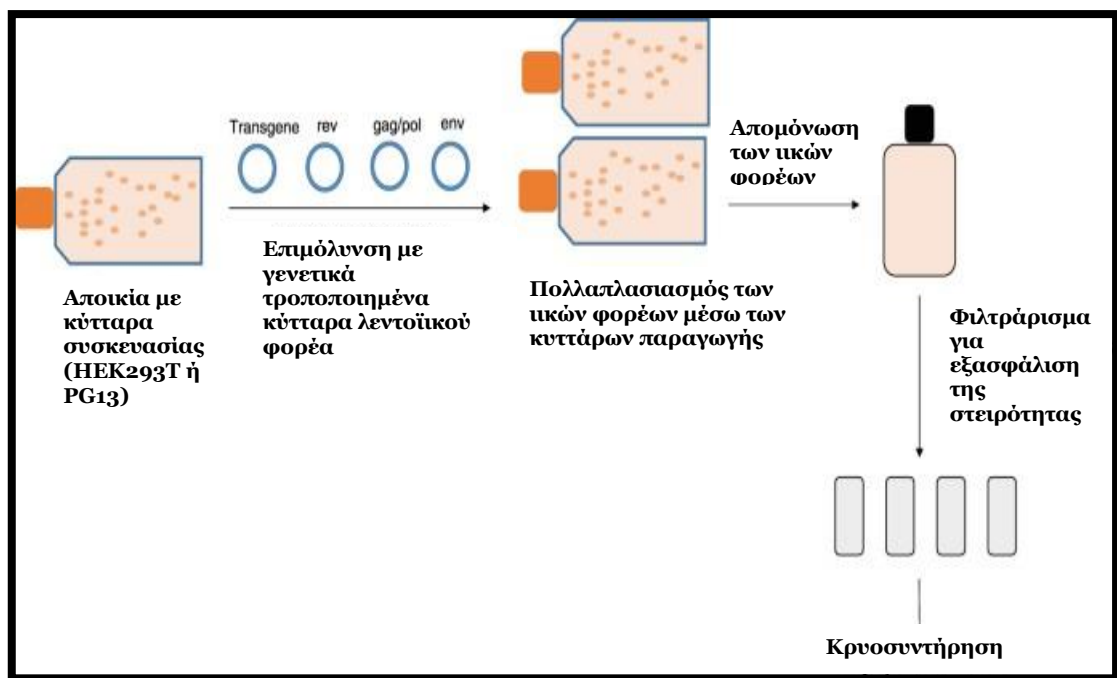
Εικόνα 9: Λεντοϊκός φορέας τρίτης γενιάς. Η παραγωγή του λεντοϊκού φορέα προϋποθέτει τη συν-διαμόλυνση με πλασμίδια πακεταρίσματος και με το πλασμίδιο του φορέα, και η συλλογή των ισοσωματιών πραγματοποιείται 2-3 μέρες αργότερα. Στο πλασμίδιο βοηθό έχει αντικατασταθεί ο 5'LTR υποκινητής από έναν ισχυρό υποκινητή (CMV), ο οποίος είναι πολύ ενεργός στην κυτταρική σειρά 293T που χρησιμοποιείται για την παραγωγή του φορέα. Στη συνέχεια, απαλείφθηκαν οι ικές πρωτεΐνες-βοηθοί που δεν ήταν απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού (*vpu*, *env*, *nef*, *vif*, *vpr*). Οι γονιδιακοί τόποι *tat* και *rev* διατηρήθηκαν

αφού αποδείχτηκε ότι διευκόλυναν την αποδοτική κυτταροπλασματική εξαγωγή και μετάφραση του RNA του φορέα. Στο πλασμίδιο φορέα, όλες οι *in cis* αλληλουχίες (LTR, RRE και ψ) έχουν διατηρηθεί. Η έκφραση του διαγονιδίου ορίζεται από έναν υποκινητή (όπως είναι ο υποκινητής του κυτταρομεγαλιού). Η ανάπτυξη των λεντοϊκών φορέων απαιτούσε αλλαγή στον τροπισμό του ιού από τον φυσικό του υποδοχέα (CD4 μόριο) και επετεύχθη με την ψευδοτύπωση του φορέα με τον φάκελο του ιού της φυσαλιδώδους στοματίτιδας (VSV-G), μέσω του πλασμιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη φακέλου του ιού VSV-G. Οι ιικοί φορείς παράγονται μέσω παροδικής διαμόλυνσης της κυτταρικής σειράς 293T και με τα τρία πλασμίδια [Προσαρμογή από (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018)].

2.1.2.2.1.4. Παραγωγή λεντοϊκών φορέων σε μεγάλες ποσότητες

Η μεγάλης κλίμακας κατασκευή φορέων ξεκινά με την ανάπτυξη ενός επαρκούς αριθμού αυτών των κυττάρων συσκευασίας, όπως είναι τα παράγωγα της κυτταρικής σειράς HEK293T (Yip et al., 2020; Popescu et al., 1990). Ένα κλάσμα των κυττάρων αυτών αναπαράγεται για αρκετές ημέρες σε καλλιέργεια, προτού τα κύτταρα στη συνέχεια διαμολυνθούν παροδικά με πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί τις απαραίτητες πρωτεΐνες για την παραγωγή λεντοϊκού φορέα. Αυτά τα πλασμίδια περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη φακέλου (συνήθως VSV-G), προϊόντα των γονιδίων HIV-1 *gag* και *pol*, και βοηθητικές πρωτεΐνες για την παραγωγή ιικών σωματιδίων HIV (Check 2005; Check et al., 2002; Yip et al., 2020). Η παρουσία όλων των παραπάνω συστατικών είναι απαραίτητη για να παράχθουν λειτουργικά σωματίδια φορέα από την κυτταρική σειρά.

Για αρκετές ημέρες, τα κύτταρα συσκευασίας παράγουν τα ιικά σωματίδια φορέα λεντοϊού, τα οποία μπορούν να συλλεχθούν από το μέσο καλλιέργειας. Εφόσον ολοκληρωθεί η διήθηση ροής, ο φορέας υποβάλλεται σε γενετική επεξεργασία με σκοπό να αφαιρεθούν τα υπολοίματα μολυσμένου DNA. Με καθαρισμό βαθμίδωσης πυκνότητας ή χρωματογραφία τα τελικά ιικά προϊόντα καθαρίζονται. Μετά τον καθαρισμό, για σκοπούς αποστείρωσης τα εκλουόμενα κλάσματα υποβάλλονται σε μια σειρά από στάδια διήθησης για την πετυχημένη απομάκρυνση τυχόν εναπομεινάντων κυτταρικών υπολειμμάτων (Banasik et al., 2010; Yip et al., 2020). Η καθαρότητα του τελικού προϊόντος αποτελεί κρίσιμο σημείο, αφού τα υπολείμματα από τα κύτταρα συσκευασίας μπορούν εύκολα να συλλεχθούν μαζί με το προϊόν του φορέα και αυτό ενδέχεται να προκαλέσει φλεγμονώδεις αποκρίσεις *in vitro* και *in vivo*. Από τη στιγμή που θα απομονωθούν καθαρά αποθέματα φορέα, είναι απαραίτητο να παραμένουν σταθερά για έως και 9 χρόνια όταν κρυοσυντηρηθούν στους -80 °C.



Εικόνα 10: Παραγωγή λεντοϊκών φορέων σε μεγάλες ποσότητες. Η κατασκευή ενός φορέα λεντοϊού ξεκινά με την καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς HEK293T κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες. Τα κύτταρα συνδιαμολώνονται με τα πλασμίδια που συνθέτουν τον λεντοϊκό φορέα τρίτης γενιάς και τα προκύπτοντα κύτταρα που παράγουν τον τελικό φορέα μεταφέρονται σε καλλιέργεια. Ο φορέας καθαρίζεται από τα κύτταρα και τα υπολείμματα καλλιέργειας, και φιλτράρεται για να εξασφαλιστεί η στειρότητα ενώ το τελικό προϊόν κρυοσυντηρείται [Προσαρμογή από (Michael et al., 2018)].

2.1.3. Αδενοϊοί (Adenovirus, Ad)

2.1.3.1. Γενική περιγραφή του ιού

Σήμερα έχουν απομονωθεί 49 διαφορετικοί ορότυποι αδενοϊού που μολύνουν τον άνθρωπο. Οι αδενοϊοί προσβάλλουν κυρίως τα κύτταρα του πνεύμονα και αποτελούνται από δίκλωνο DNA (36Kb) το οποίο περιβάλλεται από ένα εικοσαεδρικό καψίδιο. Το μεγαλύτερο μέρος του αποτελείται από εξόνη, που σχηματίζει ράβδους οι οποίες προεξέχουν στο καψίδιο του αδενοϊού (Lee et al., 2017; Yip et al., 2020). Μέσω αυτών των ράβδων ο ιός προσκολλάται και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του αδενοϊού Coxsackie (CAR, δέσμευση υψηλής συγγένειας) και της βάσης πεπτόνης με την ιντεγκρίνη. Μετά την αλληλεπίδραση, ο αδενοϊός ενδοκυτταρώνεται και εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου-ξενιστή όπου γίνεται η αντιγραφή του. Διαθέτει μεγάλο και πολύπλοκο γονιδίωμα (Yip et al., 2020; Muruve et al., 2004), και ειδικότερα οργανώνεται σε 4 κωδικοποιητικές περιοχές (E1 έως E4), οι οποίες περιβάλλονται από δύο ακραίες πλευρικές επαναλήψεις (ITR) και ενεργοποιούν το πακετάρισμα του ιού. Η περιοχή E1 κωδικοποιεί αποπτωτικές πρωτεΐνες που επάγουν το θάνατο του κυττάρου-ξενιστή και η δράση τους εξισορροπείται από μία ομάδα πρωτεϊνών, που κωδικοποιούνται από την περιοχή E2. Η περιοχή E3 κωδικοποιεί πρωτεΐνες που τροποποιούν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή και η E4 πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την όψιμη γονιδιακή έκφραση (Quantin et al., 2022).

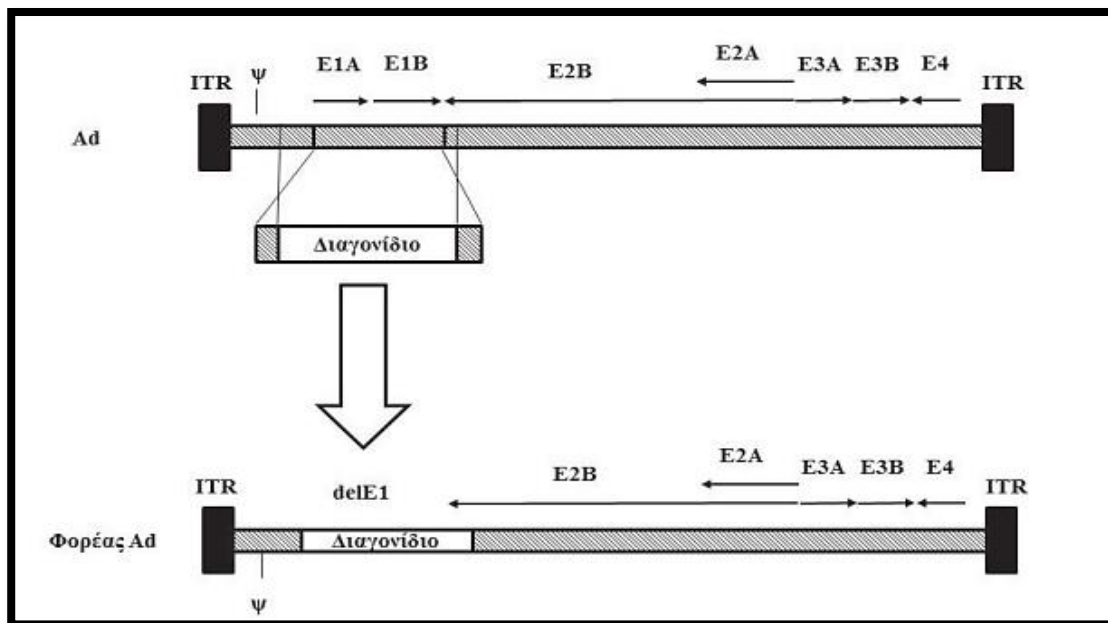
2.1.3.2. Παραγωγή αδενοϊκών φορέων και θεραπευτικές χρήσεις τους

Ως φορείς γονιδιακής θεραπείας χρησιμοποιούνται ευρέως οι ορότυποι 2 και 5 του αδενοϊού, καθώς σε κλινικές μελέτες αυτοί είχαν το μεγαλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα χωρίς την πρόκληση παθογένειας. Όπως στους ρετροϊούς, έτσι και εδώ χρησιμοποιείται ένα πλασμίδιο ως βοηθός και ένα πλασμίδιο φορέας για την έκφραση των θεραπευτικών γονιδίων (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020). Αναφορικά με την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα, οι αλληλουχίες του αδενοϊού που είναι απαραίτητες *in cis* διατηρούνται, ενώ η γονιδιακή κατασκευή του πλασμιδίου-βοηθού παρέχει τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη συναρμολόγηση του ιικού φορέα.

Αρχικά πρέπει να γίνει απαλοιφή γονιδίων του αδενοϊού μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ 2 στοιχείων (**Εικόνα 11**): ενός πλήρους αδενοϊκού γονιδιώματος και ενός πλασμιδίου που φέρει ένα διαγονίδιο το οποίο περιβάλλεται από αλληλουχίες ομόλογες με τις περιοχές στις οποίες πρόκειται να πραγματοποιηθεί η ένθεση (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Το γονίδιο E1 που ήταν υπεύθυνο για τον πολλαπλασιασμό του αδενοϊού απαλείφεται και ακολουθεί αντικατάσταση από το επιθυμητό γονίδιο. Στη συνέχεια οι ιικοί φορείς παράγονται στην κυτταρική σειρά 293T, η οποία περιέχει ήδη τις πρωτεΐνες E1.

Αυτό το σύστημα είναι σημαντικό και μπορεί να παράγει συνήθως 10^{11} ιοσωμάτια/ml. Παρόλα αυτά, οι φορείς με απαλοιφή της περιοχής E1 έχουν περιορισμένη κλωνοποιητική χωρητικότητα (περίπου 7kb) και διατηρούν ένα βαθμό κυτταροτοξικότητας αφού το 80% του ιικού γονιδιώματος διατηρείται (Gardlík, et al., 2005). Οι προσπάθειες επίλυσης του προβλήματος αυτού έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη φορέων με μεγαλύτερες απαλοιφές, όπως απαλοιφή E1/E2 και E3/E456.

Οι αδενοϊκοί φορείς είναι ικανοί να επιμολύνουν ένα μεγάλο εύρος διαιρούμενων και αδρανών κυττάρων, όπως είναι τα επιθηλιακά κύτταρα αεραγωγών, τα ηπατοκύτταρα και μεγάλο αριθμό νεοπλασμάτων. Ωστόσο, πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αρκετοί αδενοϊκοί φορείς επιδεικνύουν γονιδιωματική αστάθεια και ενδέχεται να αποδώσουν χαμηλούς ιικούς τίτλους (Lukashev & Zamyatnin, 2016).



Εικόνα 11: Αναπαράσταση της παραγωγής του ανασυνδυασμένου αδενοϊκού φορέα. Το γονιδίωμα του αδενοϊού (36kb) φαίνεται στο επάνω μέρος της εικόνας. Το γονιδίωμα οργανώνεται σε τέσσερις λειτουργικές ενότητες (E1 έως 4) που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες. Αυτές οι περιοχές πλαισιώνονται από δύο ανεστραμμένες ακραίες επαναλήψεις (ITR) και το σήμα πακεταρίσματος ψ βρίσκεται δίπλα στο 5' ITR. Η παραγωγή του Ad φορέα με διαγραμμένο το E1 τμήμα, εξαρτάται από τον επιτυχή ανασυνδυασμό μεταξύ του Ad γονιδιώματος και ενός πλασμιδίου που φέρει το επιθυμητό γονίδιο (διαγονίδιο). Το διαγονίδιο πλαισιώνεται από τις αλληλουχίες ψ και E2B. Μετά από διαμόλυνση της 293T κυτταρικής σειράς και με τα δύο πλασμίδια, ο ανασυνδυασμός μεταξύ των ομόλογων περιοχών έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή του διαγονιδίου στο γονιδίωμα του Ad και την απαλοιφή της περιοχής E1 [Προσαρμογή από (Βασιλόπουλος & Σημαντηράκης, 2018)].

2.1.4. Βακουλοϊοί

2.1.4.1. Η δομή των βακουλοϊών και η είσοδός τους με τη μεσολάβηση του ιικού υποδοχέα GP64 σε κύτταρα θηλαστικών

Οι βακουλοϊοί (BV) αποτελούν μια οικογένεια ιών, των οποίων φυσικοί ξενιστές είναι τα αρθρόποδα, τα λεπιδόπτερα, τα υμενόπτερα και τα δίπτερα. Ο πιο καλά μελετημένος βακουλοϊός είναι ο καψιδιακός πολλαπλός πυρηνικός πολυεδρικός ιός *Autographa californica* (*Autographa californica* Multiple Nucleopolyhedrovirus ή AcMNPV) (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021).

Οι βακουλοϊοί αποτελούνται από δίκλινα, κυκλικά, υπερελικωμένα γονιδιώματα, με εύρος μεγεθών που ποικίλλουν από περίπου 80 kb έως και περισσότερα από 180 kb, και αυτό τους καθιστά μια ετερογενή ομάδα ιών, αφού κωδικοποιούν από 90 έως 180 γονίδια. Στους πιο καλά χαρακτηρισμένους βακουλοϊούς, τα ισοσώματα είναι παρόντα με τη μορφή δύο τύπων, τα έγκλειστα ισοσώματα (ODV, occlusion-derived virions) και τα εκβλαστημένα ισοσώματα (BV, budded virions). Αν και αυτοί οι δύο τύποι ισοσωμάτων είναι παρόμοιοι ως προς τη δομή των νουκλεοκαψιδίων τους, διαφέρουν ως προς την προέλευση και τη σύνθεση των περιβλημάτων τους και τους ρόλους τους στον κύκλο ζωής του ιού (Hagey et al., 2021 ; Zhao et al., 2021).

Το τελικό περίβλημά των βακουλοϊών προκύπτει από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή και αφομοιώνουν μια γλυκοπρωτεΐνη gp64, προκειμένου να είναι σε θέση να προκαλέσουν έντονη μόλυνση. Τα πεπλομερή που σχηματίζουν αποτελούν μια ομάδα πρωτεϊνών οι οποίες σχηματίζουν δομές, στο ένα άκρο του ιού με εκβλάστηση.

Ο κύκλος ζωής των βακουλοϊών χωρίζεται σε δύο διαφορετικές μορφές: τον πολλαπλασιασμό που προέρχεται από το έγκλειστο σωματίο ιό (ODV) που είναι υπεύθυνος για την πρωτογενή μόλυνση του ξενιστή, και τον πολλαπλασιασμό του εκβλαστημένου ιού (BV) που απελευθερώνεται από τα μολυσμένα κύτταρα του ξενιστή καθυστερημένα κατά τη φάση της δευτερογενούς μόλυνσης. Όταν γίνει η μόλυνση του ξενιστή από τους βακουλοϊούς, η πρωτεϊνική μήτρα πολυεδρίνης που περικλείει τους βακουλοϊούς διαλύεται και τα ιοσωμάτια απελευθερώνονται στο έντερο του ξενιστή απελευθερώνοντας ODVs.

Οι βακουλοϊοί έχουν ευρείς τροπισμούς που επιτρέπουν την είσοδό τους, όχι μόνο στα κύτταρα των εντόμων-ξενιστών αλλά και σε διάφορα κύτταρα θηλαστικών μέσω της γλυκοπρωτεΐνης του φακέλου GP64 (Jeppesen et al., 2019; Kalluri & LeBleu, 2020). Αν και επικρατεί ασάφεια σχετικά με τους σημαντικούς υποδοχείς που απαιτούνται για την είσοδο των βακουλοϊών σε διάφορους τύπους κυττάρων, υπάρχουν πληροφορίες για παράγοντες του ξενιστή που εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις με τον GP64 (Chirackal et al., 2019). Αρχικά, έχει διατυπωθεί ότι η γλυκοπρωτεΐνη GP64 μπορεί να συνδεθεί με την πρωτεογλυκάνη θειικής ηπαρίνης (HSPG) στην κυτταρική επιφάνεια μέσω του υποδοχέα πρόσδεσης της ηπαρίνης (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021). Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με άλλους υποδοχείς της οικογένειας HSPG, οι οποίοι βρίσκονται κυρίως σε επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα πλάσματος, ο υποδοχέας GP64 αναγνωρίστηκε σε κύτταρα θηλαστικών, αλλά τα επίπεδα έκφρασής του και η συγγένεια πρόσδεσης στους βακουλοϊούς δεν συσχετίστηκαν. Επιπλέον ο GP64 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα φωσφολιπίδια της κυτταρικής επιφάνειας.

2.1.4.3. Βακουλοϊοί ως συστήματα παράδοσης γονιδίων

2.1.4.3.1. Σύστημα βακουλοϊοών-Sf9

Η παραγωγή του συστήματος baculovirus-Sf9 rAAV βασίζεται στον τρόπο έκφρασης των βακουλοϊών, δηλαδή στην ικανότητα χρήσης του υποκινητή της πρωτεΐνης πολυεδρίνης των βακουλοϊών ώστε να οδηγήσει σε πολύ υψηλή πρωτεϊνική έκφραση (Jeppesen et al., 2019; Kalluri & LeBleu, 2020). Στο συγκεκριμένο σύστημα ανακαλύφθηκε ότι τα κύτταρα εντόμων (Sf9) που υποβλήθηκαν σε λυτική μόλυνση με βακουλοϊούς ήταν σε θέση αφενός να υποστηρίξουν τις λειτουργίες του

βοηθητικού ιού αφετέρου δε να προσλάβουν τόσο το κατασκεύασμα rep/cap όσο και το προϊκό πλασμίδιο rAAV. Όπως και με το σύστημα rAAV, το σύστημα βακουλοϊών έχει αποδειχθεί ότι έχει μεγάλη δυνατότητα επέκτασης και προσαρμογής της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα την καθαρή παραγωγή παρασκευασμάτων rAAV πολύ υψηλού τίτλου.

2.1.4.3.1. Συστήματα BacMam

Για να εκφραστούν ξένα γονίδια, πρέπει να αναγνωριστεί ο υποκινητής του ιού ή των θηλαστικών. Οι ιικοί υποκινητές p10 και η πολυεδρική έχουν χρησιμοποιηθεί πιο συχνά για την ενεργοποίηση της μεταγραφής λόγω της υψηλής έκφρασης των γονιδίων που ελέγχουν (Tan et al., 2021; Zhang et al., 2022). Ωστόσο, ένας υποκινητής θηλαστικού μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να καθοδηγήσει την έκφραση ενός ετερόλογου γονιδίου μετά από ιική μεταγωγή, μέσω της τεχνολογίας παράδοσης γονιδίων BacMam.

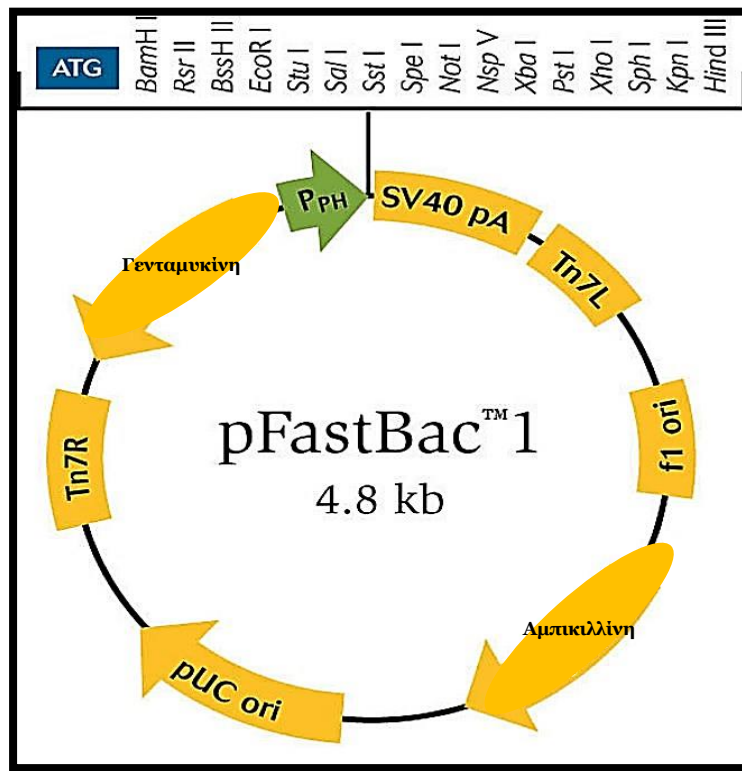
Η τεχνολογία αυτή αποτελεί ένα παροδικό σύστημα έκφρασης, το οποίο διευκολύνει την έκφραση γονιδιακών προϊόντων, αφού το γονιδίωμα των βακουλοϊών έχει μεγάλη χωρητικότητα για την εισαγωγή ενός ξένου γονιδίου και μάλιστα έχει δοκιμαστεί με επιτυχία η εισαγωγή γονιδίων μεγέθους έως και 38kb (Chirackal et al., 2019). Το σύστημα BacMam μπορεί να υποστηρίξει την εισαγωγή μεγάλων γονιδίων αλλά προσφέρει παροδική έκφραση διάρκειας τεσσάρων ημερών.

Μερικοί υποκινητές θηλαστικών που χρησιμοποιούνται για την έναρξη της γονιδιακής μεταγραφής περιλαμβάνουν τις μεγάλου μήκους τερματικές επαναλήψεις του ιού του σαρκώματος Rous (RSV-LTR), τον κυτταρομεγαλοϊό (CMV), τον ιό πιθήκου 40 (SV40), τη βήτα-ακτίνη κοτόπουλου (CAG), τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV), τον ανθρώπινο υποκινητή α-φetoπρωτεΐνης/ουβικιτίνης C και τον υποκινητή πρωτεΐνης θερμικού σοκ της *Drosophila* 70 (To et al., 2017; Weingrill et al., 2021; Zhu et al., 2021). Συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί για την ενεργοποίηση υποδοχέων διάφορων θηλαστικών σε βακουλοϊούς, η εισαγωγή μιας επιπλέον ομόλογης περιοχής και έχει ως αποτέλεσμα τη βελτιωμένη σταθερότητα του ιού, την υπερέκφραση του διαγονιδίου και την επιτυχημένη παρατεταμένη έκφρασή του. Έκτοτε έχει παραχθεί ένας φορέας BacMam διπλής έκφρασης (BV-Dual-s1), με το σύστημα αυτό να ενσωματώνει τη γλυκοπρωτεΐνη s1 του ιού της λοιμώδους βρογχίτιδας των πτηνών με τη γλυκοπρωτεΐνη AcMNPV gp64 που εμφανίζει το S1-gp64 στην επιφάνεια του ιού. Επιπλέον, η γλυκοπρωτεΐνη G του ιού VSV-G έχει ενσωματωθεί υπό τον έλεγχο του υποκινητή p10 επιτρέποντας την εμφάνιση της επιφάνειας του ιού, την ενισχυμένη μεταγωγή και την παρατεταμένη της έκφραση. Ωστόσο, αυτό το σύστημα μπορεί να

προκαλέσει ισχυρή χυμική και κυτταρική ανοσία (Jeppesen et al., 2019; Kalluri & LeBleu, 2020).

2.1.4.3.2. Ομόλογος Ανασυνδυασμός και Μεταφορά

Οι πρώτοι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί (rBVs) δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας ομόλογο ανασυνδυασμό σε κύτταρα εντόμων. Στη συνέχεια αναπτύχθηκε το σύστημα Bacmid, το οποίο χρησιμοποιεί βακτηριακά τεχνητά χρωμοσώματα που περιέχουν τον αντιγραφικό παράγοντα του βακτηρίου *E. coli*, το οποίο είναι ενσωματωμένο σε ένα κυκλικό υπερελικωμένο πλασμίδιο (Chirackal et al., 2019). Το σύστημα γενετικής τροποποίησης Bacmid μπορεί να τροποποιήσει γονιδιακά τμήματα μεγέθους μέχρι 300 Kb και μπορούν να τροποποιηθούν χρησιμοποιώντας τον ετερόλογο ανασυνδυασμό. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός μπορεί επίσης να διαγράψει τα γονίδια του ικού φορέα, ενώ επιδιορθώνει ένα σημαντικό για την αντιγραφή του γονίδιο, όπως το γονίδιο *orf1629* (απαραίτητο για την αντιγραφή του ιού) ή ακόμα και τα γονίδια *p10* (απαραίτητα για την έκφραση του ιού και τη δημιουργία των ικών σωματιδίων) (Alastair, 2013). Ωστόσο, η μεταγωγή με αυτή την τεχνική έχει απόδοση μόνο 1%. Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη της μεθόδου flashBAC, η οποία αποτελείται από ένα μερικώς διαγραμμένο γονίδιο *orf1629*, έτσι ώστε ο τελικός ομόλογος ανασυνδυασμός να μπορεί να επαναφέρει τη λειτουργία του *orf1629* ενώ απαλείφει τις μη απαραίτητες βακτηριακές αλληλουχίες. Μόνο τα rBV έχουν λειτουργικό γονίδιο *orf1629* και μπορούν να αναπαραχθούν επιτρέποντας ευκολότερο ανασυνδυασμό. Άλλα γονίδια βακουλοϊών έχουν επίσης απαλειφθεί με κυριότερο σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας και της απόδοσης για την παραγωγή των τελικών ξένων πρωτεϊνών.



Εικόνα 12: Ένα από τα πρώτα και πιο χρησιμοποιούμενα συστήματα είναι το σύστημα Bac-to-Bac. Αυτό το σύστημα απεικονίζει τους δύο δείκτες επιλογής αντιβιοτικών (αμπικιλίνη και γενταμικίνη) με ένα ενδιάμεσο πλασμίδιο μεταφοράς για την εισαγωγή και τη ειδικευμένη γονιδιακή μεταφορά του ξένου διαγονιδίου. Στην εικόνα φαίνεται η χρήση του αντιβιοτικού γενταμικίνη. Συγκεκριμένα, με τη μεσολάβηση του στοιχείου-μεταφορέα Tn7L σε *E. coli* κατευθύνεται η ενσωμάτωση του επιθυμητού γονιδίου και η έκφραση που παράγει ανασυνδυασμένους βακουλοϊούς [Προσαρμογή από (Alastair, 2013)].

Το σύστημα Bac-to-Bac είναι το μόνο σύστημα που παράγει 100% καθαρούς ανασυνδυασμένους βακουλοϊούς (rBVs) χωρίς να απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός (Alastair, 2013). Ένα κοινό σύστημα γενετικής τροποποίησης, το Bac-2-the-Future (B2F), αναπτύχθηκε με πρότυπη τη συγκεκριμένη μέθοδο μεταφοράς με την χρήση του υποκινητή Tn7. Ωστόσο, ο δείκτης αντοχής στη γενταμικίνη αντικαταστάθηκε, μειώνοντας τον αριθμό των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και το τελικό μέγεθος του φορέα. Αυτά τα συστήματα βακουλοϊών παρέχουν τις βάσεις για τη συγκεκριμένη μορφή γονιδιακής παράδοσης, στο πλαίσιο της εξατομικευμένης ιατρικής, σε σύγκριση με την τυπική συστηματική χορήγηση κοινών φαρμάκων (Chirackal et al., 2019)

2.1.4.3.3. Χρήση βακουλοϊών για την παραγωγή ανασυνδυασμένων αδeno-σχετιζόμενων ικών φορέων

Πιο πρόσφατα, η ανάπτυξη συστημάτων φορέων έκφρασης βακουλοϊών για την παραγωγή φορέα του rAAV2 σε κύτταρα εντόμων SF9 έχει φανεί πολλά υποσχόμενη για την παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα. Σε αυτό το σύστημα γενετικής τροποποίησης, τα απαραίτητα συστατικά της παραγωγής AAV, συμπεριλαμβάνουν τις πρωτεΐνες Rep και Cap, καθώς και τα γονιδιώματα φορέων, που παρέχονται από ξεχωριστούς ανασυνδυασμένους βακουλοϊούς (Chirackal et al., 2019;). Οι λειτουργίες που εισάγει

ο Ad helper (βοηθητικός ιός) που χρειάζεται στα κύτταρα θηλαστικών, φαίνεται ότι δεν είναι απαραίτητος στα κύτταρα εντόμων ή παρέχονται από τους ίδιους τύπους βακουλίου.

Για τη σωστή διατήρηση της στοιχειομετρίας των ανφερόμενων πρωτεϊνών AAV, καθώς και για την αύξηση της απόδοτικής λειτουργίας των AAV, χρησιμοποιήθηκε ένα κωδικόνιο έναρξης της VP1 και ένας ασθενής υποκινητής προερχόμενος από τους βακουλίου που οδηγεί στην έκφραση του Rep78. Όπως αποκαλήφθηκε, οι φορείς AAV εμφάνισαν μολυσματικότητα παρόμοια με εκείνη των φορέων που δημιουργούνται σε κύτταρα θηλαστικών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Έτσι, το σύστημα καλλιέργειας εναιωρήματος βακουλίου-SF9 υπόσχεται να προσφέρει υψηλή απόδοση AAV (5×10^4 φορείς/κύτταρο) και παρέχει έναν εύκολο τρόπο για την παραγωγή φορέων AAV σε μεγάλη κλίμακα. Ωστόσο, όπως καταδεικνύεται, όλοι οι βοηθοί των βακουλίου ήταν επιρρεπείς σε κάποιες απαλοιφές γονιδίων κατά τη γενετική επεξεργασία με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση στους τίτλους των παραγόμενων rAAV. Ο διαχωρισμός του παλίνδρομου προσανατολισμού των γονιδίων *Rep* σε δύο ξεχωριστούς βοηθούς αύξησε τη σταθερότητα έκφρασης του Rep-helper. Ωστόσο, η χρήση βοηθητικών συστατικών βακουλίου συνιστάται για παραγωγή AAV σε μεγάλη κλίμακα (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021).

2.1.5. Βακτηριοφάγοι

2.1.5.1. Γονιδίωμα

Οι βακτηριοφάγοι (γνωστοί και ως φάγοι) αποτελούν ιούς που μολύνουν αποκλειστικά βακτήρια. Οι βακτηριοφάγοι, διαθέτουν όλα τα είδη γονιδιωμάτων (ssRNA, dsRNA, ssDNA, dsDNA), με την πλειοψηφία να περιέχει δίκλωνο DNA (Catalão et al., 2013). Ταξινομούνται στα Duplodnaviria, που ξεχωρίζουν λόγω του χαρακτηριστικού τους σχήματος. Γενικά οι βακτηριοφάγοι παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους, την οποία την παρατηρούμε μέσω του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, και διακρίνουμε τέσσερις διαφορετικούς τύπους: το εικοσαεδρικό καψίδιο, τη νηματοειδή δομή, το πολυμορφικό σχήμα και τη δυαδική μορφή (Chen and Abedon, 2012; Dąbrowska et al., 2005). Όλες οι δομές χαρακτηρίζονται από κάποια κοινά χαρακτηριστικά, που είναι η κεφαλή και το καψίδιο (συνήθως ισοεδρικό), που περιέχει το γονιδίωμα του ιού. Πέραν αυτού όμως, η πλειοψηφία τους φέρει και μία ουρά, που είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του είδους, η οποία αποτελείται από έναν πρωτεϊνικής φύσεως άδειο σωλήνα, μέσω του οποίου

κατά τη φάση της μόλυνσης το γονιδίωμα εισέρχεται απευθείας στο εσωτερικό του βακτηρίου (Chennoufi et al., 2004).

Το ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses, Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών) έχει ταξινομήσει όλους τους φάγους με βάση το γονιδίωμά τους σε 1 τάξη, 13 οικογένειες και 31 γένη. Οι οικογένειες των φάγων Myoviridae, Siphoviridae και Podoviridae είναι οι πιο συχνές, και αποτελούν περίπου το 96% του συνόλου των φάγων που περιέχουν dsDNA γονιδίωμα. Σε αυτές τις οικογένειες, τα γονίδια που απαιτούνται για τη δημιουργία ενός ολοκληρωμένου βακτηριοφάγου χωρίζονται σε πέντε κατηγορίες: τη ρύθμιση των δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου, της ουράς και των ινιδίων, τα ένζυμα για την αντιγραφή του γονιδιώματος, τα ένζυμα για τη συσκευασία (packaging) του γονιδιώματος, τους ρυθμιστές μεταγραφής και τα λυτικά ένζυμα.

2.1.5.2. Αντιγραφή

2.1.5.2.1. Λυτικός κύκλος και λυσιγονικός κύκλος

Ο πολλαπλασιασμός των βακτηριοφάγων μπορεί να ακολουθήσει είτε την λυτική, είτε την λυσιγονική πορεία. Στους λυτικούς φάγους (π.χ. φάγος T4), τα βακτηριακά κύτταρα λύνονται και καταστρέφονται μετά από την αντιγραφή του ιού. Μόλις καταστραφεί το κύτταρο, οι απόγονοι των φάγων μπορούν να βρουν νέους ξενιστές για να μολύνουν. Οι λυτικοί φάγοι αποτελούν επιλογή στη γονιδιακή θεραπεία (Hyman and Abedon, 2010)

Οι λυσιγονικοί φάγοι ή προφάγοι (βακτηριοφάγος λ), έχουν την ικανότητα να εισέρχονται στο βακτηριακό γονιδίωμα μέσω της διαδικασίας της μεταγωγής (οριζόντιας μεταφοράς γενετικού υλικού), με το κύτταρο του ξενιστή να μην οδηγείται σε άμεση λύση (Wittebole et al., 2013 ; Ackermann, 2007; Dąbrowska et al., 2005). Το ικό τους γονιδίωμα θα ενσωματωθεί στο DNA του ξενιστή, όπου θα αντιγραφεί μαζί με αυτό, ή/και μπορεί να βρεθεί και ως μέρος του πλασμιδιακού γενετικού υλικού. Ο λυσιγονικός κύκλος επιτρέπει τον βακτηριοφάγο να συνεχίσει να επιβιώνει και να αναπαράγεται μέσα στο κύτταρο ξενιστή και έτσι είναι ικανός να αναπαράγεται και σε όλους τους απογόνους του κυττάρου. Ο ιός παραμένει σε αδρανή φάση έως ότου επιδεινωθούν οι συνθήκες διαβίωσης του κυττάρου ξενιστή, λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών με αποτέλεσμα οι ενδογενείς φάγοι να ενεργοποιηθούν (Leiman and Shneider, 2012). Σε αυτό το σημείο ξεκινούν τον αναπαραγωγικό κύκλο, με αποτέλεσμα τη λύση του κυττάρου-ξενιστή. Υπολογίζεται ότι περίπου το 10-20% του βακτηριακού γονιδιώματος αποτελείται από προφάγους ή τμήματα αυτών.

2.1.5.3. Η Λοιμογόνος δράση των βακτηριοφάγων

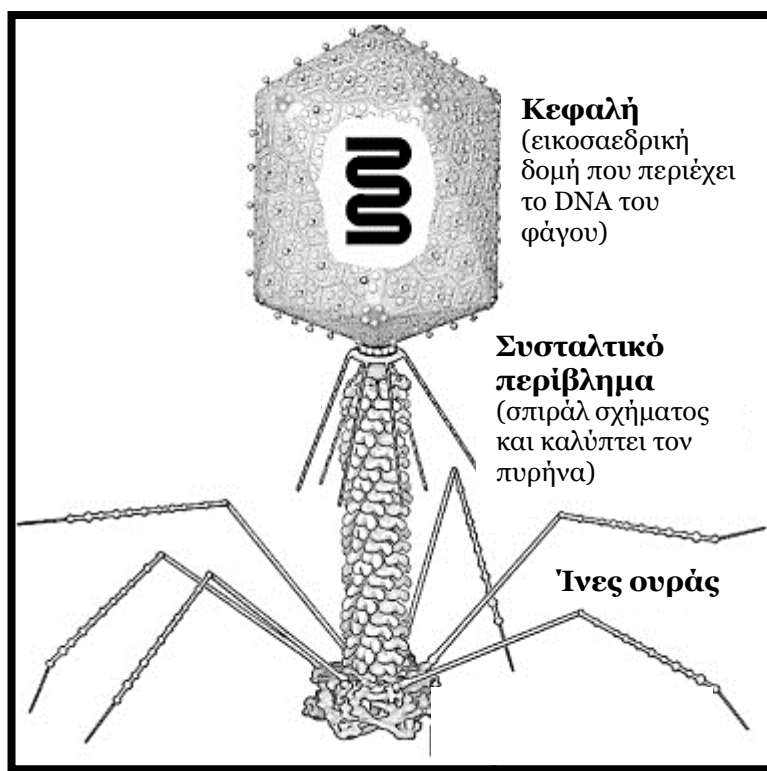
Οι βακτηριοφάγοι εισέρχονται στο εσωτερικό των βακτηρίων μέσω των ινιδίων που βρίσκονται περιφερικά της ουράς (Leiman and Shneider, 2012) και χρησιμοποιούνται ως μέσο προσκόλλησης στον ξενιστή (**Εικόνα 13**). Τα ινίδια αυτά διαφέρουν μεταξύ τους και μεταξύ των φάγων, στοχεύοντας κάθε φορά σε διαφορετικούς υποδοχείς του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος, είτε αυτοί είναι πρωτεϊνικοί, ολιγοσακχαριτικοί ή λιποπολυσακχαριτικοί. Λόγω της ιδιότητας των φάγων να μολύνουν συγκεκριμένα είδη και βακτηριακά στελέχη (Leiman and Shneider, 2012), τα ινίδια προσκόλλησής τους έχουν πολύ εξειδικευμένη δομή και πολλοί ερευνητές που ειδικεύονται στη γονιδιακή θεραπεία έχουν επικεντρωθεί σε αυτή την ιδιότητα, προσπαθώντας να κατασκευάσουν υποδοχείς που θα επιτρέπουν τη στοχευμένη μόλυνση των ξενιστών.



Εικόνα 13: Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο που απεικονίζει τη σύνδεση των βακτηριοφάγων στο κυτταρικό τοίχωμα και τη μόλυνση του βακτηρίου. Μια από τις πιο σημαντικές γενετικές τροποποιήσεις των φάγων είναι η μονάδα δέσμευσης (RBP, RNA binding protein) του υποδοχέα με το κύτταρο-ξενιστή. [Προσαρμογή από (Brockmeier, 2020)].

Είναι γνωστό ότι τα βακτήρια σχηματίζουν έλυτρο ή βιοφίλμ, και προστατεύονται έτσι, εκτός των άλλων, και από πιθανή προσκόλληση φάγων στους υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Για αυτόν τον λόγο πολλοί φάγοι φέρουν ένζυμα διάσπασης εξωπολυσακχαριτών (διπολυμεράσες) πάνω στα ινίδιά τους, απελευθερώνοντας έτσι τους υποδοχείς και επιτυγχάνοντας την πρωτογενή λοίμωξη (Leiman and Shneider, 2012). Σε φάγους που δεν περιέχουν ουρά ή ινίδια προσκόλλησης, παράγονται ένζυμα που αποικοδομούν τους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, με σκοπό να επιτευχθεί η ίδια διαδικασία μόλυνσης. Η τελική προσκόλληση του φάγου

επιτυγχάνεται μέσω των καρφίων που υπάρχουν πάνω στην πλάκα βάσης (**Εικόνα 14**). Το επόμενο στάδιο της μόλυνσης περιλαμβάνει την είσοδο του γονιδιώματος του φάγου μέσα στο κύτταρο του ξενιστή, η οποία εξασφαλίζεται με μια αλλαγή στην στερεοδιάταξη της κεφαλής, η οποία συσπάται και εγχύει το γονιδίωμα στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα. Από αυτό το σημείο και έπειτα ξεκινάει ο κύκλος αναπαραγωγής του ιού.



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση ενός σωματιδίου βακτηριοφάγου. Το DNA του βακτηριοφάγου περικλύεται από το εικοσαεδρικό καψίδιο της κεφαλής (head), μια εξειδικευμένη και εξαιρετικά αποτελεσματική δομή του φάγου που απαιτείται για τη μόλυνση του ξενιστή του. Η πλάκα βάσης (baseplate hub) βρίσκεται στο απομακρυσμένο άκρο της συσταλτικής θήκης και συντονίζει την κίνηση των ινών (tail fibers) της ουράς (οι ίνες που αρχικά αισθάνονται την παρουσία του ξενιστή), των κοντών ινών ουράς που ξεδιπλώνονται κάτω από την πλάκα βάσης για να αγκιστρωθούν σταθερά στην επιφάνεια του βακτηριακού ξενιστή και το σπειροειδές συσταλτικό περίβλημα (contractile sheath) που περιβάλλει τον σωλήνα που συστέλλεται, εκτοξεύοντας DNA στον βακτηριακό ξενιστή. [Προσαρμογή από (Brockmeier, 2020)].

2.1.5.4. Ιογενής φαγοθεραπεία για την καταπολέμηση παθογόνων βακτηριακών λοιμώξεων

2.1.4.4.1. Μέθοδοι γονιδιωματικής επεξεργασίας βακτηριοφάγων

Η θεραπεία με βακτηριοφάγους πλέον χρησιμοποιεί σωματίδια φάγου που αναπαράγονται με λυτικό τρόπο, ως καινοτόμο λύση στην αντιμικροβιακή θεραπεία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Αποτελεί μια ασφαλή μέθοδο κυρίως επειδή οι

βακτηριοφάγοι δεν αλληλεπιδρούν με τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στη συνέχεια θα αναφερθούν οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φάγων για χρήση στη βακτηριακή διάγνωση, τη θεραπεία και τη χορήγηση φαρμάκων (Bakondi et al., 2016, Long et al., 2014, Nelson et al., 2016).

Όσον αφορά τους βακτηριοφάγους που αναπαράγονται με λυσιγονικό τρόπο, επειδή το γενετικό τους υλικό ενσωματώνεται στα χρωμοσώματα του ξενιστή, αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός προφάγου που επιτρέπει το χειρισμό του μέσω των ίδιων μεθοδολογιών με εκείνες των βακτηριακών γονιδιωμάτων. Όσον αφορά τους βακτηριοφάγους που αναπαράγονται με λυτικό τρόπο, αυτοί απαιτούν εξειδικευμένες μεθόδους επεξεργασίας του γονιδιώματος, οι οποίες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες:

α) στη μέθοδο του ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous recombination ή HR), όπου το γονίδιο ή τα γονίδια που πρόκειται να τροποποιηθούν κλωνοποιούνται σε ένα πλασμίδιο και τροποποιούνται κατάλληλα προτού εισαχθούν στον ξενιστή του φάγου. Το συγκεκριμένο στέλεχος επιτρέπει τον ανασυνδυασμό μεταξύ του διαγονιδίου του φάγου και του μεταλλαγμένου αντιγράφου του γονιδίου στο πλασμίδιο μέσω της μόλυνσης του συγκεκριμένου στελέχους με τον ιο άγιου τύπου. Στη μέθοδο περιλαμβάνεται επανεκκίνηση του γονιδιώματος, δηλαδή ενεργοποίηση των εξωγενώς συναρμολογημένων φάγων. Η μέθοδος του ομόλογου ανασυνδυασμού χρησιμοποιείται συχνά για την γενετική επεξεργασία γονιδιωμάτων φάγων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την επιλογή των επιθυμητών φάγων (φάγοι που έχουν ενσωματώσει το επιθυμητό γονίδιο) που έχουν κατασκευαστεί, είναι είτε κάποιοι δείκτες φθορισμού ή/και το σύστημα CRISPR-Cas9 (Bakondi et al., 2016, Long et al., 2014, Nelson et al., 2016).

β) Στη δεύτερη μέθοδο τα γονιδιώματα φάγων μπορούν επίσης να συναρμολογηθούν από συνθετικά θραύσματα DNA, για να εισαγάγουν τα επιθυμητά γενετικά χαρακτηριστικά στο κύτταρο ξενιστή. Η TXTL αναδείχθηκε πρόσφατα ως μια ευέλικτη τεχνολογία για τη μηχανική των βιολογικών συστημάτων. Πλέον χρησιμοποιείται ευρέως ένα σύστημα TXTL από *E. coli* για την κατασκευή πρωτοτύπων συνθετικών κυττάρων (Bakondi et al., 2016, Long et al., 2014, Nelson et al., 2016).

2.2. Μέθοδοι επεξεργασίας του γενετικού υλικού

2.2.1. Γονιδιωματική επεξεργασία με το σύστημα CRISPR/Cas9 τύπου II

Το σύστημα CRISPR/Cas χαρακτηρίστηκε αρχικά ως η ανοσολογική απάντηση των βακτηρίων (Barboric et al., 2016, Long et al., 2014, Nelson et al., 2016). Πλέον το σύστημα CRISPR/Cas έχει τροποποιηθεί και, με τη χρήση καθοδηγούμενων RNA ενδονουκλεασών (RNA Edited Endonucleases ή RGENs), χρησιμοποιείται για την επεξεργασία του γονιδιώματος. Με τη συστηματική χρήση της νουκλεάσης Cas9 συμπλοκοποιημένης με ένα συνθετικό οδηγό RNA (Guide RNA ή gRNA) σε ένα κύτταρο, έχει ως αποτέλεσμα το γονιδίωμα του κυττάρου να κοπεί στην επιθυμητή θέση, είτε την προσθήκη νέων γονιδίων *in vivo* είτε την αφαίρεση παλαιών (Yin et al., 2018; You et al., 2018).

2.2.1.1. Παράδοση συστατικών στοιχείων του συστήματος CRISPR/Cas9 με τη χρήση ιικών φορέων

Με τη χρήση των AAV φορέων το σύστημα CRISPR/Cas9 μπορεί να παραδοθεί με δύο τρόπους: α) σε *in vitro* εφαρμογές, κυρίως όταν υπάρχει αμφιβολία για το αν έχει ενσωματωθεί το επιθυμητό γονίδιο, και β) σε *in vivo* εφαρμογές, στις οποίες λειτουργούν ως φορείς για την παράδοση της Cas9 και του sgRNA μέσα στα κύτταρα μέσω της διαδικασίας της μεταγωγής. Παρόλα αυτά, ένα μειονέκτημα των AAV είναι ότι παρουσιάζουν μειωμένη αποτελεσματικότητα στη γονιδιωματική επεξεργασία, καθώς ο εξειδικευμένος ομόλογος ανασυνδυασμός κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες συμβαίνει μόνο στο 0,1% έως 1% του συνόλου του κυτταρικού πληθυσμού (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020). Βέβαια συχνά χρησιμοποιούνται δύο ξεχωριστοί φορείς AAV, ώστε να περιοριστεί το παραπάνω εμπόδιο, και στην πράξη συνήθως χρησιμοποιείται ένας φορέας AAV που εκφράζει την πρωτεΐνη Cas9 και ένας δεύτερος που φέρει τις αλληλουχίες του sgRNA και του DNA-δότη, προκειμένου να επιτευχθεί η επεξεργασία του γονιδίου (Yang et al., 2016; Yip et al., 2020). Συχνά η πρωτεΐνη Cas9 που παραδίδεται από τους φορείς AAV προέρχεται από το βακτήριο *Streptomyces pyogenes*, γεγονός που αποτελεί πρόκληση εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους της (περίπου 4,2 kb). Μία μικρότερη εκδοχή της Cas9, προερχόμενη από τον *Staphylococcus aureus* (απαντάται με την ονομασία SaCas9 και το DNA του γονιδίου της έχει μέγεθος περίπου 3,15 kb), αποτελεί μία πιο εύκολα εφαρμόσιμη επιλογή (Yip et al., 2020). Ωστόσο, αναμένεται να γίνει ολοένα και πιο δημοφιλής η παράδοση που βασίζεται σε φορείς AAV και γι' αυτό αναμένονται κλινικές μελέτες γονιδιωματικής επεξεργασίας με χρήση του συστήματος CRISPR/Cas9 το οποίο θα βασίζει την

παράδοση των συστατικών του σε φορείς τύπου AAV (Yip et al., 2020; Kotterman et al., 2015).

Έναν ικό φορέα κατάλληλο για την παράδοση του συστήματος CRISPR/Cas9 αποτελούν οι λεντοϊοί. Η ικανότητα κλωνοποίησής τους είναι πιο ικανοποιητική από τους φορείς AAV (< 8Kb) και καθίσταται δυνατή η κλωνοποίηση της Cas9 και του sgRNA με τη χρήση μόνο ενός φορέα LV, ενώ και η διαδικασία παραγωγής τους είναι πιο εύκολη σε σχέση με τη διαδικασία παραγωγής των AAV. Η μεταγωγή του λεντοϊού είναι μια αρκετά αποτελεσματική διαδικασία σε μία ευρεία ποικιλία κυτταρικών τύπων (τόσο σε διαιρούμενα όσο και σε μη διαιρούμενα κύτταρα). Τα πλεονεκτήματα αυτά καθιστούν τους φορείς LV βέλτιστους για την παράδοση τόσο *in vitro* όσο και *ex vivo* (Yip et al., 2020; Kotterman et al., 2015). Ωστόσο, εξαιτίας της τυχαίας ενσωμάτωσής τους στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή, και ειδικότερα σε περιοχή κοντά στα ογκογονίδια, αυτή μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίησή τους προκαλώντας ογκογένεση (Yip et al., 2020; Popescu et al., 1990). Αύξηση στην ασφάλεια μεταγωγής των LVs μπορεί να δώσει η ανάπτυξη λεντοϊών ελαττωματικών ως προς την ενσωμάτωσή τους σε πλασμίδια που εκφράζουν μεταλλαγμένη ιντεγκράση (Yip et al., 2020; Liu et al., 2014).

2.3. Η προσέγγιση της γονιδιακής θεραπείας για την παράδοση θεραπευτικών γονιδίων

2.3.1. Ex vivo παράδοση

Στη βιολογία, οι *ex vivo* διαδικασίες συχνά περιλαμβάνουν ζωντανά κύτταρα και ιστούς τα οποία συλλέγονται, επιμολύνονται με τον ικό φορέα και στη συνέχεια επιστρέφονται στον ορό (Barrett et al., 2014, Vierbuchen et al., 2010). Οι *ex vivo* γονιδιακές θεραπευτικές προσεγγίσεις επιτρέπουν το λεπτομερή χαρακτηρισμό ενός γενετικά τροποποιημένου κυτταρικού προϊόντος πριν από την εισαγωγή στον ασθενή ενώ δεν υπάρχει άμεση έκθεση του ασθενούς στο φορέα γονιδιακής μεταφοράς (Liu and Wang, 2015). Οι πηγές κυττάρων για την *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία μπορούν να απομονωθούν από τους ίδιους τους ασθενείς και να επανεισαχθούν μετά τη γενετική τροποποίηση, να τροποποιηθούν και να διατηρηθούν αλλογενείς κυτταρικές σειρές για μελλοντική μεταμόσχευση (Duque et al., 2015). Ακόμα, η παράδοση *ex vivo* αποτελεί μια πιο αποτελεσματική προσέγγιση. Αυτό οφείλεται στην *in vitro* μεθοδολογία κατά την οποία αυτόλογα κύτταρα υφίστανται επεξεργασία έξω από τον οργανισμό ενδιαφέροντος. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για τη γενετική τροποποίηση αιμοποιητικών κυττάρων.

2.3.2. In vivo παράδοση

Στην in vivo παράδοση τα συστατικά στοιχεία της γονιδιωματικής επεξεργασίας εισάγονται απευθείας στον οργανισμό ενδιαφέροντος και χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες οδοί χορήγησης για την απευθείας διαμόλυνση τέτοιων συστατικών (Dunbar et al., 2018). Κατά την in vivo γονιδιακή θεραπεία, ο ικός φορέας εισάγεται στον ασθενή, ο οποίος στη συνέχεια θα επιτύχει το επιθυμητό θεραπευτικό αποτέλεσμα περνώντας το γενετικό υλικό ή το θεραπευτικό γονίδιο που φέρει στα κύτταρα του ασθενούς. Η in vivo γονιδιακή θεραπεία θεωρείται απλούστερη, καθώς δεν απαιτεί τη συλλογή μιτωτικών κυττάρων. Ωστόσο, οι ex vivo γονιδιακές θεραπείες είναι καλύτερα ανεκτές και συνδέονται λιγότερο με σοβαρές ανοσολογικές αποκρίσεις. Ακόμα υπάρχουν ορισμένοι περιορισμοί στη σύγχρονη τεχνολογία των ικών φορέων, οι οποίοι παρεμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή της in vivo μεταφοράς. Παράδειγμα αποτελεί ο ρετροϊός MLV, ο οποίος υδρολύεται από τον ανθρώπινο ορό, ενώ οι ίδιοι φορείς μπορούν να επιβιώσουν παρουσία εγκεφαλονωτιαίου υγρού (το οποίο περιέχει ένα κλάσμα του συμπληρώματος του ανθρώπινου ορού) καθιστώντας τους ακατάλληλους για γονιδιακή μεταφορά στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Chandrasegaran, 2017).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

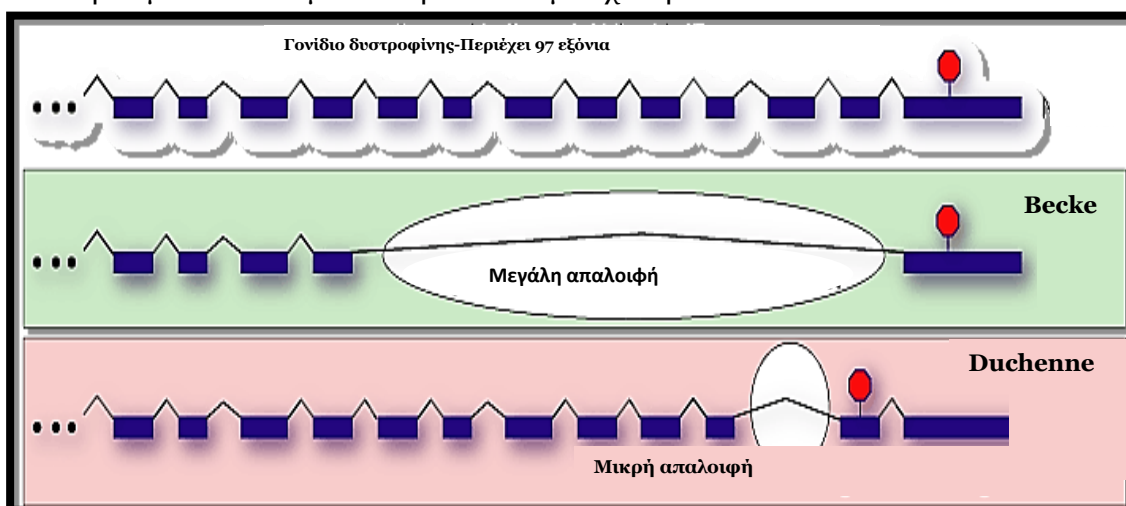
3.1. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΠΙΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ ΣΤΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

3.1.1. AAV (αδενο-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς)

3.1.1.1. Νευρομυϊκές διαταραχές

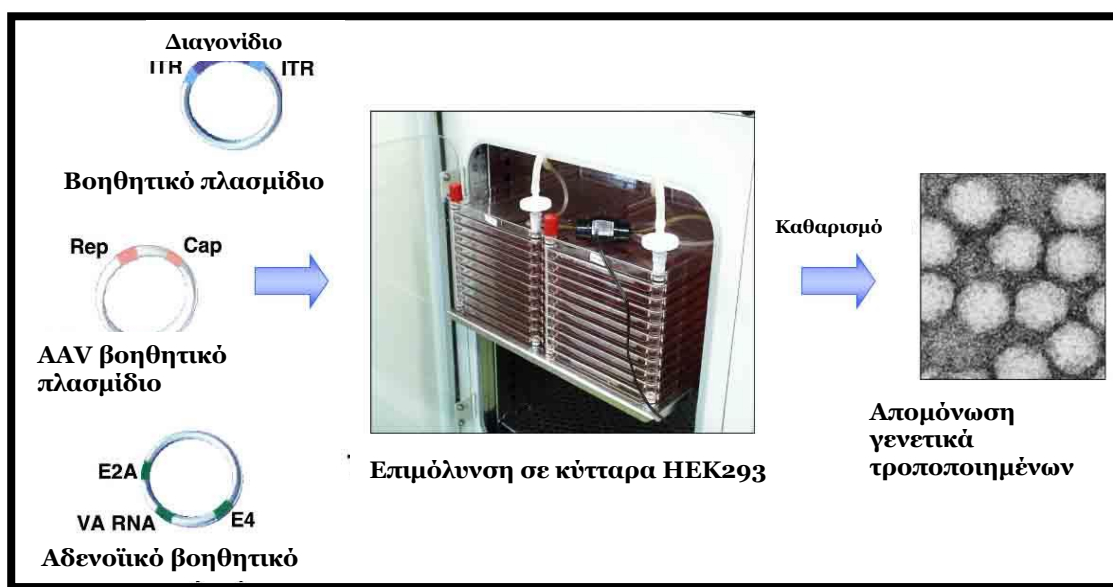
3.1.1.1.1. Μυϊκή δυστροφία Duchenne (Duchenne-Muscular-Dystrophy ή DMD)

Η μυϊκή δυστροφία Duchenne είναι η πιο συχνή κληρονομική νόσος στην παιδική ηλικία και αποτελεί στα 2/3 των περιπτώσεων μια κληρονομική διαταραχή που επηρεάζει κυρίως τα αρσενικό φύλο (Elangkovan & Dickson, 2021). Το μεταλλαγμένο γονίδιο κληρονομείται από τη μητέρα και στο 1/3 των περιπτώσεων δημιουργούνται νέες μεταλλάξεις. Αποτελεί έναν σοβαρό τύπο μυϊκής ατροφίας και αδυναμίας, όπου τα περισσότερα άτομα δεν μπορούν να περπατήσουν μέχρι την ηλικία των 12 ετών. Ακόμα πολλές φορές τα άτομα εμφανίζουν σκολίωση και διανοητική αναπηρία. Η πιο συχνή μετάλλαξη που έχει εμφανιστεί στη DMD αφορά στο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση της πρωτεΐνης δυστροφίνης (γνωστό και ως γονίδιο DMD). Αποτελεί ένα μεγάλο γονίδιο (2,6Mb) που περιλαμβάνει 97 εξόνια (Elangkovan & Dickson, 2021). Η πρωτεΐνη δυστροφίνη είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης των μυϊκών ινών και το υπεύθυνο γονίδιο εντοπίζεται στον γενετικό τόπο Χρ21 που βρίσκεται στον βραχύ βραχίονα του Χ χρωμοσώματος (**Εικόνα 15**). Η μυϊκή δυστροφία Duchenne προκαλείται από μεταλλάξεις (διπλασιασμός, απαλοιφή, μικρομετάλλαξη) του γονιδίου DMD. Λόγω των μεταλλάξεων έχουμε έλλειψη παραγωγής της δυστροφίνης, γεγονός που οδηγεί σε διείσδυση του ασβεστίου μέσω της κυτταρικής μεμβράνης στο εσωτερικό του κυττάρου με αποτέλεσμα να υδρολύει τα μιτοχόνδρια.



Εικόνα 15: Ανακάλυψη της μυϊκής δυστροφίας Duchenne και της μυϊκής δυστροφίας Becker. Όταν ανακαλύφθηκε ότι η μυϊκή δυστροφία Duchenne και η μυϊκή δυστροφία Becker αποτελούσαν δύο μορφές της ίδιας νόσου, οι ερευνητές προσπάθησαν να προσδιορίσουν ποιες περιοχές του γονιδίου της δυστροφίνης ήταν πιο σημαντικές συσχετίζοντας γονότυπο και φαινότυπο. Στο πράσινο πλαίσιο φαίνεται η αρκετά μεγάλη απαλοιφή σε ασθενείς με την ήπια μορφή Becker, ενώ στο κόκκινο πλαίσιο παρατηρείται μια μικρότερη απαλοιφή σε ασθενείς με Duchenne MD στο X χρωμόσωμα.[Προσαρμογή από (Elangkovan & Dickson, 2021)].

Η γονιδιακή θεραπεία στοχεύει στην αποκατάσταση της ανεπαρκούς παραγωγής της πρωτεΐνης με την παροχή ενός εξωγενούς, λειτουργικού γονιδίου στους ιστούς-στόχους με τη βοήθεια ανασυνδυασμένων αδενο-σχετιζόμενων ιών (rAAVs) (McCarty et al, 2003). Οι ιοί AAV αποτελούν τους καλύτερους φορείς για τη θεραπεία μυϊκών διαταραχών και την παράδοση του θεραπευτικού γονιδίου (**Εικόνα 16**). Η κωδικοποιητική αλληλουχία mRNA (ORF) του γονιδίου *DMD* έχει μήκος περίπου 2,6 Mb και αυτό το μεγάλο μέγεθος αποτελεί τεράστια πρόκληση για τη δημιουργία θεραπειών μεταφοράς γονιδίων.

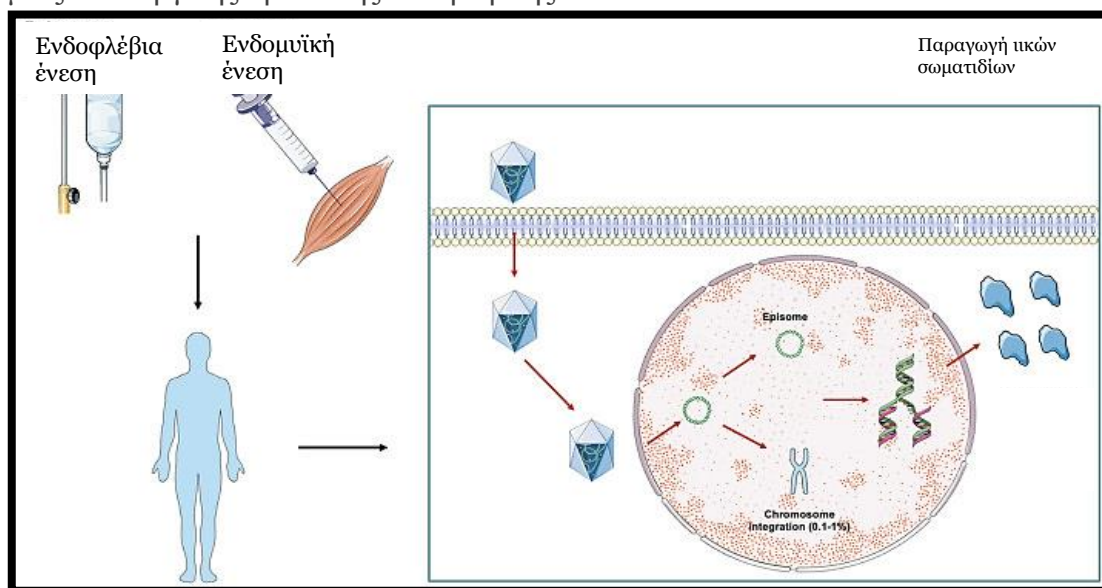


Εικόνα 16: Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή φορέων AAV απουσία βοηθητικού ιού. Το πρωτόκολλο αυτό (Matsushita et al., 1998) περιλαμβάνει μια τριπλή πλασμιδιακή μεταγωγή, με τη χρήση τριών πλασμιδίων για την εισαγωγή του θεραπευτικού γονιδίου σε κύτταρα ανθρώπινου εμβρυϊκού νεφρού 293 (Okada et al., 2002). Το βοηθητικό πλασμίδιο περιέχει τα γονίδια VA, E2A και E4 που συμμετέχουν στην αντιγραφή του φορέα AAV. Όταν αυτό το βοηθητικό πλασμίδιο συν-διαμολύνεται σε κύτταρα ανθρώπινου εμβρυϊκού νεφρού 293 μαζί με πλασμίδια που κωδικοποιούν το γονιδίωμα του φορέα AAV (αλληλουχίες rep και cap) και πλασμίδια που φέρουν το θεραπευτικό γονίδιο της δυστροφίνης (που περιβάλλεται από ITR αλληλουχίες), ο φορέας AAV παράγεται τόσο αποτελεσματικά όσο όταν πραγματοποιείται μόλυνση από αδενοϊό (Προσαρμογή από McCarty, 2003).

Βέβαια, κλινικές μελέτες σε ασθενείς με DMD δείχνουν ότι μπορεί να μην είναι υποχρεωτική η μεταφορά ολόκληρης της κωδικοποιητικής αλληλουχίας του γονιδίου της δυστροφίνης για την ανάπτυξη ενός γενετικού φορέα, καθώς η θεραπεία μπορεί

να επέλθει και με μικρότερη γονιδιακή κατασκευή. Πλέον, η θεραπεία με χρήση μικρότερου τμήματος του γονιδίου της δυστροφίνης που ονομάζεται «μικρο-δυστροφίνη» εφαρμόζεται στην πλειοψηφία των περιπτώσεων όπου χρησιμοποιούνται φορείς AAV. Συγκεκριμένα, η ανακάλυψη της εξαιρετικά λειτουργικής πρωτεΐνης *mini-dystrophin Δ17–48* (Davies, 1990) ήταν καθοριστική γιατί, παρά το γεγονός ότι είναι μια πρωτεΐνη με το μισό μέγεθος σε σχέση με τη φυσιολογική, παρείχε εξαιρετική προστασία στους μύες. Η θεραπευτική δυνατότητα της μικρο-δυστροφίνης έχει επιβεβαιωθεί σε πολυάριθμες μελέτες συσχέτισης γονότυπου-φαινότυπου σε ανθρώπους ασθενείς ενώ αξιολογήθηκε και σε σειρά μελετών με χρήση φορέων AAV σε διαγονιδιακά ποντίκια.

Συνεπώς, προσεγγίσεις γονιδιακής θεραπείας στο γονίδιο DMD που μελετώνται επί του παρόντος βασίζονται στην παροχή μικρο-δυστροφίνης μέσω αδενο-σχετιζόμενου ιού (AAV) (**Εικόνα 17**). Μετά από γενετικές τροποποιήσεις ο θεραπευτικός φορέας μπορεί να χορηγηθεί συστηματικά (in vitro) μέσω της ενδοφλέβιας οδού ή απευθείας στους εμπλεκόμενους μύες. Μετά την ένεση, οι φορείς AAV εισάγονται μέσα στο κύτταρο με εσωτερικευση σε ενδοκυτταρικά κυστίδια επικαλυμμένα με κλαθρίνη. Οι φορείς στη συνέχεια απελευθερώνονται από τα κυστίδια στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται στον πυρήνα όπου απελευθερώνονται τα διαγονίδια. Μόλις το εξωγενές σωματίο με το DNA εισέλθει στον πυρήνα, παραμένει στα κύτταρα σε επισωματική κατάσταση, ενώ μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό (0,1-1%) του γονιδιώματος του φορέα ενσωματώνεται στο χρωμόσωμα του ξενιστή. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που έχουν υποστεί μεταγωγή αρχίζουν να εκφράζουν το διαγονίδιο, με επακόλουθη παραγωγή μιας λειτουργικής πρωτεΐνης δυστροφίνης.



Εικόνα 17: Γονιδιακή θεραπεία με τη μεσολάβηση AAV για τη θεραπεία της DMD. (Προσαρμογή από: Bainbridge et al., 2008; McClements & MacLaren, 2001).

3.1.1.1.2. Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία (Spinal-Muscular-Atrophy ή SMA)

Η SMA αποτελεί μια αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσο που επηρεάζει τους κινητικούς νευρώνες του νωπιαίου μυελού αλλά και άλλα όργανα, όπως η καρδιά, το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες, οδηγώντας σε προοδευτική μυϊκή ατροφία, υποτονία και θάνατο από αναπνευστική ανακοπή στην ηλικία των 6 ετών (Berkats et al., 2020). Το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τη SMA βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5. Δύο αντίγραφα αυτού του γονιδίου βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα. Αυτά είναι το γονίδιο *SMN1* (Spinal-Muscular-Neuron-1) που βρίσκεται στην περιοχή του τελομερούς και το γονίδιο *SMA2* (Spinal-Muscular-Neuron-2) που βρίσκεται στην περιοχή του κεντρομερούς. Η SMA προκαλείται από την ομόζυγη αλλοίωση του γονιδίου *SMN1* στα κύτταρα (απαλοιφή, μετατροπή ή μετάλλαξη) αποτρέποντας την παραγωγή της πρωτεΐνης SMN (Berkats et al., 2020). Το δεύτερο γονίδιο, *SMN2*, δεν καθιστά δυνατή την αντιστάθμιση της απουσίας της πρωτεΐνης SMN στα κύτταρα. Ωστόσο, ο αριθμός των αντιγράφων του γονιδίου *SMN2* ποικίλλει ανάλογα με τους ασθενείς και μόνο το 10% των αντιγράφων *SMN2* είναι πλήρους μήκους ώστε να μπορεί να μεταφραστεί σε λειτουργική πρωτεΐνη SMN.

Μέχρι σήμερα, έχει επικυρωθεί μια συγκεκριμένη προσέγγιση θεραπείας με μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου μέσω γενετικά ανασυνδυασμένων AAV (Mendell et al., 2021). Αφορά την αντικατάσταση του γονιδίου *SMN1* με τη μεσολάβηση του γενετικά τροποποιημένου AAV. Στην προσέγγιση αντικατάστασης του γονιδίου *SMN1-AAV*, η εισαγωγή του *SMN* και η μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή, επιτρέπει την παραγωγή της πλήρους μήκους πρωτεΐνης SMN. Κλινικά πειράματα σε μοντέλα ποντικών SMA δείχνουν ότι η συστηματική χορήγηση θεραπευτικού προϊόντος με τη χρήση του rAAV9 (γενετικά τροποποιημένος AAV9) διέσχισε τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και πέτυχε υψηλά επίπεδα νευρωνικής μεταγωγής. Προκλινικές μελέτες, που εισήγαγαν το rAAV9-SMN σε νεογνά με SMA, κατέδειξαν θετικά αποτελέσματα στην επιβίωση, την ανάπτυξη και τη νευρομυϊκή μετάδοση (Mendell et al., 2021).

Πρόσφατα, μια εταιρεία βιοτεχνολογίας ανέπτυξε το Zolgensma, ένα προϊόν γονιδιακής θεραπείας κατάλληλο για τη θεραπεία της νωπιαίας μυϊκής ατροφίας. Το Zolgensma αποτελεί θεραπεία με χρήση χμαιοκινικών αντιγονικών υποδοχέων T-κυττάρων (CAR-T) που είναι βασισμένες στον φορέα AAV9, και εγκρίθηκε το 2019 από τον FDA (Food and Drug Administration, Οργανισμός ελέγχου τροφίμων και φαρμάκων) για παιδιά με SMA ηλικίας κάτω των 2 ετών και από την υπηρεσία EMA το 2020 για ασθενείς με SMA1. Ο ορότυπος 9 που σχετίζεται με αδενοϊό (AAV9) είναι σε θέση να διασχίσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να μολύνει κινητικούς

νευρώνες. Ο φορέας περιέχει ένα αντίγραφο ενός ορότυπου του γονιδίου *SMN1* που παραμένει στον πυρήνα του κυττάρου ως εξωχρωμοσωμικό επίσωμα. Έτσι, το Zolgensma χρησιμοποιεί έναν γενετικά τροποποιημένο και αβλαβή αδeno-σχετιζόμενο ορότυπο ιού 9 (AAV9) για να παραδώσει ένα λειτουργικό αντίγραφο του *SMN1* στα σωματικά κύτταρα (Mendell et al., 2021). Ενώ το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού DNA αποθηκεύεται στον πυρήνα, το DNA που παρέχεται από το Zolgensma παραμένει εκτός του πυρήνα. Επειδή οι κινητικοί νευρώνες δεν διαιρούνται για να δημιουργήσουν νέα κύτταρα, είναι απίθανο να χάσουν το ενσωματωμένο γονίδιο, επομένως μια μόνο δόση Zolgensma αναμένεται να προκαλέσει συνεχή αύξηση των επιπέδων του SMN σε αυτά τα εξαιρετικά ευαίσθητα κύτταρα. Αποτελεί μια εφάπαξ θεραπεία, δεδομένου ότι τα κύτταρα των κινητικών νευρώνων δεν διαιρούνται και μια μόνο ενδοφλέβια ένεση γονιδιακής θεραπείας αναμένεται να διαρκέσει εφ' όρου ζωής (Mendell et al., 2021).

3.1.1.1.3. Μυοσωληναριακή Μυοπάθεια με X (X-Linked-Myotubular-Myopathy ή XLMTM)

Η μυοσωληναριακή μυοπάθεια προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της μυοτουμπουλαρίνης 1 (*MTM1*), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα X (Lawlor & Dowling, 2021). Λειτουργεί ως μεμβρανικό ένζυμο και παίζει ρόλο στην ομοιόσταση και στην ανάπτυξη των σκελετικών μυών. Αυτή η μετάλλαξη επηρεάζει τους μηχανισμούς συστολής διέγερσης-σύζευξης, διαταράσσοντας έτσι τη λειτουργία και την οργάνωση του δικτύου των σωληναρίων. Η σοβαρή μορφή XLMTM, η οποία αποτελεί την πιο κοινή μορφή της νόσου, εμφανίζεται κατά τη γέννηση των νεογνών με συμπτώματα όπως υποτονία, εξωτερική οφθαλμοπληγία, αδυναμία των σκελετικών μυών και αναπνευστική ανεπάρκεια (Lawlor & Dowling, 2021). Μετά από σειρά μελετών, δείχθηκε ότι η χορήγηση ενός φορέα AAV8 που εκφράζει το γονίδιο *MTM1* υπό τον υποκινητή των μυών της δεσμίνης (Desmine ή DES) έδειξε μακροπρόθεσμη θεραπευτική αποτελεσματικότητα. Σε περαιτέρω μελέτες σε ποντίκια με έλλειψη της *Mtm1*, ο ανασυνδυασμένος ιικός φορέας rAAV8 διόρθωσε τη μυϊκή παθολογία και πέτυχε την παρατεταμένη επιβίωση καθ' όλη τη διάρκεια της 6μηνης μελέτης (Mendell et al., 2021).

3.1.1.2. Αιμορροφιλία Β

Η αιμορροφιλία αποτελεί μια γενετική διαταραχή που συνήθως κληρονομείται από τους γονείς μέσω του X χρωμοσώματος που φέρει το μη λειτουργικό γονίδιο. Η συχνότητα εμφάνισης της αιμορροφιλίας είναι 1 στις 5.000 γεννήσεις ανδρών. Τα άτομα που κληρονομούν αυτό το γονίδιο δεν μπορούν να δημιουργήσουν θρόμβους σε

περίπτωση αιμορραγίας (Cavazzana-Calvo et al., 2010). Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι αιμορροφιλίας. Η αιμορροφιλία A (εμφανίζεται λόγω έλλειψης του παράγοντα πήξης VIII) και η αιμορροφιλία B (εμφανίζεται λόγω έλλειψης του παράγοντα πήξης IX).

Η αιμορροφιλία είναι ιδανική για εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας, γιατί έστω και μια μικρή αύξηση των παραγόντων πήξης στο αίμα είναι ικανή να βελτιώσει τον φαινότυπο του ασθενούς. Η πρώιμη γονιδιακή θεραπεία στράφηκε στους φορείς AAV γιατί, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους ικούς φορείς που χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου, είναι πιο ασφαλείς καθώς οι άγριου τύπου AAV δεν έχουν συσχετιστεί με κάποια ανθρώπινη ασθένεια (Boulard et al., 2013). Οι περισσότερες δοκιμές γονιδιακής θεραπείας με τη χρήση βοηθητικών ικών φορέων έχουν γίνει με σκοπό την καταπολέμηση της αιμορροφιλίας B, επειδή το υπεύθυνο γονίδιο (*FIX*) είναι σχετικά μικρού μήκους (1,5kb) και το μονοπάτι έκφρασης του είναι λιγότερο περίπλοκο σε σχέση με το γονίδιο *VIII* (υπεύθυνο για την αιμορροφιλία A) (Mays & Wilson, 2011).

Οι πρώτες απόπειρες γονιδιακής θεραπείας της αιμορροφιλίας χρησιμοποίησαν ιούς (ογκορετροϊκούς και αδενοϊκούς φορείς) και μη ικούς φορείς, όπου φάνηκε να είναι ασφαλείς, αλλά δεν οδήγησαν σε παρατεταμένη διαγονιδιακή έκφραση και σε περαιτέρω θεραπευτικά αποτελέσματα. Πιο πρόσφατα, οι έρευνες έχουν εστιάσει αποκλειστικά στους ικούς φορείς, ιδιαίτερα στους ανασυνδυασμένους αδενοσχετιζόμενους ικούς φορείς (Kay et al., 2000). Η πρώτη μελέτη για τη χρήση φορέων AAV σε ασθενείς με αιμορροφιλία β χρησιμοποίησε τον ορότυπο 2 του AAV (ο πρώτος ορότυπος που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε πλήρως) (Kay et al., 2000). Ενδομυϊκές ενέσεις φορέα AAV που κωδικοποιεί το γονίδιο *FIX* σε αυτή τη μελέτη δεν συσχετίστηκαν με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, αλλά δεν παρατηρήθηκε αποτελεσματικότητα σε κανένα από τα 7 άτομα που τους χορηγήθηκε ο γενετικά τροποποιημένος ικός φορέας. Οι προκλινικές μελέτες εκείνη την εποχή υπέδειξαν ότι, για μια δεδομένη δόση AAV, η έκφραση ήταν σημαντικά υψηλότερη μετά από στοχευόμενη χορήγηση AAV στο ήπαρ σε σύγκριση με ενδομυϊκές ενέσεις, ίσως επειδή το ήπαρ είναι η φυσική θέση της σύνθεσης του γονιδίου *FIX*. Επομένως, στη δεύτερη μελέτη, οι φορείς AAV2 εγχύθηκαν στην ηπατική αρτηρία χρησιμοποιώντας 3 δόσεις που κυμαίνονταν από 0,08 έως 2,12 vg/kg σε ασθενείς με ομόζυγη αιμορροφιλία B. Σε αυτή τη μελέτη, οι χαμηλές και οι ενδιάμεσες δόσεις του φορέα ήταν ασφαλείς αλλά δεν κατέληξαν σε μια ανιχνεύσιμη αύξηση στα επίπεδα *FIX* στο πλάσμα, ενώ πιο ενθαρρυντικά αποτελέσματα σημειώθηκαν σε 2 άτομα που έλαβαν θεραπεία χρησιμοποιώντας την υψηλότερη δόση (2,12 vg/kg) (Mays & Wilson, 2011). Βέβαια στα άτομα που έλαβαν υψηλότερη δόση, προκλήθηκε μείωση της

έκφρασης FIX και ηπατοτοξικότητα, που πιστεύεται ότι οφείλονταν σε μια ειδική για το καψίδιο κυτταροτοξική απόκριση T-κυττάρων. Έτσι, σε αυτή τη μελέτη, οι χυμικές και οι κυτταρομεσολαβούμενες ανοσοαποκρίσεις περιόρισαν την επίμονη έκφραση του FIX μετά από στοχευμένη στο ήπαρ χορήγηση φορέων AAV2 σε ανθρώπους (Kay et al., 2000).

Οι πιο σύγχρονες εφαρμογές γονιδιακής θεραπείας χρησιμοποιούν φορείς AAV χορηγούμενους από ηπατοκύτταρα που ενθυλακώνουν το κωδικόνιο *F8* υπό τον έλεγχο ενός ειδικού για το ήπαρ υποκινητή. Οι ειδικοί για το ήπαρ υποκινητές που χρησιμοποιούνται για τα τρέχοντα προϊόντα γονιδιακής θεραπείας, είναι επαναλήψεις του υποκινητή της ανθρώπινης α-1-αντιθρυψίνης με ενισχυτικά στοιχεία από την ApoE (Apolipoprotein E Απολιποπρωτεΐνη E) ή από έναν τροποποιημένο υποκινητή τρανσθυρετίνης. Οι ανεστραμμένες τερματικές επαναλήψεις (ITR) είναι το μόνο συστατικό της κασέτας έκφρασης που έχει ική προέλευση, ενώ είναι απαραίτητες για τη συσκευασία του γονιδιώματος του φορέα στο καψίδιο και για τον σχηματισμό του επισωματικού DNA μετά τη μεταγωγή (Bartholomae et al., 2013).

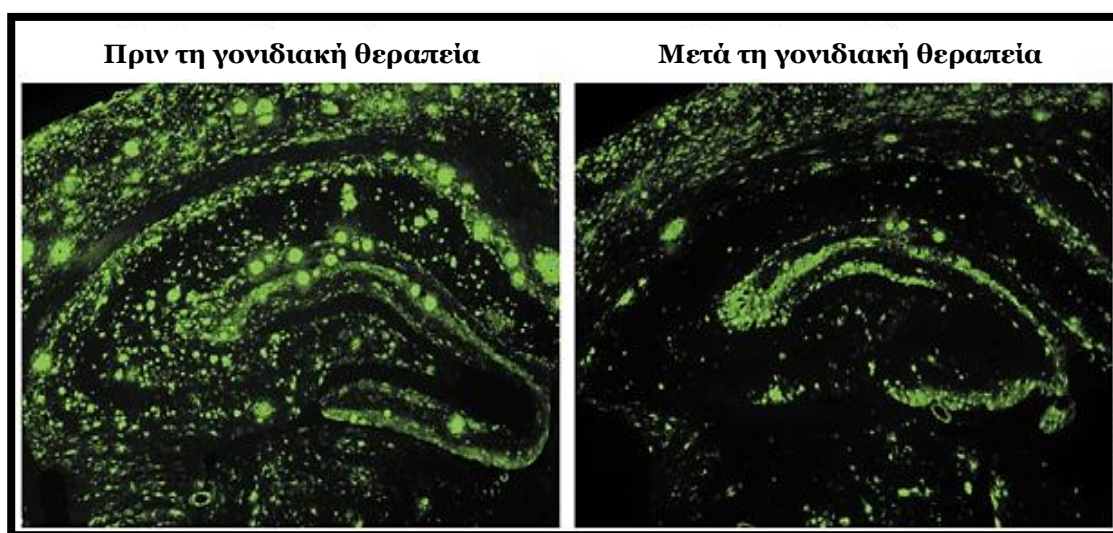
Οι ανασυνδυασμένοι φορείς AAV κατασκευάζονται με μεθόδους που χρησιμοποιούν είτε παροδική επιμόλυνση ανθρώπινων κυττάρων HEK293 είτε μόλυνση κυττάρων εντόμων Sf9 από βακουλοϊό. Για την αιμορροφιλία B έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας. Οι τελευταίες μελέτες αφορούν τη χρήση ενός καψιδίου AAV8 με αρκετές υποκαταστάσεις αμινοξέων για τη συσκευασία μιας κασέτας έκφρασης (ενσωματωμένο το φυσιολογικό γονίδιο *FIX*) από την εταιρία Spark Therapeutics. Οκτώ από τους δέκα ασθενείς που έλαβαν θεραπεία εμφάνισαν σταθερή παραγωγή του γονιδίου *FIX* κατά τη διάρκεια της αναφερόμενης παρακολούθησης και καμία ένδειξη απόκρισης T-κυττάρων καψιδίου AAV (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Howe et al., 2008).

3.1.1.3. Νοσήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος

3.1.1.3.1. Νόσος Alzheimer (Alzheimer-Disease ή AD)

Η νόσος Alzheimer (AD) αποτελεί μια νευροεκφυλιστική νόσο του ανθρώπου και χαρακτηρίζεται από αυξανόμενη άνοια με το πέρασμα των χρόνων. Περίπου το πέντε έως δέκα τοις εκατό των προσβεβλημένων ατόμων έχουν κληρονομήσει το μη φυσιολογικό γονίδιο από τους γονείς τους (Elsner et al., 2012; Jessup et al., 2011; LeWitt et al., 2011). Το μη φυσιολογικό γονίδιο μπορεί να δημιουργηθεί από μεταλλάξεις στο γονίδιο της *πρεσιλίνης-1* (Presilinen1-PSEN1) στο χρωμόσωμα 14, στο γονίδιο της *πρεσιλίνης-2* (Presilinen2-PSEN2) στο χρωμόσωμα 1 ή στο γονίδιο *APP* στο χρωμόσωμα 21. Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί μια ακόμα ασαφής σχέση μεταξύ της

νόσου του Αλτσχάιμερ και του αλληλόμορφου ε4 της απολιποπρωτεΐνης E (ApoE). Οι παραπάνω μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα την υπερβολική συσσώρευση πεπτιδίου αμυλοειδούς-b (Amyloid-B ή Ab) στον εγκέφαλο. Στα περισσότερα άτομα, η συσσώρευση Ab ξεκινά στην ηλικία των 40 ως και 80 ετών, η οποία αυξάνεται όσο αυξάνεται και η ηλικία του ανθρώπου. Επίσης, έχει φανεί ότι η δραστηριότητα της νεπριλυσίνης (αποτελεί ένα ένζυμο ενδοπεπτιδάσης, το οποίο διασπά ενδογενή αγγειοδραστικά πεπτίδια) στον εγκέφαλο μειώνεται με την ηλικία και μια τέτοια μείωση έχει παρατηρηθεί σε άτομα λίγο πριν την εμφάνιση της νόσου του Αλτσχάιμερ. Σήμερα είναι γνωστό ότι περίπου τα μισά από τα άτομα ηλικίας 85 ετών και άνω πάσχουν από νόσο Αλτσχάιμερ ή ήπια γνωστική εξασθένηση, που συνήθως θεωρείται μεταβατική κατάσταση της νόσου (Chatziandreou et al., 2011; Derse et al., 2007; Kaufmann et al., 2012; Suerth et al., 2012).



Εικόνα 18: Η εναπόθεση αμυλοειδούς μειώνεται σημαντικά (πράσινο φθορίζον χρώμα) (αριστερά) στο ποντίκι-μοντέλο της νόσου του Alzheimer λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του ενζύμου νεπριλυσίνης (δεξιά) [Προσαρμογή από (Bainbridge et al., 2008; McClements & MacLaren, 2001)].

Πλέον οι πειραματικές μελέτες της γονιδιακής θεραπείας του Alzheimer επικεντρώνονται στην ενίσχυση της δραστηριότητας της νεπριλυσίνης και την μείωση των επιπέδων Ab στον εγκέφαλο (Chatziandreou et al., 2011; Derse et al., 2007; Kaufmann et al., 2012; Suerth et al., 2012). Στα πρώτα πειραματικά στάδια έγινε η εισαγωγή του γονιδίου της νεπριλυσίνης στον εγκέφαλο ποντικού με τη χρήση ενός αδενο-σχετιζόμενου ιικού φορέα, ο οποίος αύξησε τη δραστηριότητα της νεπριλυσίνης κατά 10 φορές, και αυτή η αύξηση διατηρήθηκε για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από έξι μήνες (**Εικόνα 18**). Επιπλέον, η νεπριλυσίνη που εκφράζεται στους νευρώνες του ιππόκαμπου με μία μόνο ένεση ανασυνδυασμένου ιικού φορέα μεταφέρεται αξονικά σε προσυναπτικές θέσεις μέσω υποδοχέωντων νευρωνικών κυκλωμάτων στον

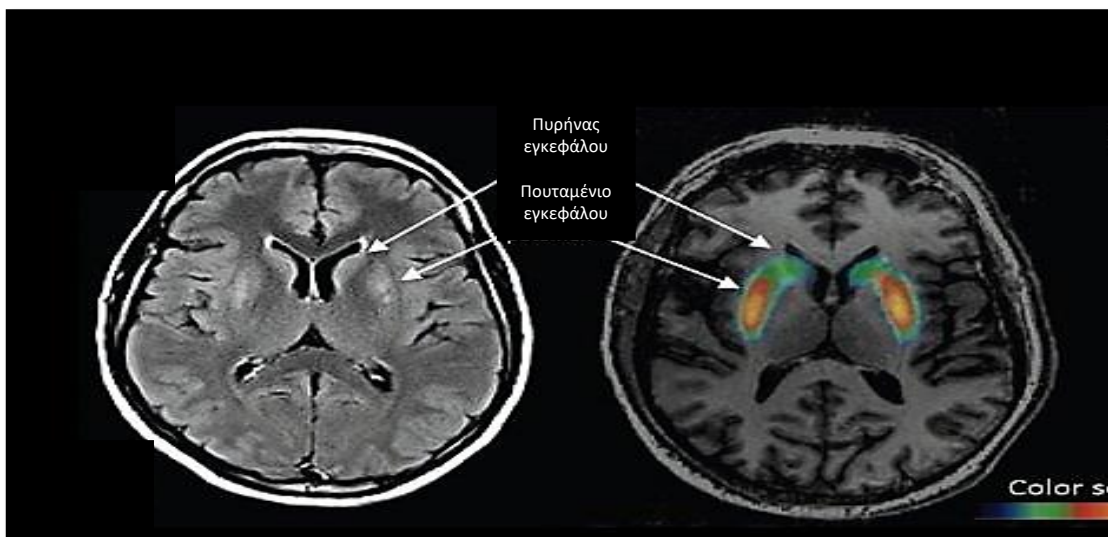
ετερόπλευρο ιπλόκαμπο. Ακόμα τα επίπεδα Ab στον ετερόπλευρο ιπλόκαμπο μειώθηκαν επίσης σημαντικά, όπως και η ομόπλευρη πλευρά που εγχύθηκε με φορέα, δείχνοντας έτσι ότι η νεπριλυσίνη μπορεί να αποικοδομήσει το Ab στις προσυναπτικές θέσεις (Byrne et al., 2012). Αυτό δείχνει ότι η αυξημένη δραστηριότητα της νεπριλυσίνης μπορεί να προστατεύσει από τη συναπτική λειτουργία, δηλαδή από εκείνες τις διαταραχές που προκαλούνται λόγω τοπικών αυξήσεων λόγω του Ab.

3.1.1.3.2. Νόσος Parkinson (Parkinson-Disease ή PD)

Η νόσος του Πάρκινσον (PD) είναι η δεύτερη πιο συχνά εμφανιζόμενη νευροεκφυλιστική νόσος και υπολογίζεται ότι 5,8 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως πάσχουν από αυτή (Neurol et al., 2021). Η ακριβής αιτία της νόσου δεν είναι γνωστή και για αυτόν τον λόγο έχουν δοκιμαστεί διαφορετικές πειραματικές μελέτες για την εισαγωγή του θεραπευτικού γονιδίου με τη χρήση των AAV ικών φορέων.

Σύμφωνα με τις τελευταίες έρευνες, τέσσερα είναι τα πιθανά γονίδια που ευθύνονται για τη δημιουργία της νόσου. Σύμφωνα με αυτά έγιναν και τα πειράματα της γονιδιακής θεραπείας. Πρώτον η αποκαρβοξυλάση του γλουταμικού οξέος (GAD, Glutamate Decarboxylase, Αποκαρβοξυλάση Γλουταμικού Οξέος) είναι ένα ένζυμο που αυξάνει την παραγωγή μιας χημικής ουσίας στον εγκέφαλο που ονομάζεται γ-αμινοβουτυρικό οξύ ή GABA (Neurol et al., 2021). Ένα γονίδιο για το GAD εισήχθη στον υποθαλαμικό πυρήνα, στους εγκεφάλους ασθενών με PD. Ο στόχος ήταν να αυξηθεί η παρουσία του GABA σε αυτήν την περιοχή του εγκεφάλου, βοηθώντας έτσι στην επαναφορά του μη φυσιολογικού κυκλώματος του εγκεφάλου ανθρώπων που έπασχαν από Parkinson. Δεύτερον, η αρωματική αποκαρβοξυλάση αμινοξέων (AADC, Aromatic L-amino acid decarboxylase) είναι ένα ένζυμο σημαντικό για τη μετατροπή της λεβοντόπα σε ντοπαμίνη, συνεπώς η μείωση της AADC στον εγκέφαλο PD μπορεί να είναι υπεύθυνη για τις αλλαγές στην αποτελεσματικότητα της μακροχρόνιας θεραπείας με λεβοντόπα (Μαζαράκης, 2014). Ένα γονίδιο για το AADC εισήχθη μέσω γενετικά τροποποιημένου ιού στο πονταμένιο του εγκεφάλου ασθενών με PD με στόχο να αυξηθεί η υπάρχουσα ποσότητα του AADC. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η αύξηση ήταν εμφανής, καθιστώντας έτσι τη θεραπεία με Levodopa πιο αποτελεσματική. Τρίτον, η Νευρτουρίνη (NTN, N-terminal nucleophile), που αποτελεί νευροτροφικό παράγοντα ο οποίος προέρχεται από τη γλοία (GDNF, cell line-derived neurotrophic factor), είναι μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των παραγόντων ανάπτυξης των νευρών GDNF (Μαζαράκης, 2014). Ένα γονίδιο για την νευρτουρίνη εισήχθη σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου σε ασθενείς με Parkinson, με στόχο την υποστήριξη της επιβίωσης των νευρώνων. Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων δεν είναι ακόμα γνωστά. Τέταρτον, η υδροξυλάση της τυροσίνης, η

κυκλοϋδρολάση τριφωσφορικής γουανοσίνης και η αποκαρβοξυλάση αρωματικών αμινοξέων, είναι τρία ένζυμα σημαντικά στη σύνθεση της ντοπαμίνης (**Εικόνα 19**). Γονίδια και για τα τρία ένζυμα εισήχθησαν στον εγκέφαλο των ασθενών με PD, με στόχο την αύξηση της παραγωγής ντοπαμίνης.



Εικόνα 19: Επίπεδα ντοπαμίνης στον εγκέφαλο ανθρώπου με Parkinson. Οι σαρωτές δείχνουν υψηλά επίπεδα ντοπαμίνης στον εγκέφαλο που βρίσκεται στο δεξιό μέρος της εικόνας, 6 μήνες μετά από την πραγματοποίηση γονιδιακής θεραπείας [Προσαρμογή από (Μαζαράκης, 2014)].

3.1.1.3.3. Νόσος Canavan (Canavan-Disease ή CD)

Η νόσος Canavan χαρακτηρίζεται ως μια σπάνια λευκοδυστροφία, η οποία προκαλείται από την απώλεια της λειτουργίας του γονιδίου της ασπαρτοκυκλάσης (*Aspartocylase* ή *ASPA*) (Kirmani et al., 2002 ; Moffett et al., 2007). Το προκύπτον δυσλειτουργικό ένζυμο ASPA αναστέλλει τα ολιγοδενδροκύτταρα από την υδρόλυση που προέρχεται από το νευρωνικό N-ακετυλασπαρτικό (N-Acetyl-Aspartic ή NAA), το οποίο αποτελεί ένα από τα πιο άφθονα παράγωγα αμινοξέων του εγκεφάλου, σε οξικό και L-ασπαρτικό. Αυτό οδηγεί στη χαρακτηριστική συσσώρευση NAA στο ΚΝΣ (Matalon et al., 1988 , Toft et al., 1993). Η κλινική εικόνα της CD ποικίλλει ανάλογα με τα επίπεδα δραστηριότητας του ASPA και τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του NAA. Συμπτώματα της νόσου αποτελούν ο προοδευτικός σπογγώδης νευροεκφυλισμός, η προοδευτική νευρολογική αναπηρία, η ανίατη επιληψία, η τροφική δυσανεξία και τελικά στο μεγαλύτερο ποσοστό των περιπτώσεων, ο πρόωρος θάνατος στην εφηβεία ή στην πρώιμη ενήλικη ζωή (Leone et al., 2012). Η προσέγγιση της γονιδιακής θεραπείας με τη χρήση των AAV2 ως φορέων του θεραπευτικού γονιδίου εξελίχθηκε από προηγούμενες μελέτες μεταφοράς γονιδίων χρησιμοποιώντας ένα παγιδευμένο σε λιπίδια πολυκατιονικό συμπυκνωμένο σύστημα παράδοσης (LPD, Lipid-Peptide DNA)

σε συνδυασμό με πλασμίδια που βασίζονται σε AAV που περιέχουν το rASPA (φυσιολογικό γονίδιο). Τα πρώτα δεδομένα αυτής της προσέγγισης ήταν ενθαρρυντικά, αφού οδήγησε σε βελτιώσεις τόσο σε βιοχημικό όσο και σε κλινικό επίπεδο (Leone et al, 2012).

3.1.1.3. Κληρονομική μελαγχρωστική αμφιβληστροειδίτιδα (Retinitis-Pigmentosa ή RP)

Η μελαγχρωστική αμφιβληστροειδίτιδα είναι η πιο κοινή κληρονομική δυστροφία του αμφιβληστροειδούς, που οδηγεί σε τύφλωση. Αποτελεί μια γενετικά ετερογενή ομάδα που περιλαμβάνει περισσότερα από 90 γονίδια (Bainbridge et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008). Επηρεάζει 1 στους 4.000 ανθρώπους παγκοσμίως, είναι σποραδική στο 30% των περιπτώσεων και τις περισσότερες φορές μεταδίδεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο (50-60% των περιπτώσεων), μερικές φορές με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο (30 έως 40% των περιπτώσεων) ή σπάνια συνδέεται με το X χρωμόσωμα (5 έως 15% των περιπτώσεων). Αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι η αδυναμία μετατροπής των φωτονίων του φωτός σε ηλεκτρικά σήματα στον αμφιβληστροειδή, το οποίο απαιτεί την παρουσία της πρωτεΐνης RPE65 (Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein) μεγέθους 65 kilodalton, που είναι ειδική για το επιθήλιο της χρωστικής του αμφιβληστροειδούς. Η RPE65 βρίσκεται σε επιθηλιακά κύτταρα χρωστικής του αμφιβληστροειδούς και μετατρέπει την all-trans-ρετινόλη σε 11-cis-ρετινόλη, η οποία στη συνέχεια σχηματίζει το χρωμοφόρο 11-cis-αμφιβληστροειδούς κατά τη διάρκεια του οπτικού κύκλου (κύκλος ρετινοειδούς) (Maguire et al., 2008; McClements & MacLaren, 2013). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου RPE65 οδηγούν σε μείωση ή απουσία δράσης της ισομεράσης της, η οποία μπλοκάρει τον οπτικό κύκλο και οδηγεί σε απώλεια όρασης. Με την πάροδο του χρόνου, συσσωρεύονται τοξικές ουσίες, γεγονός που οδηγεί στον θάνατο των επιθηλιακών κυττάρων της χρωστικής του αμφιβληστροειδούς και τελικά στον προοδευτικό θάνατο των κυττάρων των φωτοϋποδοχέων (Cideciyan et al., 2013).

Στα τέλη του 2017 και στις αρχές του 2018, ένα σκεύασμα γονιδιακής θεραπείας που ονομάζεται Luxturna έλαβε άδεια κυκλοφορίας από τον FDA και τον EMA αντίστοιχα. Το Luxturna χρησιμοποιεί έναν φυσικώς απαντώμενο αδено-σχετιζόμενο ιό (AAV2), ο οποίος έχει τροποποιηθεί χρησιμοποιώντας τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA, ως όχημα για την παροχή του φυσιολογικού ανθρώπινου γονιδίου RPE65 στα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς προς αποκατάσταση της όρασης (Keeler & Flotte, 2019).

3.1.1.4. Περαιτέρω κλινικές εφαρμογές της in vivo γονιδιακής θεραπείας με AAVs

Παρακάτω φαίνονται λοιπές γενετικές ασθένειες, για τις οποίες υπάρχουν αυτή τη στιγμή ερευνητικά προγράμματα που εστιάζουν στη γονιδιακή θεραπεία.

Πίνακας 1: Λοιπές γενετικές ασθένειες για τις οποίες γίνονται κλινικές μελέτες γονιδιακής θεραπείας. [Προσαρμογή από (Mendell, 2020)].

Ασθένειες	Υπεύθυνα Γονίδια	Οδός Χορήγησης	Κλινικό Στάδιο	Τρέχουσα κατάσταση
Κυστική Ίνωση	CFTR	Πνευμονικά	I	Ολοκληρωμένο
	CFTR	Πνευμονικά	II	Ολοκληρωμένο
	CFTR	Πνευμονικά	II	Ολοκληρωμένο
Αρθρίτιδα	TNFR:Fc	Ενδοθωρακικά	I	Σε εξέλιξη
Κληρονομικό Εμφύσημα	AAT	Ενδοθωρακικά	I	Σε εξέλιξη
Συγγενής Αμαύρωση του Leber	RPE65	Υποαμφιβληστροειδικά	I–II	Σε εξέλιξη
Ηλικιακή Εκφύλιση Της Ωχρής Κηλίδας	sFlt-1	Υποαμφιβληστροειδικά	I–II	Σε εξέλιξη
Νόσος Batten	CLN2	Ενδοθωρακικά	I	Σε εξέλιξη
Μυϊκή Ατροφία Της Σπονδυλικής Στήλης	SMN1	Ενδομυϊκά	I–III	Σε εξέλιξη
Καρδιακή Ανεπάρκεια	SERCA2a	Ενδοστεφανιαία	IIb	Πειραματικό στάδιο

3.1.2. Ρετροϊοί

Η κύρια ιδιότητα των ρετροϊικών φορέων που τους καθιστά ένα ελκυστικό μέσο για κλινικές εφαρμογές της γονιδιακής μεταφοράς, είναι η ικανότητά τους να ενσωματώνονται μόνιμα στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή, εφόσον η διόρθωση της γενετικής βλάβης απαιτεί τη μόνιμη εισαγωγή του θεραπευτικού μορίου DNA. Η ιδιότητα αυτή οδήγησε στην ευρεία χρήση των φορέων αυτών στη γονιδιακή μεταφορά σε αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα, όπου η σταθερή επιμόλυνση προκαλεί τη συνεχή έκφραση του γονιδίου στα διαφοροποιημένα κύτταρα. Επιπλέον, αυτοί οι

φορείς δεν είναι παθογόνοι για τον άνθρωπο και δεν προκαλούν ανοσολογική απόκριση (Bulcha et al., 2021). Οι πρώτοι ιικοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν στη γονιδιακή θεραπεία ήταν οι ογκο-ρετροϊικοί φορείς και συγκεκριμένα φορείς που προήλθαν από τον ιό της λευχαιμίας επίμουσ (MLV) (Mukherjee & Thrasher, 2013).

Ένας μείζων περιορισμός της χρήσης των ρετροϊών στη γονιδιακή θεραπεία είναι ότι μπορούν να μολύνουν μόνο κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο στάδιο της αντιγραφής (κύκλο 10 της αντιγραφής) (Bulcha et al., 2021). Για να λυθεί το συγκεκριμένο πρόβλημα, αναπτύχθηκαν φορείς, όπως οι λεντοϊοί, που έχουν την ικανότητα να μολύνουν μη διαιρούμενα κύτταρα (φάση G0). Όμως η χρήση αυτών των τύπων φορέων εγκυμονεί κάποιους κινδύνους. Παρόλο που η ικανότητα εισαγωγής στα κύτταρα είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό των φορέων, μπορεί εν τούτοις να προκαλέσει κυρίως δύο προβλήματα (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Πρώτον, όταν ο φορέας εντεθεί εντός ενός γονιδίου υπάρχει η πιθανότητα να προκαλέσει σωματική μετάλλαξη (μεταλλαξιγένεση λόγω ένθεσης). Δεύτερον, όταν τα γονίδια εδράζονται κοντά στη θέση ένθεσης του ιικού φορέα πολύ συχνά παρατηρείται ανεξέλεγκτη έκφραση του ιού λόγω των υποκινητών LTR του ιού. Αυτά τα προβλήματα έχουν καταγραφεί σε κλινικές μελέτες και έχουν αποτελέσει την αιτία επανασχεδιασμού ρετροϊικών φορέων (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Ωστόσο, δεν υπάρχει κίνδυνος παραγωγής ενός ιού ικανού για πολλαπλασιασμό που να μπορεί να μεταδοθεί (replication competent), καθώς τα διαθέσιμα συστήματα πακεταρίσματος έχουν διαμοιράσει τα βοηθητικά πλασμίδια σε 4 διαφορετικούς φορείς.

3.1.2.1. Λεντοϊικοί φορείς

3.1.2.1.1. Β θαλασσαιμία

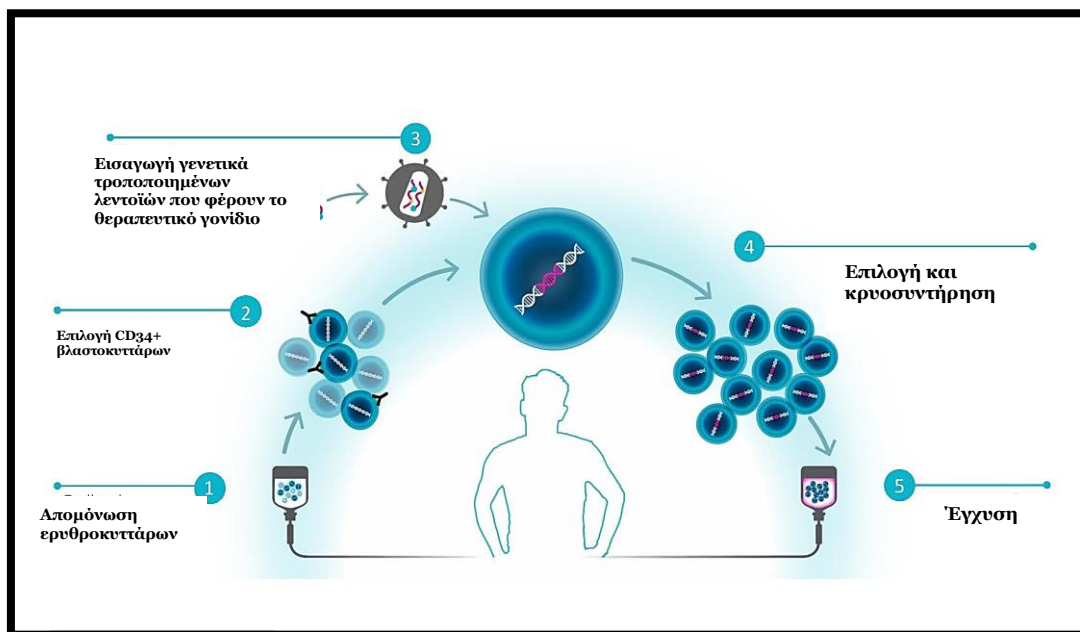
Η β θαλασσαιμία αποτελεί μια κληρονομική αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσο και εμφανίζεται κατά κύριο λόγο σε άτομα που κατοικούν γύρω από τη Μεσόγειο θάλασσα. Εμφανίζεται λόγω μετάλλαξης στο γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα της αιμοσφαιρίνης β (Parapetrou et al, 2011). Η σοβαρότητα της νόσου εξαρτάται από τη φύση της μετάλλαξης. Σήμερα μπορούμε να διακρίνουμε δύο κύριες ομάδες μεταλλάξεων: πρώτον τις μεταλλάξεις στις οποίες γίνεται απαλοιφή μέρους του γονιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο της β σφαιρίνης, και δεύτερον τις μεταλλάξεις χωρίς απαλοιφή, οι οποίες περιλαμβάνουν κυρίως την υποκατάσταση μιας βάσης στο γονίδιο της β σφαιρίνης. Όπως είναι γνωστό η φυσιολογική αιμοσφαιρίνη των ενηλίκων αποτελείται από 2 άλφα και 2 βήτα υπομονάδες. Με κριτήριο αν το άτομο έχει κληρονομήσει ένα ή δύο μεταλλαγμένα γονίδια από τους γονείς, τα συμπτώματα διαφέρουν. Στην ετερόζυγη μορφή, όπου τα άτομα κληρονομούν ένα μεταλλαγμένο

γονίδιο, τα προσβεβλημένα άτομα θα αναπτύξουν μικροκυτταρική αναιμία. Η ανίχνευση συνήθως περιλαμβάνει χαμηλότερη από την κανονική μέση τιμή σωματικού όγκου (<80 fL). Στην ομόζυγη μορφή, όπου τα άτομα έχουν κληρονομήσει δύο μεταλλαγμένα γονίδια, οι ασθενείς εμφανίζουν σοβαρή μικροκυτταρική, υποχρωμική αναιμία. Χωρίς θεραπεία, προκαλείται αναιμία, σπληνομεγαλία και σοβαρές παραμορφώσεις των οστών, που αθροιστικά οδηγούν στο θάνατο πριν από την ηλικία των 20 ετών (Cavazzana-Calvo et al, 2010). Η θεραπεία που συνιστάται είναι η περιοδική μετάγγιση αίματος, η σπληνεκτομή για σπληνομεγαλία και η χηλίωση σε περιπτώσεις υπερφόρτωσης σιδήρου που σχετίζεται με τη μετάγγιση. Δεδομένου ότι η μετάλλαξη μπορεί να είναι αποτέλεσμα αλλαγής μόνο σε μία βάση, οι συνεχείς προσπάθειες αναζήτησης γονιδιακής θεραπείας για να κάνουν αυτή τη μοναδική διόρθωση είναι αναγκαίες.

Είναι γνωστό ότι οι λεντοϊκοί φορείς έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν πολύπλοκες γενετικές δομές σε μη διαιρούμενα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα (Anliker et al., 2010; Frecha et al., 2012; Zhou & Buchholz, 2013). Αφού επιβεβαιώθηκε ότι οι λεντοϊκοί φορείς β-σφαιρίνης είχαν επιδιορθώσει επιτυχώς μοντέλα β-θαλασσαιμίας σε ποντίκια, ξεκίνησε μια ανθρώπινη κλινική μελέτη *ex vivo* γονιδιακής θεραπείας για τις β-αιμοσφαιρινοπάθειες χρησιμοποιώντας λεντοϊκούς φορείς για την παράδοση του θεραπευτικού γονιδίου. Οι μελέτες της γονιδιακής θεραπείας της β θαλασσαιμίας διήρκησαν 20 χρόνια. Σκοπός της γονιδιακής θεραπείας είναι η εισαγωγή του πλήρους λειτουργικού διαγονιδίου της σφαιρίνης τύπου β που είναι υπεύθυνο για τη β θαλασσαιμία στα HSCs (Hematopoietic-Stem-Cells). Οι πρώτες κλινικές δοκιμές που ξεκίνησαν στην Γαλλία το 2006 χρησιμοποίησαν ως φορέα του φυσιολογικού γονιδίου τον λεντοϊό HPV569 (Nakayama, 2010; Zou et al., 2011). Η πρώτη κλινική δοκιμή (LG001) έγινε με τη χρήση του φορέα HPV569. Αυτός ο φορέας ήταν ικανός να εκφράζει ένα διαγονίδιο β-σφαιρίνης που αποτελούνταν από ένα κρίσιμο αμινοξύ το οποίο προέρχεται από την αλυσίδα της γ-σφαιρίνης (β T87Q), η οποία είναι υπεύθυνη για την αναστολή του πολυμερισμού της HbS (Hemoglobin-s), αποκλείοντας το σχηματισμό πολυμερών Hb. Για την κατασκευή του ανασυνδυασμένου λεντοϊού χρειάστηκαν δύο αντίγραφα του πυρήνα του μονωτή χρωματίνης β-σφαιρίνης του κοτόπουλου HS4 (cHS4) τα οποία εισήχθησαν στις ικές μακριές τερματικές επαναλήψεις (LTR) και ενσωματώθηκαν σε ένα πλασμίδιο. Σε ένα δεύτερο πλασμίδιο υπήρχε ενσωματωμένος ο ενισχυτής cHS4, γιατί ο ίδιος μπορεί να αυξήσει την ασφάλεια της προσέγγισης γονιδιακής θεραπείας που βασίζεται σε λεντοϊούς προστατεύοντας τα γειτονικά γονίδια από την ισχυρή επίδραση ενισχυτή του LCR. Οι πρώτοι ασθενείς που έλαβαν αυτή την θεραπεία ήταν αρχικά ετερόζυγοι για τη β

θαλασσαιμία. Οι ασθενείς έλαβαν ένα μυελικό θεραπευτικό σχήμα με ενδοφλέβια βουσουλφάνη σε δόση έναρξης 3,2 mg/kg την ημέρα (Anliker et al., 2010; Frecha et al. 2012; Zhou & Buchholz, 2013). Η φαρμακοκινητική παρακολούθηση επέτρεψε τη διατήρηση της έκθεσης σε 4.500–5.000 (μM·min)/ημέρα για 4 ημέρες. Μετά τη μεταμόσχευση των γενετικά τροποποιημένων κυττάρων HSPC (Hematopoietic-Stem-And-Progenitor-Cells) που προέρχονταν από τον μυελό των οστών, ο ασθενής δεν χρειαζόταν πλέον μετάγγιση, 1 χρόνο μετά τη γονιδιακή θεραπεία. Με την πάροδο του χρόνου, το συνολικό επίπεδο Hb κυμάνθηκε μεταξύ 8 και 9 g/dL, με ίσες αναλογίες HbA (που περιέχει το διαγονιδιακό προϊόν), ενδογενή HbF και αιμοσφαιρίνη E (HbE). Βέβαια, η εισαγωγή του μονωτή cHS4 στα LTRs των λεντοιών είχε ως αποτέλεσμα χαμηλούς τίτλους, κακή απόδοση μεταγωγής και αναδιατάξεις φορέων (Papapetrou et al, 2011).

Λόγω των παραπάνω προβλημάτων κατά την χρήση των τροποποιημένων ιικών φορέων, σχεδιάστηκε ένας νέος ανασυνδυασμένος λεντοιός (BB305) ο οποίος ήταν πανομοιότυπος με τον ανασυνδυασμένο λεντοιό HPV569, με εξαίρεση την απουσία του cHS4 ενισχυτή. Επιπλέον, υπήρχαν περαιτέρω βελτιώσεις στην κατασκευή των νέων ανασυνδυασμένων φορέων (συμπεριλαμβανομένης της αντικατάστασης του υποκινητή 5' LTR με τον υποκινητή κυτταρομεγαλοϊού, για να οδηγήσει στην καλύτερη παραγωγή του ιικού RNA), γεγονός που αύξησε τους τίτλους του φορέα και την αποτελεσματικότητα της μεταγωγής (Thompson et al., 2018). Ο φορέας BB305 χρησιμοποιήθηκε σε τρεις κλινικές μελέτες από διαφορετικά ερευνητικά κέντρα σε ασθενείς με ομόζυγη β θηλασσαιμία. Ο φορέας BB305 χρησιμοποιήθηκε για τη μεταγωγή HSPC από β-θαλασσαιμικούς ασθενείς με χρήση του παράγοντα G-CSF (Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor, Παράγοντας Διέγερσης Αποικίας Κοκκιοκυττάρων). Το CSF αποτελεί έναν αυξητικό παράγοντα που ενισχύει την παραγωγή λευκών αιμοσφαιρίων από τον μυελό των οστών (Pearson, 2018). Το θεραπευτικό αυτό σχήμα είχε ως αποτέλεσμα όλοι οι ομόζυγοι ασθενείς να μην χρειαστούν μετάγγιση για ≥ 12 μήνες (**Εικόνα 20**).

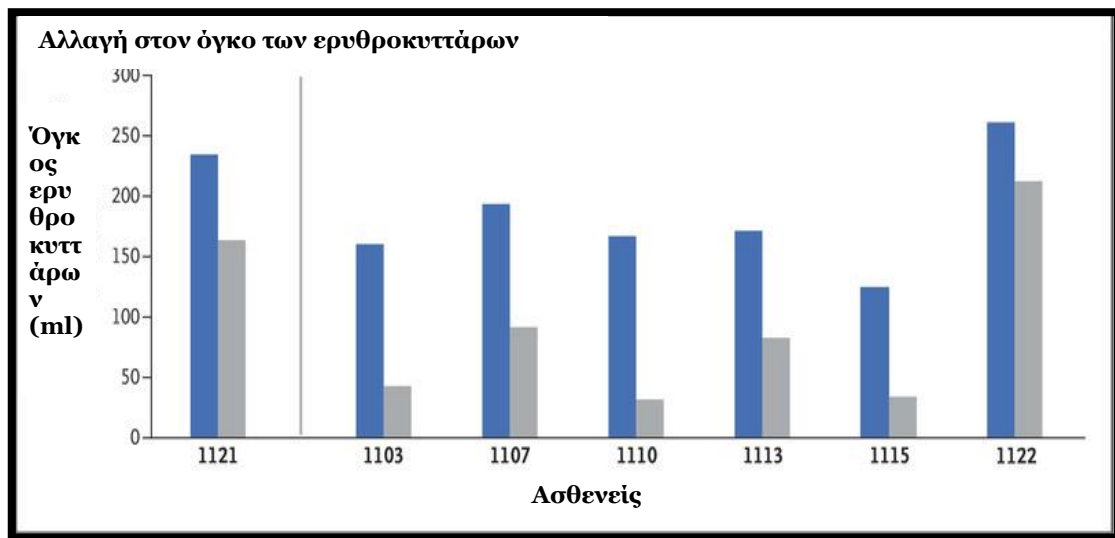


Εικόνα 20: Η διαδικασία της γονιδιακής θεραπείας για την καταπολέμηση την β θαλασσαιμίας με τη χρήση αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων [Προσαρμογή από (Pearson, 2018)].

Από νεότερες κλινικές δοκιμές που γίνονται στις ΗΠΑ (NCT02186418 και NCT02247843), είναι γνωστό ότι ένα διαγονίδιο β-σφαιρίνης προερχόμενο από λεντοϊκό φορέα φιλοξενεί τρεις μεταλλάξεις αντιδρεπανοειδούς σημείου (Arya & Sahi, 2023): την T87Q (για την παρεμπόδιση της πλευρικής επαφής με τη βαλίνη 6 της β S αλυσίδας), την E22A (για τη διακοπή των διαμεμβρανικών επαφών μεταξύ των κυττάρων) και την G16D (για την παροχή στο διαγονίδιο ανταγωνιστικού πλεονεκτήματος έναντι της β S όσον αφορά την αλληλεπίδραση με το πολυπεπτίδιο α-σφαιρίνης). Η λειτουργική ανάλυση έδειξε ότι η καθαρισμένη ανασυνδυασμένη β-σφαιρίνη αναστέλλει έντονα τον πολυμερισμό των τετραμερών HbS. Έχει αποδειχθεί ότι αυτός ο φορέας βελτιώνει τον φαινότυπο των κυττάρων SCD των ερυθρών αιμοσφαιρίων που διαφοροποιούνται *in vitro* από τα HSPC ασθενών (Arya & Sahi, 2023).

Πλέον, την πιο σύγχρονη θεραπεία γονιδιακής θεραπείας κατά της θαλασσαιμίας β αποτελεί το LentiGlobin. Για την αξιολόγηση της ασφάλειας του LentiGlobin γίνεται έγχυση του φορέα στο περιφερικό αίμα των ασθενών, η οποία παρακολουθείται μέχρι και τη διακοπή των μεταγγίσεων των ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά από 6 μήνες (Thompson et al., 2018). Συνεπώς, η αξιολόγηση ασφάλειας αφορά το ποσοστό θανάτου που σχετίζεται με τη μεταμόσχευση στις 100 ημέρες, τη συνολική επιβίωση, τις ανεπιθύμητες ενέργειες και τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες (ταξινομημένες σύμφωνα με τα διεθνή πρότυπα), και την ανίχνευση αντιγραφής που προέρχεται από φορείς μετά το πέρας της γονιδιακής θεραπείας (**Εικόνα 21**). Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες σε ασθενείς με συνεχή παρακολούθηση, που είχαν λάβει τη θεραπεία, είχε προσδιοριστεί η μείωση του αριθμού των μεταγγίσεων συγκρίνοντας

την με τον μέσο ετήσιο αριθμό και όγκο μεταγγίσεων για τα 2 χρόνια πριν από την έγχυση του φαρμακευτικού προϊόντος (Thompson et al., 2018).



Εικόνα 21: Ανάλυση αποτελεσμάτων σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με LentiGlobin. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται οι ασθενείς πριν τη χορήγηση του θεραπευτικού προϊόντος της γονιδιακής θεραπείας (LentiGlobin) ενώ με μπλε απεικονίζονται οι ίδιοι ασθενείς μετά την θεραπεία (LentiGlobin). Όπως φαίνεται στο διάγραμμα μετά την γονιδιακή θεραπεία έχουμε αύξηση της παραγωγής ερυθροκυττάρων σε ασθενείς με β θαλασσαιμία, πράγμα που υποδεικνύει την επιτυχία της θεραπείας [Προσαρμογή από (Μαζαράκης, 2014)].

Συμπερασματικά η γονιδιακή θεραπεία με το φαρμακευτικό προϊόν LentiGlobin κατάφερε να ξεπεράσει τον κύριο περιορισμό της αλλογενούς μεταμόσχευσης των αιμοποιητικών κυττάρων, που είναι η έλλειψη ιστοσυμβατότητας του δότη. Το προφίλ ασφαλείας μετά την έγχυση ήταν σύμφωνο με αυτό που σχετίζεται με τα παγκόσμια πρότυπα (Thompson et al., 2018). Αρκετοί από τους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία έφτασαν ή πλησίασαν τα φυσιολογικά όρια των επιπέδων αιμοσφαιρίνης, σύμφωνα με αυτά ασθενών με φυσιολογική ερυθροποίηση. Ακόμη, ασθενής που εμφάνισε ομαλοποίηση της υπερσιδήρωσης, μπόρεσε να διακόψει τόσο τη χηλοποίηση του σιδήρου όσο και τη θεραπευτική φλεβοτομή με τη χρήση της γονιδιακής θεραπείας. Αρκετοί ομόζυγοι ασθενείς έπαψαν να λαμβάνουν μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και οι συνεχείς βελτιώσεις στην κατασκευή του φαρμακευτικού προϊόντος υπόσχονται την επίτευξη παρόμοιων αποτελεσμάτων και αυξημένο προσδόκιμο ζωής (Μαζαράκης, 2014).

3.1.2.1.2. Καρκίνος του προστάτη

Ο καρκίνος του προστάτη αποτελεί τον πιο συχνά εμφανιζόμενο καρκίνο στους άνδρες. Εμφανίζεται κυρίως σε ηλικίες άνω των 50 ετών και αποτελεί έναν αργά αναπτυσσόμενο καρκίνο (Aiuti et al., 2013; Charrier et al., 2006; Marangoni et al., 2009; Rivat et al., 2012; Scaramuzza et al., 2013). Προκαλείται λόγω συσσώρευσης

ενός εύρους μεταλλάξεων στο DNA των κυττάρων του προστάτη, που αφορούν τα γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη, τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης βλαβών DNA και τον κυτταρικό θάνατο, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών και τη δημιουργία όγκου (Cattaneo et al., 2008; Russell et al., 2012). Αρκετές μελέτες επιβεβαιώνουν την κληρονομική βάση του καρκίνου του προστάτη, αφού έχει βρεθεί ότι άνδρες με συγγενή πρώτου βαθμού που νοσεί από καρκίνο προστάτη, έχουν διπλάσια πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο προστάτη σε σχέση με αυτούς που δεν έχουν κάποια σχετική συγγένεια. Σημαντικές μελέτες σε επίπεδο γονιδιώματος, έχουν εντοπίσει περισσότερες από 100 παραλλαγές γονιδίων που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη (Cattaneo et al., 2008; Russell et al., 2012). Η μεγαλύτερη αύξηση κινδύνου σχετίζεται με το γονίδιο BRCA2 (έως και οκτώ φορές αυξημένος κίνδυνος) και του γονιδίου HOXB13 (τρεις φορές αυξημένος κίνδυνος), με τα δύο αυτά γονίδια να εμπλέκονται στην επιδιόρθωση βλαβών DNA. Παραλλαγές σε άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA έχουν επίσης συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του προστάτη συμπεριλαμβανομένων των BRCA1, NBS1, MSH2, MSH6, PMS2, CHEK2, RAD51D και PALB2 (Grozescu & Pora, 2017). Παραλλαγές στο γονιδίωμα κοντά στο ογκογονίδιο MYC συνδέονται επίσης με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη.

Η γονιδιακή θεραπεία για την καταπολέμηση του καρκίνου του προστάτη χρησιμοποιεί ένα γενετικά τροποποιημένο λεντοϊκό φορέα. Οι ερευνητές τροποποιώντας την περιοχή Fab (περιοχή αναγνώρισης αντιγόνου) του ιικού γονιδιώματος του φορέα, κατέστησαν δυνατή την εξειδίκευση του λεντοϊκού φορέα για τα κύτταρα του καρκίνου του προστάτη. Συγκεκριμένα ο λεντοϊός μετασχηματίζεται, δεσμευόμενος στην τραστουζουμάμπη για να προσκολληθεί σε ευαίσθητες σε ανδρογόνα LNCaP και υποδοχείς ανθεκτικούς στην καταστροφή καρκινικών προστατικών κυττάρων C4-2. Αυτά είναι κυρίως υπεύθυνα για την έκκριση περίσσειας του υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER-2), που είναι μια ορμόνη που συνδέεται με τον καρκίνο του προστάτη. Η προσκόλληση του λεντοϊκού φορέα σε αυτά τα κύτταρα και η αλλαγή του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων κυττάρων του προστάτη, μπορεί να επιβραδύνει την ανάπτυξη κυττάρων που προκαλούν καρκίνο, ακόμη και να τα σκοτώσει (Grozescu & Pora, 2017).

3.1.2.1.3. Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος (Chronic-Granulomatous-Disease ή CGD)

Η χρόνια κοκκιωματώδης νόσος (CGD) αποτελεί μια κληρονομική ασθένεια, όπου τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αδυνατούν να αντιδράσουν με ενώσεις οξυγόνου για την καταπολέμηση ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών που έχουν καταποθεί (Roos, 2016). Αυτό οδηγεί στον σχηματισμό κοκκιωμάτων σε πολλά όργανα. Στις περισσότερες περιπτώσεις η νόσος μεταδίδεται λόγω μιας μετάλλαξης που υπάρχει στο X χρωμόσωμα μέσα στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη gp91 p91-PHOX. Σε μερικές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί και αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα της νόσου CGD (Chronic-Granulomatous-Disease, Χρόνια κοκκιωματώδης νόσος), που αφορά άλλες μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες της ομάδας PHOX. Ακόμα τα χαμηλά επίπεδα οξειδάσης NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase), ενός συμπαραγόντα που απαιτείται για τη σύνθεση υπεροξειδίου, μπορεί να οδηγήσει σε νόσο CGD (Roos, 2016). Αυτό έχει αναφερθεί σε γυναίκες που είναι ομόζυγες για την μετάλλαξη που προκαλεί ανεπάρκεια αφυδρογονάσης 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD, glucose-6-phosphate dehydrogenase), η οποία χαρακτηρίζεται από μειωμένα επίπεδα NADPH. Σε αυτήν την περίπτωση η ανοσολογική λειτουργία των φαγοκυττάρων είναι ανεπαρκής, ως αποτέλεσμα των μεταλλάξεων σε συστατικά του ενζύμου NADPH. Εάν αυτό το ένζυμο γίνει ανεπαρκές, τα φαγοκύτταρα δεν μπορούν να σκοτώσουν αποτελεσματικά τα βακτήρια και σχηματίζονται κοκκιώματα. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια δίνει έμφαση στη χρήση λεντοϊκών φορέων, ειδικών για την έκφραση μιας φυσιολογικής εκδοχής σε μια από τις μεταλλαγμένες πρωτεΐνες CGD, επιτρέποντας στα λευκά αιμοσφαίρια να παράγουν το φυσιολογικό ένζυμο της οξειδάσης NADPH (Donald, 2020). Αυτό το στέλεχος λεντοϊού δημιουργήθηκε μετά από μόλυνση στα κύτταρα HEK293T με ψευδοτυποποιημένο ιό με την πρωτεΐνη φυσαλιδώδους στοματίτιδας G. Ο σκοπός του ιικού φορέα ήταν να αυξήσει την παραγωγή ενός λειτουργικού γονιδίου οξειδάσης NADPH σε αυτά τα φαγοκύτταρα (Donald, 2020).

3.1.2.1.4. Βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια συνδεόμενη με το χρωμόσωμα X (X-linked Severe Combined Immunodeficiency ή X-SCID)

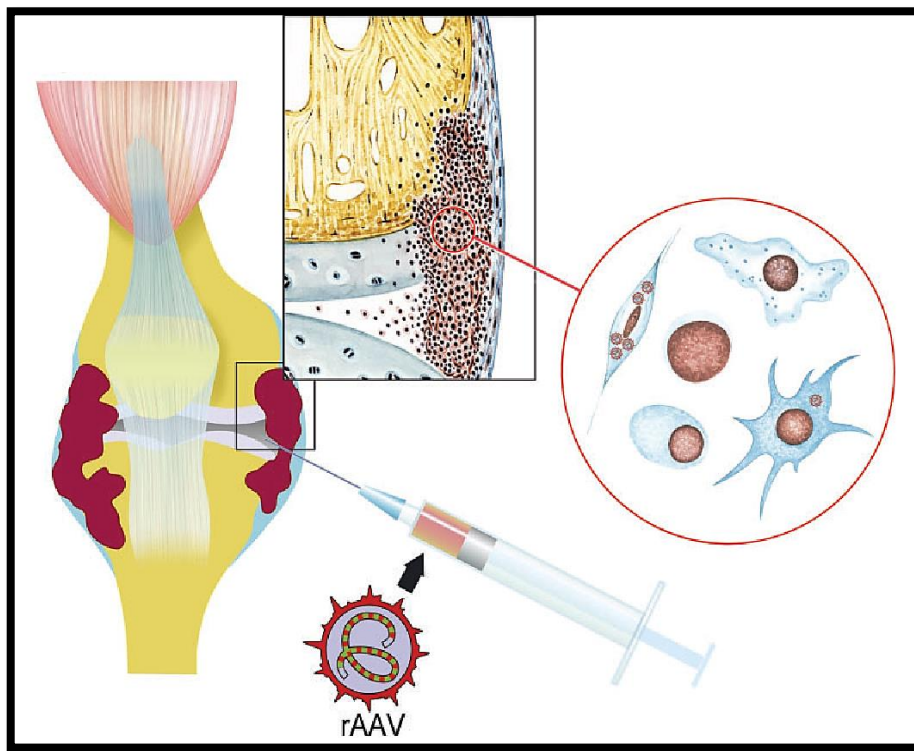
Η βαριά συνδυασμένη ανοσοανεπάρκεια (SCID) χαρακτηρίζεται από την έλλειψη των T λεμφοκυττάρων και την έλλειψη ή τη μη λειτουργία των B λεμφοκυττάρων (Blaese et al., 1995). Είναι μια γενετικά ετερογενής ασθένεια που προκαλείται από πολυάριθμες γενετικές μεταλλάξεις οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετικές

κλινικές εκδηλώσεις στα άτομα που πάσχουν (Aiuti et al., 2009; Candotti et al., 2012; Cavazzana-Calvo et al., 2012; Fischer et al., 2013; Gaspar, 2012; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Η SCID περιλαμβάνει ελαττωματική απόκριση αντισωμάτων είτε λόγω άμεσης εμπλοκής με τα Β λεμφοκύτταρα, είτε μέσω ακατάλληλης ενεργοποίησης Β λεμφοκυττάρων λόγω των μη λειτουργικών Τ-βοηθητικών κυττάρων. Οι ασθενείς με SCID συνήθως επηρεάζονται από σοβαρές βακτηριακές, ιογενείς ή μυκητιακές λοιμώξεις, νωρίς στη ζωή τους και συχνά παρουσιάζουν διάμεση πνευμονοπάθεια, χρόνια διάρροια και αδυναμία ανάπτυξης. Συχνές είναι οι μολύνσεις αυτιών, η υποτροπιάζουσα πνευμονία από το *Pneumocystis jirovecii* και η άφθονη στοματική καντιντίαση (Aiuti et al., 2009; Candotti et al., 2012; Cavazzana-Calvo et al., 2012; Fischer et al., 2013; Gaspar, 2012; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Τα μωρά που πάσχουν από SCID εάν δεν λάβουν θεραπεία, πεθαίνουν μέσα σε ένα χρόνο λόγω σοβαρών επαναλαμβανόμενων λοιμώξεων. Μια νέα μέθοδος γονιδιακής θεραπείας που χρησιμοποιεί μια τροποποιημένη έκδοση του λεντοϊκού φορέα (Cowan et al., 2021) εφαρμόστηκε σε κλινικές δοκιμές στις οποίες πήραν μέρος οκτώ παιδιά με X-SCID, και το 2021 η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε 50 παιδιά με ADA-SCID, με θετικά αποτελέσματα σε 48 από αυτά. Σε αυτή τη μέθοδο ένας αυτοαπενεργοποιούμενος λεντοϊκός φορέας, ο EFS-ADA LV, χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή ενός λειτουργικού γονιδίου ADA σε αυτόλογα CD34+ αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και προγονικά κύτταρα (HSPCs). Συγκεκριμένα, τα ελαττωματικά βλαστοκύτταρα που απομονώθηκαν από τους ασθενείς με SCID εμβολιάστηκαν με τον γενετικά τροποποιημένο λεντοϊκό φορέα, που περιείχε το υγιές ανθρώπινο γονίδιο ενδιαφέροντος. Ακολούθησε επώαση των τροποποιημένων βλαστοκυττάρων σε ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης, τα οποία στη συνέχεια μεταμοσχεύθηκαν στους ασθενείς, μετά την απομόνωση του ιού από τα κύτταρα, ώστε να πραγματοποιηθεί η εισαγωγή και ο πολλαπλασιασμός του υγιούς ανθρώπινου γονιδίου μέσα στα βλαστοκύτταρα του ασθενούς (Cowan et al., 2021). Αυτές οι «διορθωμένες» εκδοχές κυττάρων αναμένεται να διαιρούνται περαιτέρω και να πολλαπλασιάζονται, μεταφέροντας τελικά τα φυσιολογικά γονιδιακά αντίγραφα σε όλα τα κύτταρα του αίματος. Πάνω από το 95% των ασθενών που έλαβαν τη συγκεκριμένη θεραπεία συνέχισαν να ζουν χωρίς επεισόδια μετά από 36 μήνες και το 100% των ασθενών επέζησε από αυτή τη θανατηφόρα ασθένεια.

3.1.2.1.5. Ρευματοειδής αρθρίτιδα (Rheumatoid-Arthritis ή RA)

Η ρευματοειδής αρθρίτιδα αποτελεί μια μακροχρόνια αυτοάνοση διαταραχή που επηρεάζει κυρίως τις αρθρώσεις. Τυπικά εκδηλώνεται με φλεγμονή στα άκρα των χεριών και των ποδιών, με τις προσβεβλημένες αρθρώσεις να είναι πρησμένες, ζεστές και δύσκαμπτες (Athanasopoulos et al., 2017). Η αυξημένη δυσκαμψία νωρίς το πρωί είναι συχνά ένα εξέχον χαρακτηριστικό της νόσου και συνήθως διαρκεί περισσότερο από μία ώρα. Μελέτες συσχέτισης σε επίπεδο γονιδιώματος, οι οποίες εξετάζουν μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς, έχουν βρει περίπου εκατό αλληλόμορφα που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης ρευματοειδούς αρθρίτιδας. Τα αλληλόμορφα κινδύνου που βρίσκονται εντός των γονιδίων HLA (ιδιαίτερα οι γενετικοί τόποι HLA-DRB1) ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο από άλλους τόπους (Athanasopoulos et al., 2017). Άλλοι γενετικοί τόποι κινδύνου περιλαμβάνουν γονίδια που επηρεάζουν συν-διεγερτικά ανοσολογικά μονοπάτια, όπως για παράδειγμα τα μονοπάτια CD28 και CD40, τα μονοπάτια σηματοδότησης κυτοκίνης, το κατώφλι ενεργοποίησης υποδοχέα λεμφοκυττάρων (π.χ. PTPN22) και η έμφυτη ανοσολογική ενεργοποίηση, φαίνεται να έχουν επιρροή στην παθογένεση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, αλλά σίγουρα μικρότερη από τις μεταλλάξεις HLA.

Οι κλινικές μελέτες με χρήση γονιδιακής θεραπείας για τη ρευματοειδή αρθρίτιδα βρίσκονται ακόμα σε πειραματικό στάδιο. Οι πιο πρόσφατες μελέτες έχουν βρει ότι η έγχυση ενός λεντοϊκού φορέα που φέρει γονίδια τα οποία εκφράζουν την IL-10 στη μήτρα ποντικών μπορεί να καταστείλει και να αποτρέψει τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και να δημιουργήσει νέα κύτταρα με σταθερή γονιδιακή έκφραση (Adriaansen, 2006). Αυτό συμβάλλει στα δεδομένα για τα βλαστοκύτταρα και τον ενδομήτριο εμβολιασμό ικών φορέων για γονιδιακή θεραπεία (**Εικόνα 22**). Ο στόχος του ικού φορέα σε αυτές τις μελέτες ήταν τα αρθρικά κύτταρα. Τα φυσιολογικά λειτουργικά αρθρικά κύτταρα παράγουν TNFα και IL-1.



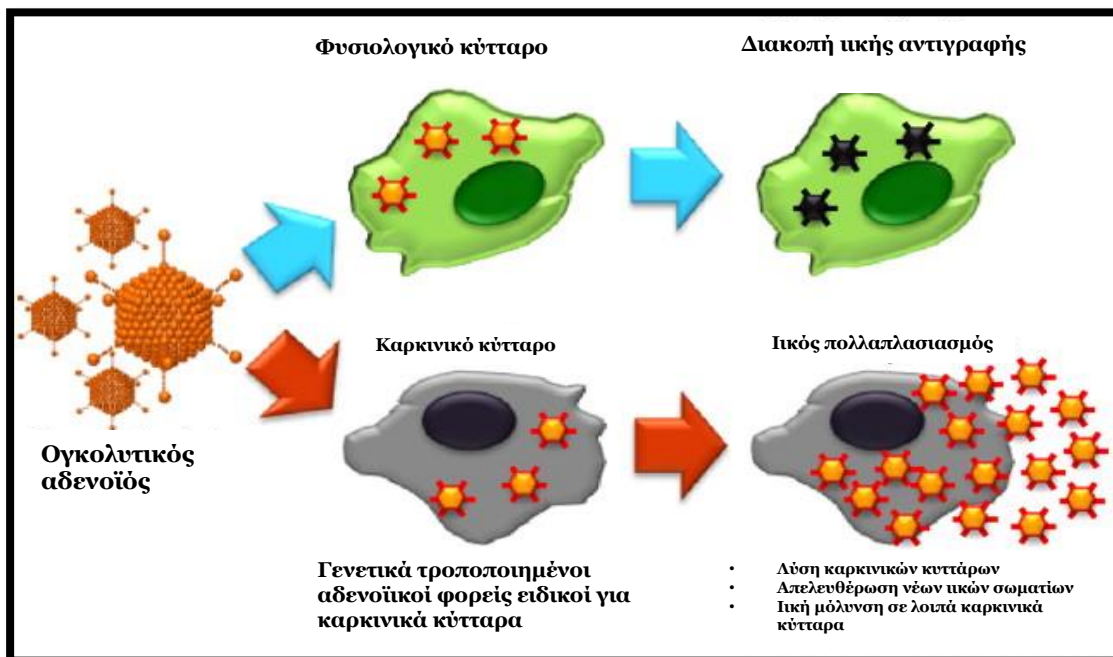
Εικόνα 22: Η έγχυση των γενετικά τροποποιημένων βλαστοκυττάρων με rAAV, στις αρθρώσεις για την καταπολέμηση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας [Προσαρμογή από (Adriaansen, 2006)].

3.1.3. Αδενοϊοί

3.1.3.1. Πειραματικές κλινικές εφαρμογές έναντι του καρκίνου

Οι τροποποιημένοι αδενοϊικοί φορείς έχουν χρησιμοποιηθεί σε πειραματικό στάδιο σε πολλές εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας. Μια από αυτές, αποτελεί τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου (Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012). Τα τελευταία μοντέλα αδενοϊών που μελετήθηκαν και χρησιμοποιούνται στις εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας αποτελούν τροποποιημένες εκδόσεις του Ad5 και είναι δύο τύπων. Πρώτον ο ελαττωματικός ως προς την αναπαραγωγή (Replication-Defective ή RD) αδενοϊός και δεύτερον ο ικανός για αναπαραγωγή αδενοϊός (**Εικόνα 23**). Στους φορείς RD, τα γονίδια *E1A* (εκφράζει απαραίτητες πρωτεΐνες για την αντιγραφή του αδενοϊού) και *E1B* (αναστέλλει την αποπτωτική απόκριση του κυττάρου ξενιστή στη μόλυνση Ad) έχουν διαγραφεί και αντικαθίστανται από μια κασέτα έκφρασης με έναν υποκινητή υψηλής δραστηριότητας, όπως ο άμεσος πρώιμος υποκινητής του κυτταρομεγαλοϊού (CMV, Cytomegalovirus) που οδηγεί την έκφραση του ξένου διαγονιδίου (Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012). Οι περισσότεροι αδενοϊικοί φορείς στερούνται των γονιδίων *E3* τα οποία γενικά εμποδίζουν τα μολυσμένα κύτταρα να εξαλειφθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα και δεν είναι απαραίτητα για την αδενοϊική αντιγραφή σε κυτταρική καλλιέργεια ή *in vivo* (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Οι φορείς από τους οποίους έχουν απαλειφθεί τα γονίδια *E1A* και *E1B* κατασκευάζονται συνήθως από πλασμίδια που περιέχουν το γενετικά τροποποιημένο

αδενοϊκό γονιδίωμα και αναπτύσσονται σε συμπληρωματικές κυτταρικές σειρές όπως η HEK293.



Εικόνα 23: Η εξειδίκευση των γενετικά τροποποιημένων αδενοϊκών φορέων ως προς τα καρκινικά κύτταρα, με σκοπό τη μόλυνση και την απελευθέρωση τοξικών φαρμάκων έναντι αυτών. [Προσαρμογή από (Choi et al., 2012)]

Στην *in vivo* γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου έχουν χρησιμοποιηθεί αδενοϊκοί φορείς οι οποίοι αντιγράφονται πολύ πιο αργά σε σχέση με το φυσιολογικό (ελαττωματική αντιγραφή) με σκοπό την αποφυγή του υπερπολλαπλασιασμού του ιού και της μόλυνσης του ασθενούς από τον ίδιο τον ιό (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Συγκεκριμένα θεραπευτικά γονίδια που μπορούν να σκοτώσουν τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου, η οποία βασίζεται σε ελαττωματικούς φορείς. Στην πράξη, εφάρμοσαν έναν συνδυασμό γονιδιακής θεραπείας χρησιμοποιώντας ένα γονίδιο αυτοκτονίας και διάφορα γονίδια κυτοκίνης που απελευθερώνονται μέσω του αδενοϊκού φορέα με ελαττωματική αντιγραφή (Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012). Ένα γονίδιο αυτοκτονίας μετατρέπει ένα μη τοξικό προφάρμακο σε τοξικό φάρμακο, όπως για παράδειγμα η κινάση θυμιδίνης του ιού του απλού έρπητα μετατρέπει τη μη τοξική γκανσικλοβίρη σε τριφωσφορικό, το οποίο προκαλεί τον θάνατο μόνο των καρκινικών κυττάρων και όχι των φυσιολογικών. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση του όγκου, αλλά και την τοπική απελευθέρωση αντιγόνου όγκου που προκαλεί κυτταρική ανοσολογική απόκριση. Το συγκεκριμένο θεραπευτικό προϊόν κρίθηκε ως ασφαλές αλλά χρειάζεται βελτιώσεις όσον αφορά την αποτελεσματικότητά του (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Οι περισσότερες κλινικές δοκιμές της γονιδιακής θεραπείας έχουν γίνει με τη χρήση ογκολυτικού αδενοϊκού φορέα σε ανθρώπους και πλέον έχουν περιοριστεί στην τοπική θεραπεία του καρκίνου της κεφαλής και του τραχήλου, του γλοιοβλαστώματος και του μελανώματος (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Ωστόσο, η συστηματική χορήγηση ογκολυτικού Ad απαιτείται για την αποτελεσματική θεραπεία τόσο του πρωτοπαθούς όσο και του μεταστατικού καρκίνου. Βέβαια η συστηματική χορήγηση του ογκολυτικού Ad χρειάζεται ακόμη να ξεπεράσει τρία σημαντικά εμπόδια που περιορίζουν την κλινική του εφαρμογή. Αρχικά ο αδενοϊός προκαλεί ισχυρή έμφυτη ανοσολογική απόκριση αλληλεπιδρώντας με μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών, όπως η ιντερλευκίνη-6 (IL-6), ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α και η ιντερφερόνη γ (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Δεύτερον, επειδή σε περιπτώσεις νόσησης από αδενοϊό προκαλείται έντονη ανοσοαπόκριση από προϋπάρχον εξουδετερωτικό αντίσωμα κατά του αδενοϊού (Ab), τα άτομα που είχαν προηγουμένως εκτεθεί στον Ad παράγουν αυτά τα εξουδετερωτικά αντί-Ad Ab, με αποτέλεσμα την ταχεία κάθαρση του ογκολυτικού Ad, που περιορίζει τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα του τροποποιημένου αδενοϊκού φορέα. Τέλος, η συστηματική έγχυση ογκολυτικού αδενοϊού σε κλινικές εφαρμογές είναι περιορισμένη λόγω σημαντικής ηπατοτοξικότητας και ανοσογονικότητας που προκαλείται λόγω της μη ειδικής ηπατικής δέσμευσης του συστηματικά χορηγούμενου ογκολυτικού Ad. Αυτά τα εμπόδια προκαλούνται κυρίως από τη μη ειδική αλληλεπίδραση της ογκολυτικής καψιδιακής πρωτεΐνης του αδενοϊού (καψιδιακή πρωτεΐνη core) με το περιβάλλον του ξενιστή. Έτσι, πολυμερή και άλλα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καλύψουν το καψίδιο Ad, το οποίο μπορεί να μειώσει την αντι-ική ανοσολογική απόκριση και τη μη ειδική διακίνηση από το ήπαρ, και να αυξήσει τη συσσώρευση όγκου του Ad (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Συνεπώς, είναι κοινά αποδεκτό ότι οι αδενοϊκοί φορείς ενώ μπορούν να λειτουργήσουν σε πειράματα *in vitro*, στην *in vivo* γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου δεν μπορούν να μεταφέρουν και να σκοτώσουν όλα τα καρκινικά κύτταρα. Έτσι λόγω ανεπαρκούς θεραπευτικής αποτελεσματικότητας η ενδοκυτταρική γονιδιακή θεραπεία (p53) που χρησιμοποιεί αδενοϊκό φορέα με ελαττωματική αναπαραγωγή δεν εγκρίθηκε από τον FDA (Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012).

3.1.3.2. Λοιπές εφαρμογές των αδενοϊών στη γονιδιακή θεραπεία

Οι αδενοϊκές εφαρμογές στη γονιδιακή θεραπεία αναφέρονται συνήθως στη χρήση διάφορων τύπων αδενοϊών για τη θεραπεία γενετικών διαταραχών ή ασθενειών

(Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012). Αυτές οι εφαρμογές απαιτούν περαιτέρω έρευνα και κλινικές δοκιμές προτού γίνουν ευρέως διαθέσιμες, αλλά αναπαριστούν τον τομέα της γονιδιακής θεραπείας με απεριόριστες δυνατότητες για το μέλλον (Lukashev & Zamyatnin, 2016).

Πρώτη εφαρμογή αποτελεί η θεραπεία συγγενών ασθενειών. Οι αδενοϊοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διορθώσουν γενετικές διαταραχές, όπως η κυστική ίνωση, με τη μεταφορά υγιών γονιδίων σε ασθενή κύτταρα (Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012). Στην περίπτωση της κυστικής ίνωσης, η αιτία της ασθένειας είναι μια μετάλλαξη στο γονίδιο CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), το οποίο ελέγχει την παραγωγή ενός προϊόντος που είναι σημαντικό για την κανονική λειτουργία των κυττάρων του πνεύμονα, του παγκρέατος και άλλων οργάνων (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Στη γονιδιακή θεραπεία με αδενοϊούς, επιχειρείται η εισαγωγή ενός υγιούς αντιγράφου του γονιδίου CFTR στα κύτταρα του ασθενούς. Ο αδενοϊός χρησιμοποιείται ως μέσο παράδοσης αυτού του υγιούς γονιδίου. Αυτό το νέο γονίδιο CFTR παράγει λειτουργικό προϊόν CFTR, το οποίο βοηθά και βελτιώνει την λειτουργία των κυττάρων. Αυτή η προσέγγιση βρίσκεται υπό έρευνα και ανάπτυξη, και έχει το δυναμικό να προσφέρει έναν νέο τρόπο θεραπείας για ασθενείς με κυστική ίνωση (Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012).

Η επόμενη εφαρμογή αφορά την θεραπεία νευρολογικών ασθενειών. Σε περιπτώσεις όπως η νόσος του Huntington, μπορεί να εξεταστεί η χρήση αδενοϊών για να μεταφερθούν υγιή γονίδια (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Στη νόσο Huntington η γονιδιακή θεραπεία με αδενοϊούς μπορεί να στοχεύσει στην επαναφορά ή τη μείωση των ελαττωματικών γονιδίων που προκαλούν τη νόσο του Huntington. Αυτό μπορεί να βοηθήσει στην ανακούφιση από τα συμπτώματα και την επιβράδυνση της προόδου της νόσου (Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012). Ακόμα σε περιπτώσεις λυσοσωμικών αποθηκευτικών ασθενειών οι αδενοϊοί έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της νόσου Tay-Sachs και της νόσου Gaucher. Επίσης σε εγκεφαλικά επεισόδια οι αδενοϊοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παράδοση θεραπευτικών γονιδίων με σκοπό την ανακούφιση από επιπτώσεις του εγκεφαλικού επεισοδίου.

Τέλος, αναφορικά με την θεραπεία των καρδιακών ασθενειών, οι αδενοϊοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιδιόρθωση καρδιακών βλαβών και την προώθηση της ανάπτυξης υγιούς καρδιακού ιστού (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Τέτοιες εφαρμογές λαμβάνουν χώρα σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και κληρονομικές καρδιακές ασθένειες, όπου οι αδενοϊοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παράδοση γονιδίων που βελτιώνουν τη λειτουργία της καρδιάς και αυτό μπορεί να βοηθήσει στην ενίσχυση

της συστολικής ή διαστολικής λειτουργίας της καρδιάς και να βελτιώσει την καρδιακή απόδοση (Brentjens et al., 2011; Scholler et al., 2012).

3.1.4. Βακουλοϊοί

Οι βακουλοϊοί έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν διαγονίδια σε διάφορα κύτταρα θηλαστικών. Μια από τις πιο σημαντικές εφαρμογές των βακουλοϊών στη γονιδιακή θεραπεία αποτελεί η αντιμετώπιση του καρκίνου, με εμφανή θεραπευτικά αποτελέσματα στην καταστολή της ανάπτυξης του όγκου (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021). Επίσης, οι βακουλοϊοί έχουν χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση του γλοιώματος στον εγκέφαλο, για την παροχή του γονιδίου που εκφράζει την τοξίνη της A διφθερίτιδας και για την παροχή του γονιδίου που εκφράζει την τοξίνη κινάση θυμιδίνης (HSVtk), η οποία μεσολαβεί στον κυτταρικό θάνατο. Το γονίδιο της τοξίνης της κινάσης θυμιδίνης εκφράστηκε υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή (HMBG2, High-mobility group protein B2) ο οποίος παρουσία φυσιολογικών κυττάρων έχει χαμηλή δραστηριότητα. Ακόμα, έχει αναφερθεί ότι η μεσολαβούμενη από βακουλοϊούς έκφραση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου (NES1, ειδικό γονίδιο-1 των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων) αναστέλλει την ανάπτυξη των γαστρικών καρκινικών κυττάρων (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021).

Μετά από κλινικές μελέτες, φάνηκε ότι οι βακουλοϊοί έχουν αντι-ικές και αντικαρκινικές δράσεις. Όσο αφορά τις αντι-ικές δράσεις, το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει εστιάσει στην ενίσχυση της διαγονιδιακής έκφρασης σε κύτταρα με ανοσοανεπάρκεια (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021). Συγκεκριμένα μετά τη μόλυνση με τον ιό της ηπατίτιδας C σε ποντίκια, η έμφυτη ανοσία διαταράχθηκε λόγω της διάσπασης του IPS-1 από την ιική πρωτεάση NS3/4A, οδηγώντας σε ενίσχυση της γονιδιακής έκφρασης από τους ανασυνδυασμένους βακουλοϊούς. Ακόμα, οι ανασυνδυασμένοι βακουλοϊοί είναι ικανοί να προστατέψουν τα ποντίκια από ιογενείς λοιμώξεις όπως από τον ιό της γρίπης και τον ιό της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας. Όσον αφορά τις αντικαρκινικές εφαρμογές, η επίκτητη αντινεοπλασματική ανοσία που προκαλείται από τους βακουλοϊούς άγριου τύπου AcMNPV, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει την ενεργοποίηση κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, NK (Natural Killer Cells) κυττάρων ή την παραγωγή αντισωμάτων, μπορεί επίσης να καταστείλει την ανάπτυξη όγκου του μελανώματος σε ποντίκια. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι αυτό το χαρακτηριστικό των βακουλοϊών μπορεί να είναι χρήσιμο για την επιλεκτική γονιδιακή μεταγωγή σε κύτταρα με μειωμένη έμφυτη ανοσία που

προκύπτει από μόλυνση με διάφορους ιούς όπως ο HIV (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021).

Η συνεχής ανάπτυξη της τεχνολογίας των βακουλοϊών βρίσκεται σε συνεχή εξέλιξη στη βιολογία, ειδικά στη δομική βιολογία, τη βιοχημεία και την κυτταρική βιολογία. Οι βακουλοϊοί έχουν επίσης αναπτυχθεί ως ασφαλείς και αποτελεσματικοί φορείς παροχής γονιδίων, εξαιτίας του διαφορετικού τροπισμού εισόδου και της αδυναμίας αντιγραφής τους σε κύτταρα θηλαστικών (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021). Ωστόσο, οι αντι-βακουλοϊκές αποκρίσεις, που προκαλούνται από την αναγνώριση του μη μεθυλιωμένου CpG DNA του γονιδιώματος του βακουλοϊού σε κύτταρα θηλαστικών με τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό τύπο, είναι υπό εξέταση. Από την άλλη πλευρά, αυτές οι απαντήσεις μπορούν επίσης να αξιοποιηθούν για πιο αποτελεσματικό εμβολιασμό, δεδομένου ότι η επαγωγή μιας ισχυρής ανοσοενισχυτικής δραστηριότητας κατά των κυττάρων του ανοσοποιητικού είναι πολύτιμη σε αυτό το πλαίσιο. Επομένως, η επιμόλυνση βακουλοϊών που προέρχονται από BEVS σε κύτταρα στόχους, μπορεί να προσφέρει οφέλη για τους εμβολιασμένους ασθενείς (Heinimäki., et al 2022). Πρόσφατα, βρέθηκε ότι σωματίδια VLP (Virus-Like Particles, Ιόμορφα Σωματίδια) καθαρισμένα με υπερφυγοκέντρωση υπό βαθμίδωση συγκέντρωσης σακχαρόζης που προήλθαν από ανασυνδυασμένα κύτταρα εντόμων μολυσμένα με βακουλοϊούς, ήταν ικανά να προκαλέσουν ανοσογονικότητα και παραγωγή Β κυττάρων (Heinimäki., et al 2022). Ωστόσο, για λόγους ασφαλείας, οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες ή τα VLP που προέρχονται από το BEVS που έχουν εγκριθεί και διατίθενται στο εμπόριο ως εμβόλια καθαρίζονται πάντα, επειδή η χρήση βακουλοϊών ως φορέων για την παράδοση γονιδίων στον άνθρωπο και οι πιθανές παρενέργειές τους εξακολουθούν να είναι αμφιλεγόμενες. Αν και τα προφίλ έκφρασης κυτταρικών γονιδίων στα κύτταρα θηλαστικών δεν αλλάζουν σημαντικά κατά τη μόλυνση με βακουλοϊούς, αρκετές αναφορές έχουν δείξει ότι ο ισχυρός μεταενεργοποιητής βακουλοϊών IE2 μπορεί να ενισχύσει όχι μόνο την έκφραση των γονιδίων των βακουλοϊών αλλά και τη δραστηριότητα υποκινητή θηλαστικών σε κύτταρα θηλαστικών (Heinimäki., et al 2022).

Η δημιουργία ανασυνδυασμένων βακουλοϊών και η χρήση των εμπορικά διαθέσιμων ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που παράγονται από το σύστημα BEVS (Baculovirus Expression Vector System, Σύστημα Έκφρασης Βακουλοϊών) ρυθμίζονται σύμφωνα με τους όρους του Πρωτοκόλλου της Καρθαγένης για τη Βιοασφάλεια στη Σύμβαση για τη Βιολογική Ποικιλότητα, η οποία είναι μια διεθνής συμφωνία μεταξύ 170 υπογραφόντων χωρών, συμπεριλαμβανομένων εκείνων της ΕΕ, της Κίνας και της Ιαπωνίας, προκειμένου να είναι βέβαιο ότι υπάρχει επαρκής

ασφάλεια κατά τον χειρισμό ή τη μεταφορά ζωντανών τροποποιημένων οργανισμών (Heinimäki., et al 2022). Για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που αφορούν την πρακτική χρήση εμβολίων τα οποία προέρχονται από το BEVS και περιέχουν ζωντανούς βακουλούς, απαιτείται περαιτέρω ανάπτυξη σε τεχνικό επίπεδο. Έτσι με την ενίσχυση ασφαλείας για την αποφυγή του έντονου πολλαπλασιασμού των γονιδίων του βακουλίου το σύστημα BEVS αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τις επόμενες γενιές εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας. Ωστόσο, η έκφραση αυτών των γονιδίων *in vitro* για την κατανόηση της παραγωγής του μολυσματικού ιού προκαλεί μερικές φορές τον έντονο πολλαπλασιασμό των βακουλίων (Heinimäki., et al 2022).

Κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης βακουλίου ψευδότυπου gr64 σε κύτταρα εντόμων που εκφράζουν τη gr64, παρατηρήθηκε εμφάνιση υψηλής συχνότητας ενός ιού ικανού για αναπαραγωγή που ενσωματώνει το γονίδιο gr64 στο ιικό γονιδίωμα (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021). Αυτές οι αναφορές υπογραμμίζουν πολυάριθμες ανησυχίες σχετικά με τη μελλοντική χρήση του BEVS στην ανάπτυξη επαναστατικών εμβολίων, συμπεριλαμβανομένων των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών και των ζωντανών βακουλίων, ως αντιγόνων και ως φυσικών ανοσοενισχυτικών, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, απαιτούνται πρόσθετες έρευνες σχετικά με τις πιθανές παρενέργειες της μόλυνσης κυττάρων θηλαστικών με βακουλούς για την αξιολόγηση ασφαλείας, με εστίαση στην αλλαγή των εκφράσεων των κυτταρικών γονιδίων ή στην επαγωγή οδών σηματοδότησης (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021).

3.1.5. Βακτηριοφάγοι

3.1.5.1. Βακτηριακή αντοχή και ανάγκη εφαρμογής της φαγοθεραπείας

Η βακτηριακή αντοχή στις μέρες μας αποτελεί ένα αναδυόμενο φαινόμενο αφού παρατηρείται δραματική αύξηση αυτής. Σύμφωνα με την Παγκόσμια Συμμαχία κατά της Αντίστασης στα Αντιβιοτικά (WAAR, Παγκόσμια Συμμαχία κατά της Αντίστασης στα Αντιβιοτικά, World Alliance Against Antibiotics Resistance), με το πέρασμα του χρόνου όλο και περισσότερα συμβατικά αντιβιοτικά χάνουν εντελώς την αποτελεσματικότητά τους ενάντια στις βακτηριακές λοιμώξεις, κυρίως λόγω της υπερβολικής χρήσης τους, η οποία έχει οδηγήσει στη δημιουργία πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών (Rios et al., 2016; Kutter et al., 2015; Kaźmierczak et al., 2014). Η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών σχετίζεται με την αύξηση του αριθμού των ατόμων που χρειάζονται υγειονομική περίθαλψη σε νοσοκομεία, ως αποτέλεσμα της γήρανσης του πληθυσμού, και με την ταυτόχρονη αύξηση των χρόνιων ασθενειών και

των λοιμώξεων που σχετίζονται επίσης με ανάγκη νοσηλείας ασθενών σε νοσοκομεία (Fair & Tor, 2014). Έτσι, η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών στον άνθρωπο οδηγεί στην ύπαρξη ανθεκτικών βακτηρίων ακόμα και στη φυσιολογική μικροχλωρίδα, συμβάλλοντας στη διάδοση των γονιδίων ανθεκτικότητας στο περιβάλλον, ένα φαινόμενο που είναι πολύ έντονο στα νοσοκομεία και στους χώρους περίθαλψης (Nitsch-Osuch et al., 2016). Ακόμα, η υπερβολική χρήση αντιβιοτικών σε ζώα εκτροφής επιτείνει το φαινόμενο της βακτηριακής αντοχής (Aarestrup, 2015; Boerlin and Reid-Smith, 2008; Donabedian et al., 2003; Wegener, 2003; Aarestrup et al., 2000).

Η βακτηριακή αντοχή καταδεικνύει ξεκάθαρα την ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικών και βιώσιμων εναλλακτικών λύσεων έναντι της τρέχουσας μορφής αντιβιοτικής θεραπείας, με στόχο την προστασία της δημόσιας υγείας (Rios et al., 2016; Dąbrowska et al., 2014; Oldfield and Feng, 2014; WHO, 2015). Οι βακτηριοφάγοι αποτελούν μια καινοτόμο εναλλακτική στο πρόβλημα της βακτηριακής αντοχής αφού οι ίδιοι διαθέτουν έμφυτη αντιμικροβιακή δράση και έχουν τη δυνατότητα να χρησιμεύσουν ως βιώσιμες λύσεις αντί της συμβατικής αντιμικροβιακής θεραπείας (Dąbrowska et al., 2014; Pirnay et al., 2012; Cairns et al., 2009; Górski et al., 2020).

Η χρήση βακτηριοφάγων στη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων πλεονεκτεί έναντι της θεραπείας με συμβατικά αντιβιοτικά, πρώτον, επειδή δεν παρεμβαίνει στη φυσιολογική μικροχλωρίδα καθώς αποτελεί στοχευμένη θεραπεία και, δεύτερον, επειδή δεν απαιτεί διαδοχικές χορηγήσεις του παράγοντα καθώς ο βακτηριοφάγος αναπαράγεται μόνος του στον ξενιστή και σταματά τη δράση του όταν ο ξενιστής του δεν υπάρχει πλέον. Η θεραπευτική επιτυχία λοιπόν επιτυγχάνεται λόγω της εξαφάνισης του αιτιολογικού παράγοντα δηλαδή του παθογόνου βακτηρίου (Shlezinger et al., 2017).

Στη Δημοκρατία της Γεωργίας (Ινστιτούτο Eliana και Κέντρο Φαγοθεραπείας, στην Τιφλίδα) και στην Πολωνία (Ινστιτούτο Ανοσολογίας και Πειραματικής Θεραπείας, στη Βαρσοβία), η χρήση της θεραπείας με βακτηριοφάγους έχει εφαρμοστεί εκτενώς και με επιτυχία τις τελευταίες δεκαετίες έναντι βακτηριακών λοιμώξεων (Kutter et al., 2010; Górski et al., 2016). Ωστόσο, παρά τις τεράστιες δυνατότητες των βακτηριοφάγων για την εξάλειψη λοιμώξεων που προκαλούνται από βακτηριακά στελέχη που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός κλινικών δοκιμών έχουν εγκριθεί από τις αρχές δημόσιας υγείας (όπως ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) και ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA)) και έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής σε ανθρώπους.

Τα ζητήματα που σχετίζονται με τη θεραπευτική χρήση βακτηριοφάγων, οδηγούν στην ανακάλυψη νέων στελεχών βακτηριοφάγων και την καταγραφή τους. Η ανακάλυψη νέων στελεχών αυξάνει τις πιθανότητες εύρεσης βακτηριοφάγων κατάλληλων για χρήση στη γονιδιακή θεραπεία, τα οποία έχουν πρόσφατα συζητηθεί εκτενώς από αρκετούς συγγραφείς από τον τομέα της θεραπείας με βακτηριοφάγους (Maura and Debarbieux, 2011; Flaherty et al., 2009; Debarbieux et al., 2016; Sarker and Brüssow, 2016).

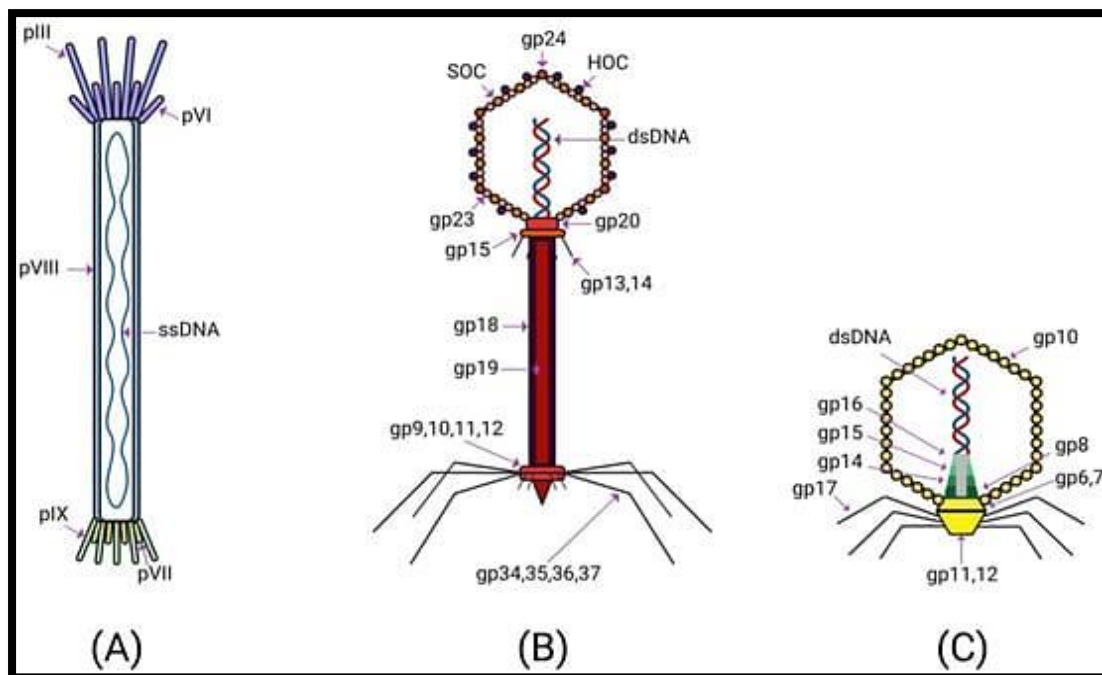
3.1.5.3. Βακτηριοφάγοι ως φορείς παράδοσης θεραπευτικών γονιδίων

Οι βακτηριοφάγοι έχουν δύο πλεονεκτήματα που τους καθιστούν βέλτιστους φορείς στη γονιδιακή θεραπεία. Πρώτον, το περίβλημα του φάγου προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση μετά την ένεση και η ικανότητα εμφάνισης ξένων μορίων στο περίβλημα του φάγου επιτρέπει επίσης τη στόχευση συγκεκριμένων τύπων κυττάρων (Clark and March, 2006). Δεύτερον, η επιφανειακή δομή του βακτηριοφάγου έχει πλήθος υποδοχέων που τους παρέχει ευελιξία και υψηλή εξειδίκευση ως προς συγκεκριμένα είδη κυττάρων. Για τους βακτηριοφάγους έχει ταυτοποιηθεί ένα σύστημα μεταφοράς γονιδίων, το οποίο τροποποιείται ανάλογα με το είδος του βακτηριοφάγου (Karimi et al., 2016; Haq et al., 2012; Clark and March, 2006) **(Εικόνα 24)**.

Όσον αφορά τον βακτηριοφάγο Phi29, η περιοχή συσκευασίας DNA αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματική για τη συσκευασία ιικού dsDNA και το RNA του είχε υψηλή τάση να σχηματίζει διμερή, τριμερή και εξαμερή (Lee et al., 2009). Αυτή η περιοχή χρησιμοποιεί ATP για να ωθήσει το DNA στο προκαψίδιο και απαιτεί μόνο τρία συστατικά, τις πρωτεΐνες gp10 (συνδετήρας) και gp16 καθώς και ένα μικρό RNA συσκευασίας (pRNA) (Henry and Debarbieux, 2012). Κατασκευάζοντας αυτόν τον μοριακό μηχανισμό του βακτηριοφάγου Phi29 (Hao et al. 2014) μπορούν να παραχθούν γενετικά τροποποιημένοι βακτηριοφάγοι οι οποίοι θα φέρουν το επιθυμητό γονίδιο.

Ο βακτηριοφάγος M13 διαθέτει ένα ειδικό ανισότροπο σχήμα (Karimi et al., 2016) μαζί με μια μακρόστενη αρχιτεκτονική που μοιάζει με ράβδο, με αποτέλεσμα να εμφανίζει ιδιότητες υγρών κρυστάλλων που τους επιτρέπει να μολύνουν τα κύτταρα στόχους πολύ πιο εύκολα. Ακόμα, αυτό επιτρέπει στον βακτηριοφάγο M13 να έχει υψηλή διείσδυσή στα στοχευμένα κύτταρα, η οποία είναι πιο έντονη λόγω του μεγαλύτερου αριθμού αλληλεπιδράσεων συνδέτη-υποδοχέα. Σε αντίθεση με τους βακτηριοφάγους σφαιρικού σχήματος, οι νηματοειδείς βακτηριοφάγοι έχουν την τάση να μεταναστεύουν προς τα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων όταν χορηγούνται *in vivo* και επομένως έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να αλληλεπιδράσουν με τους

υποδοχείς αυτών των κυττάρων (Karimi et al., 2016; Bakhshinejad et al., 2015). Τα σωματίδια βακτηριοφάγου μπορούν έτσι να χρησιμοποιηθούν ως σχεδιασμένοι φορείς διαγονιδίου (Karimi et al., 2016; Henry and Debarbieux, 2012) για τη στοχευμένη παροχή τόσο θεραπευτικών παραγόντων όσο και γενετικών αλληλουχιών, αντιπροσωπεύοντας ένα νέο εργαλείο νανοτεχνολογίας στα συστήματα χορήγησης φαρμάκων



Εικόνα 24: Απεικονίζονται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι βακτηριοφάγοι στην παράδοση γονιδίων. Η δομή (Α) ανήκει στον βακτηριοφάγο M13, η (Β) στον βακτηριοφάγο T4, η (Γ) στον βακτηριοφάγο Phi29 [Προσαρμογή από (Petrov, 2022)].

3.1.5.3.1. Λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος

Οι πνευμονικές λοιμώξεις αποτελούν τις πιο κοινές λοιμώξεις που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά (Rios et al., 2018; Balcão et al., 2014a; Matinkhoo et al., 2011). Οι βακτηριοφάγοι είναι ικανοί να καταπολεμήσουν αυτές τις λοιμώξεις, καθώς έχουν δοκιμαστεί *in vitro* σε ποντίκια με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, ειδικά όταν οι φάγοι χορηγηθούν μέσω νεφελοποίησης υπό τη μορφή αερολύματος (Borie et al., 2009; Cao et al., 2015; Carmody et al., 2010, Cooper et al., 2014; Golshahi et al., 2011; Saussereau et al., 2014; Henry et al., 2013). Σε λοιμώξεις της αναπνευστικής οδού, οι βακτηριοφάγοι μπορούν να χορηγηθούν τοπικά στους ιστούς των πνευμόνων ως αεροζόλ, γεγονός που επιτρέπει την παροχή υψηλότερων συγκεντρώσεων στο σημείο της μόλυνσης, αποφεύγοντας έτσι τη διασπορά των αντιβακτηριακών παραγόντων σε άλλα μέρη του σώματος, αυξάνοντας σημαντικά τη δραστηριότητά τους *in situ* και μειώνοντας τις πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες (Rios et al., 2018; Balcão et al., 2014a; Golshahi et al., 2011; Matinkhoo et al.,

2011). Παράδειγμα αποτελεί η περίπτωση της χρήσης ενός εμπορικού σκευάσματος βακτηριοφάγου (Pyophage) σε παιδί 5 ετών που είχε διαγνωστεί με κυστική ίνωση και δεν ανταποκρίθηκε στην καθιερωμένη αντιβιοτική θεραπεία. Ως υπεύθυνα βακτήρια για τη μόλυνση θεωρήθηκαν η *Pseudomonas aeruginosa* και ο *Staphylococcus aureus*. Ο φάγος χορηγήθηκε μέσω νεφελοποιητή από τη ρινική οδό, τρεις φορές την ημέρα. Μετά από έξι ημέρες θεραπείας, η συνολική κατάσταση του παιδιού βελτιώθηκε σημαντικά και μετά από είκοσι ημέρες θεραπείας παρατηρήθηκε αύξηση βάρους, κάτι που δεν είχε παρατηρηθεί σε διάστημα ενός έτους πριν από τη θεραπεία. Μετά από 3 κύκλους θεραπείας, ο τελευταίος από τους οποίους περιελάμβανε και τετρακυκλίνη, τα παθογόνα βακτήρια (*Pseudomonas aeruginosa* και ο *Staphylococcus aureus*) δεν ήταν ανιχνεύσιμα στα πτύελα (Kutateladze and Adamia, 2008).

Σε άλλη περίπτωση απομονώθηκε πολυανθεκτικό στέλεχος της *P. aeruginosa* από ασθενή με κυστική ίνωση και χορηγήθηκε ενδορινικά σε ποντίκια για να προκληθεί πνευμονία. Η πρόοδος της λοίμωξης εκτιμήθηκε με ποσοτικοποίηση των βακτηρίων, των φλεγμονωδών δεικτών και των επιπέδων κυτταροτοξικότητας (απόπτωσης και λύσης). Στη συνέχεια για τη θεραπεία της πνευμονίας χρησιμοποιήθηκε ο βακτηριοφάγος Phi29. Δύο δόσεις βακτηριοφάγου (3×10^7 και 3×10^8) (μονάδες σχηματισμού πλάκας [PFU, Plaque-forming unit] ανά ποντίκι) δοκιμάστηκαν σε ζώα που έλαβαν θανατηφόρες δόσεις *P. aeruginosa*. Είκοσι ώρες μετά την έναρξη της θεραπείας, προσδιορίστηκε ποσοτικά ο αριθμός των βακτηρίων, ο οποίος μειώθηκε κατά περισσότερες από δύο τάξεις μεγέθους στην ομάδα που έλαβε αγωγή με υψηλή δόση βακτηριοφάγου σε σύγκριση με την ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία. Υπήρξε επίσης ισχυρή μείωση των κυτοκινών και της γαλακτικής αφυδρογονάσης (δείκτης κυτταρικού θανάτου) στην ομάδα που έλαβε θεραπεία με βακτηριοφάγο σε σύγκριση με την ομάδα που δεν έλαβε θεραπεία. Τα ίδια ευνοϊκά αποτελέσματα βρέθηκαν και στις ιστολογικές αναλύσεις των πνευμόνων των ζώων. Όταν το ενδορινικό αεροζόλ του ίδιου βακτηριοφάγου εφαρμόστηκε πριν από τη μόλυνση, χρησιμοποιήθηκε για την πρόληψη της πνευμονίας. Η ανοσοϊστοχημική εξέταση των πνευμόνων από ποντικούς που έλαβαν προηγουμένως βακτηριοφάγους Phi29 έδωσε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν μετά από θεραπευτική αγωγή με αντιβιοτικά (Morello et al., 2011).

Όσον αφορά την θεραπεία της κυστικής ίνωσης, οι επιστήμονες έχουν εστιάσει σε μια άλλη ομάδα παθογόνων που επηρεάζει σημαντικά τους ασθενείς αυτούς, και πρόκειται για το Gram-αρνητικό παθογόνο *Burkholderia cepacia* (BCC). Για την καταπολέμηση αυτού του βακτηρίου χρησιμοποιήθηκαν δύο βακτηριοφάγοι αντί-BCC (KS4-M και F φKZ), οι οποίοι λυοφιλοποιήθηκαν και δοκιμάστηκαν έναντι των

παθογόνων *BCC* και *P. aeruginosa* σε ένα μοντέλο *in vitro*. Αυτοί οι βακτηριοφάγοι φάνηκε να είναι ενεργοί έναντι των παθογόνων βακτηρίων και μπορούσαν να διασπαρούν ως αεροζόλ. Έτσι, η λυοφιλοποίηση πιθανά διευκολύνει τη χορήγηση βακτηριοφάγων μέσω της εισπνοής (Golshahi et al., 2011). Επίσης, άλλοι βακτηριοφάγοι καθώς και ένα κοκτέιλ βακτηριοφάγων (KS4-M, KS14, φKZ/D3 και φKZ/D3/KS4-M) λυοφιλοποιήθηκαν και αποδείχθηκαν ως βιώσιμοι και κατάλληλοι για διασπορά ως αεροζόλ (Matinkhoo et al., 2011). Ακόμα, σε ένα ζωικό μοντέλο πνευμονίας που προκλήθηκε από το *BCC* σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς, οι επιστήμονες εξέτασαν τη δραστηριότητα του βακτηριοφάγου T4 που χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά ή ως αεροζόλ. Η θεραπεία με αεροζόλ ήταν πολύ πιο αποτελεσματική στη θεραπεία της πνευμονίας από την ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση και η ίδια κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η θεραπεία με φάγο με βάση το αεροζόλ φαίνεται να είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη θεραπεία βακτηριακών αναπνευστικών λοιμώξεων που εμφανίζουν υψηλή αντοχή στα αντιβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλούνται από βακτήρια *BCC*.

Η χορήγηση φάγων μέσω ψεκασμού χρησιμοποιήθηκε επίσης σε πειραματικές μολύνσεις *E. coli* σε κοτόπουλα, όπου δύο βακτηριοφάγοι (ονομαζόμενοι SPRO2 και DAF6) χρησιμοποιήθηκαν έναντι στελεχών *E. coli* που είχαν απομονωθεί από πουλερικά. Η μόλυνση προκλήθηκε από μια σχετικά χαμηλή δόση βακτηρίων (10^4 CFU ανά πτηνό που εγχύθηκε στον θωρακικό αερόσακο). Η θνησιμότητα των πτηνών μειώθηκε σημαντικά (από 50% σε 20%) όταν οι φάγοι χορηγήθηκαν αμέσως μετά την εμφάνιση αλλά είχαν μικρή αποτελεσματικότητα θεραπείας όταν χορηγήθηκαν 24 ή 48 ώρες μετά την εμφάνιση (Huff et al., 2003). Οι βακτηριοφάγοι ήταν επίσης αποτελεσματικοί όταν εφαρμόστηκαν πριν από τα βακτήρια, δηλαδή είχαν καλή προστατευτική δράση (Huff et al., 2002). Αργότερα, η ίδια ομάδα διαπίστωσε ότι κανένα είδος ψεκασμού δεν προστατεύει τα πτηνά από μόλυνση που προκαλείται ενδοτραχειακά με *E. coli* σε υψηλότερη δόση. Αποτελεσματική προστασία επιτεύχθηκε όταν ο βακτηριοφάγος χορηγήθηκε επίσης ενδοτραχειακά. Αυτό υποδηλώνει ξανά, ότι τουλάχιστον σε ορισμένα μοντέλα, η χορήγηση βακτηριοφάγων στο σημείο μιας βακτηριακής μόλυνσης είναι πιο αποτελεσματική από έναν ψεκασμό με φάγο, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά την έκβαση της θεραπείας (Huff et al., 2013).

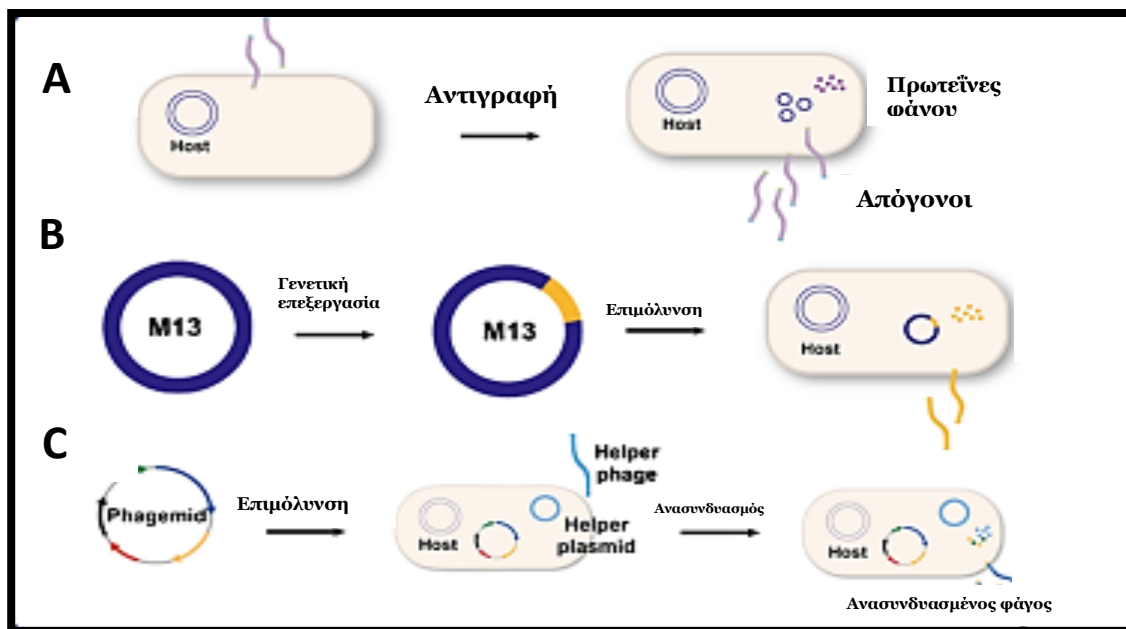
3.1.5.4.2. Λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος

Οι πρώτες αναφορές θεραπείας γαστρεντερικών λοιμώξεων με τη χρήση φάγων προήλθαν από το εργαστήριο βακτηριοφάγων Eliava στη δημοκρατία της Γεωργίας το 1930. Όπως είναι γνωστό, ο αριθμός των βακτηριοφάγων στο ανθρώπινο έντερο

μπορεί να φτάσει και τα 10^{15} σωματίδια (Dalmasso et al., 2014), όπου κυριαρχούν τρεις οικογένειες βακτηριοφάγων, η Siphoviridae, η Myoviridae και η Podoviridae (Babickova and Gardlik, 2015). Οι βακτηριοφάγοι αλληλεπιδρούν με τη μικροχλωρίδα του εντέρου επηρεάζοντας την άμεσα. Η αλληλεπίδραση αυτή αποτέλεσε την ιδέα για την έναρξη κλινικών δοκίμων φαγοθεραπείας. Οι πρώτες κλινικές μελέτες για τη χρήση βακτηριοφάγων έδειξαν καλά αποτελέσματα στην καταπολέμηση των λοιμώξεων από τη χολέρα στην Ινδία και την Ανατολική Ευρώπη. Οι επόμενες εφαρμογές της φαγοθεραπείας αναφέρθηκαν στους στρατιώτες του δευτέρου παγκοσμίου πολέμου για την καταπολέμηση της δυσεντερίας. Αν και οι επιστημονικές αναφορές από εκείνη την εποχή είναι λίγες, οι σοβιετικοί στρατιώτες εμφάνισαν 10 φορές μικρότερη συχνότητα εμφάνισης επεισοδίων δυσεντερίας σε σύγκριση με στρατιώτες που δεν έλαβαν θεραπεία με φάγο (Kutter et al., 2010).

Πιο σύγχρονες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα, αποκάλυψαν ισχυρή δράση των βακτηριοφάγων έναντι των παθογόνων του εντέρου. Ειδικοί φάγοι που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της διάρροιας η οποία προκαλείται από το εντεροπαθογόνο *E. coli* σε μοσχάρια, χοιρίδια και αρνιά ήταν πολύ αποτελεσματικοί στην καταπολέμηση της διάρροιας. Συγκεκριμένα ο νηματοειδής φάγος M13 χρησιμοποιείται συνήθως ως φορέας μεταγωγής για την παροχή ωφέλιμων φορτίων DNA σε βακτήρια. Οι βακτηριοφάγοι M13 χρησιμοποιήθηκαν για διαλογή για μικρά αντιμικροβιακά πεπτιδικά (AMPs) και πεπτιδικές τοξίνες με υψηλή ισχύ έναντι του *E. coli* (**Εικόνα 25**). Τα πιο ισχυρά AMPs που εντοπίστηκαν ήταν η σεροπίνη και η απιδεκίνη, ενώ η πιο ισχυρή τοξίνη ήταν η CcdB. Αυτά τα γονίδια στη συνέχεια κλωνοποιήθηκαν σε ένα μόνο βακτηριοφάγο (M13) και παραδόθηκαν στα βακτήρια-στόχους. αυτός ο ανασυνδυασμένος βακτηριοφάγος μείωσε τη βιωσιμότητα του *E. coli* κατά τέσσερις τάξεις μεγέθους μετά από 6 ώρες θεραπείας, παράγοντας έτσι ένα αποτελεσματικό θεραπευτικό προϊόν γονιδιακής θεραπείας από έναν κανονικά αβλαβή φάγο. Αυτό το σύστημα προστάτευσε επίσης από το θάνατο σημαντικά τα ποντίκια σε μοντέλο μόλυνσης από περιτονίτιδα. Τα ποντίκια που υποβλήθηκαν στην ίδια θεραπεία με φάγους όσο ανιχνευόταν το εντεροπαθογόνο *E. coli* συνέχισαν να εκκρίνουν τους φάγους στα κόπρανα (Smith and Huggins, 1983), γεγονός που δείχνει ότι ένα θετικό θεραπευτικό αποτέλεσμα σχετιζόταν με την ικανότητα των φάγων να πολλαπλασιάζονται εντός του γαστρεντερικού σωλήνα. Μια από τις πιο σημαντικές κλινικές εφαρμογές των βακτηριοφάγων είναι η καταπολέμηση του παθογόνου εντερικού βακτηρίου *E. coli* O104 που παράγει την τοξίνη Shiga. Συγκεκριμένα το 2011, στη Γερμανία, αναφέρθηκε ένα μεγάλο κρούσμα αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου και αιματηρής διάρροιας που προκλήθηκε από το συγκεκριμένο στέλεχος, που είχε ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά πρώτης γραμμής όπως οι πενικιλίνες και οι

κεφαλοσπορίνες, καθιστώντας τη θεραπεία πολύ δύσκολη. Οι βακτηριοφάγοι αποδείχθηκαν αποτελεσματικοί στην καταπολέμηση αυτού του βακτηρίου, προσφέροντας έτσι μια εναλλακτική λύση για την καταπολέμηση λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτό το ανθεκτικό στα αντιβιοτικά παθογόνο.



Εικόνα 25: Απεικονίζονται τα βήματα παραγωγής ανασυνδρασμένων βακτηριοφάγων

A Απεικόνιση της διαδικασίας μόλυνσης και παραγωγής του φυσικού φάγου M13.

B Απεικόνιση του μηχανισμού μόλυνσης ενός ανασυνδρασμένου φορέα φάγου.

C Απεικόνιση του συστήματος παραγωγής ικών σωματιδίων.

[Προσαρμογή από (Wang et al., 2023)]

Στις πιο σημαντικές εφαρμογές της φαγοθεραπείας ανήκει η καταπολέμηση των τροφικών δηλητηριάσεων. Η πιο συχνή αιτία τροφικής δηλητηρίασης, είναι το παθογόνο βακτήριο *Campylobacter jejuni*, το οποίο μολύνει τουλάχιστον 2 εκατομμύρια ανθρώπους κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες (Siringan et al., 2011). Η κατανάλωση κακοψημένου, ωμού ή μολυσμένου κρέατος φαίνεται να είναι η κύρια πηγή μόλυνσης από αυτόν τον μικροοργανισμό (Wagenaar et al., 2013). Η ισχυρή παθογόνος δράση του *C. jejuni* έγκειται στην ικανότητά του να σχηματίζει βιομεμβράνες, γεγονός που καθιστά τα αντιβιοτικά ακόμη λιγότερο αποτελεσματικά (Ica et al., 2012 ; Lu et al., 2012) και την καταπολέμησή του ακόμα πιο δύσκολη. Για το λόγο αυτό έγινε δοκιμή της επίδρασης δύο φάγων (CP8 και CP30) σε βιομεμβράνες που σχηματίζονται σε επιφάνεια από τα στελέχη *C. jejuni* NCTC 11168 και PT14. Ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός λύσης βακτηριακών κυττάρων με τη μεσολάβηση φάγου περιλαμβάνει ζεύγη χολίνης/μεταχολίνης που εισάγονται στην κυτταρική μεμβράνη και δημιουργούν πόρους, οι οποίοι χρησιμεύουν ως αγωγοί για τις λυσίνες προκειμένου να μετατοπιστούν και να υποβαθμίσουν το κυτταρικό τοίχωμα του ξενιστή. Οι γενετικά τροποποιημένοι φάγοι μείωσαν τον αριθμό των ζωντανών

βακτηρίων. Τελικά προέκυψε ότι οι γενετικά τροποποιημένοι βακτηριοφάγοι είναι σε θέση να εισέλθουν στην εξωκυτταρική μήτρα που σχηματίζει το βιοφίλμ ώστε να εξολοθρεύσουν το παθογόνο βακτήριο (Siringan et al., 2011).

3.1.5.4.3. Δερματικές λοιμώξεις

Τα τραύματα και τα εγκαύματα προκαλούν παραβιάσεις του φυσικού προστατευτικού φραγμού του δέρματος, καθιστώντας το ευαίσθητο σε λοιμώξεις. Οι λοιμώξεις του δέρματος μπορεί να προκληθούν από τα παθογόνα ενδοκυτταρικά βακτήρια *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium szulgai* ή *Treponema pertenue* (Oliveira et al., 2015). Μια σημαντική πρόκληση στη θεραπεία δερματικών λοιμώξεων που προκαλούνται από αυτά τα παθογόνα αποτελεί η ανάπτυξη κατάλληλων στρατηγικών για τη στοχευμένη παροχή θεραπευτικών βακτηριοφάγων σε κύτταρα θηλαστικών (Oliveira et al., 2015 ; Chacko et al., 2012).

Ο M13 είναι ένας γενετικά τροποποιημένος βακτηριοφάγος, ευρέως χρησιμοποιούμενος για την παροχή φαρμάκων. Στα σώματα του M13 λοιπόν ενσωματώθηκε χλωραμφενικόλη, προσαρτώντας το αντιβιοτικό στην επιφάνεια των σωματίων μέσω εστερικών δεσμών, έτσι ώστε οι εστεράσες του ορού να πυροδοτούν την αργή απελευθέρωσή του. Αυτοί οι γενετικά τροποποιημένοι βακτηριοφάγοι συσσωρεύονται κοντά στο παθογόνο και απελευθερώνουν χλωραμφενικόλη σε μεγάλη συγκέντρωση τοπικά που μπορεί να σκοτώσει ακόμη και ανθεκτικά στη χλωραμφενικόλη βακτήρια. Τέτοια στοχευμένη, διαμεσολαβούμενη από φάγο, διανομή υψηλής τοπικής συγκέντρωσης αντιβιοτικών μπορεί να γενικευτεί για τη θεραπεία άλλων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά λοιμώξεων και φαίνεται να είναι κλινικά χρήσιμη επειδή ελαχιστοποιεί την απαιτούμενη δόση και τη σχετική τοξικότητα των μη δραστικών αντιβιοτικών (Wang, 2023).

Η *Pseudomonas aeruginosa* αποτελεί ένα συχνό αιτιολογικό παράγοντα σε μολύνσεις τραυμάτων και η εμφάνιση πολλαπλών στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά έχει δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα στη θεραπεία μολυσμένων πληγών (Krylov et al., 2013). Η πρώτη κλινική δοκιμή στον κόσμο για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με φάγο σε εγκαύματα που έχουν μολυνθεί με *P aeruginosa* πρόκειται να ολοκληρωθεί από την Pherecydes Pharma στη Γαλλία, το Βέλγιο και την Ελβετία. Η ασφάλεια της χρήσης φάγου *Pseudomonas* σε ασθενείς με έλκη στα πόδια αποδείχθηκε επιτυχής από την ομάδα του Sulakvelidze (Rhoads et al., 2009) με έντονο πολλαπλασιασμό των φάγων και επιτυχή βακτηριακή θανάτωση (Mendes et al., 2013 ; Basu et al., 2015).

3.1.5.5. Τελευταίες εξελίξεις

Οι φάγοι υπήρξαν απαραίτητοι παράγοντες στην ανάπτυξη θεραπευτικών σκευασμάτων, και έχουν συμβάλει στην ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας και της συνθετικής βιολογίας (Henry and Debarbieux, 2012). Το γονιδίωμα των ίδιων των βακτηριοφάγων αποτελεί σημαντικό συντελεστή για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φάγων, με βάση πάντα την ποικιλομορφία τους. Όπως αξιολογείται μέσω των πειραματικών δεδομένων, πολλές ακόμη χρήσιμες λειτουργίες κρύβονται μέσα στα γονιδιώματα των φάγων που περιμένουν να ανακαλυφθούν (Boerlin & Reid-Smith, 2008; Donabedian et al., 2003; Wegener, 2003; Aarestrup et al., 2000). Μέχρι στιγμής οι φάγοι έχουν εξελιχθεί για να αναπαράγουν το γονιδίωμα τους γρήγορα μετά τη μόλυνση. Επομένως, υποθέτουμε ότι οι γενετικά τροποποιημένοι φάγοι θα προκαλούν την επιθυμητή λύση των παθογόνων βακτηρίων μετά τη μόλυνση (Henry & Debarbieux, 2012).

Ένας άλλος τομέας μεγάλου ενδιαφέροντος για τους γενετιστές είναι η δημιουργία συνθετικών φάγων για θεραπευτικούς σκοπούς. Η βιολογική φύση των φάγων τους κάνει γρήγορα προγραμματιζόμενους και εξελίξιμους για την παροχή θεραπευτικών σκευασμάτων (Aarestrup, 2015; Boerlin & Reid-Smith, 2008; Donabedian et al., 2003; Wegener, 2003; Aarestrup et al., 2000). Πρόσφατα παρουσιάστηκαν παραδείγματα σχετικά με το πώς αυξήθηκε το θεραπευτικό δυναμικό των φυσικών φάγων και προβλέπεται ότι με την ολοένα αυξανόμενη παγκόσμια απειλή της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, το ενδιαφέρον για κλινικά αποτελεσματικούς φάγους θα συνεχίσει να αυξάνεται ως συμπληρωματική προσέγγιση στη θεραπεία παθογόνων βακτηρίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Αυτό φαίνεται από τον αριθμό-ρεκόρ των μικρών εταιρειών βιοτεχνολογίας που χρησιμοποιούν φάγους με ολοένα και πιο έξυπνους τρόπους για να αντιμετωπίσουν παθήσεις που διαφορετικά είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν με τη χρήση παραδοσιακών θεραπειών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το πεδίο της γενετικής είναι η ικανότητα κατασκευής γενετικά τροποποιημένων φάγων, οι οποίοι αναπαράγονται μόνο υπό ακριβείς συνθήκες, όπως παρουσία συγκεκριμένων χημικών ενώσεων (Shlezinger et al., 2017). Ο ελεγχόμενος πολλαπλασιασμός αυτών των φάγων θα είναι ζωτικής σημασίας για την πρόληψη της εξάπλωσης φάγων στον ξενιστή ώστε να έχουμε μέγιστη αποτελεσματικότητα θανάτωσης σε περιβάλλοντα όπου μπορεί να ωθήσουν τους βακτηριακούς πληθυσμούς προς την αντοχή ή να διαταράξουν τις φυσικές βακτηριακές κοινότητες (Dąbrowska et al., 2014; Pirnay et al., 2012; Cairns et al., 2009; Górski et al., 2020). Βέβαια η καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του ξενιστή ως προς την αναγνώριση άλλων μικροοργανισμών θα είναι επίσης επιτακτική για τον έλεγχο βακτηριακών πληθυσμών που είναι ευαίσθητοι σε

θεραπευτικούς φάγους (Shlezinger et al., 2017). Μεμονωμένα αντιβακτηριακά συστατικά των φάγων, όπως οι λυσίνες, παρουσιάζουν επίσης ένα ισχυρό κύμα ενδιαφέροντος και οι φυσικές ή κατασκευασμένες λυσίνες φάγου προωθούνται σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών από εταιρείες όπως οι ContraFect, GangaGen και Lysando. Αυτός είναι ένας τομέας έρευνας που σίγουρα θα αναπτυχθεί και για τον οποίο η ικανότητα πρόβλεψης, χειρισμού και επαναπρογραμματισμού βιολογικών δραστηριοτήτων θα είναι εξαιρετικά χρήσιμη (Dąbrowska et al., 2014; Pirnay et al., 2012; Cairns et al., 2009; Górski et al., 2020).

Τέλος, με περίπου 10^{13} βακτηριοφάγους στον πλανήτη και την πρόσφατη ανακάλυψη μιας εντελώς νέας οικογένειας φάγων, με προτεινόμενη ονομασία *Asemoviridae*, που πέρασε απαρατήρητη για δεκαετίες, αναμένουμε ότι θα προκύψουν συναρπαστικές αλλά άγνωστες προς το παρόν δυνατότητες των βακτηριοφάγων οι οποίες θα ανοίξουν το δρόμο στους συνθετικούς βιολόγους, επιτρέποντας την ολοένα και πιο ακριβή γενετική τροποποίηση τους με σκοπό την παράδοση του θεραπευτικού σκευάσματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Προκλήσεις μεθόδων γονιδιακής θεραπείας που βασίζονται σε ικούς φορείς

Η τελειοποίηση της γονιδιακής θεραπείας, και ιδιαίτερα η μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου με τη χρήση ικών φορέων, χρήζει ακόμα αντιμετώπισης πολλών ζητημάτων (Lukashev et al., 2016). Παρόλο που η παροχή του θεραπευτικού γονιδίου με τη χρήση ιών πλεονεκτεί έναντι των μη ικών μεθόδων, λόγω του πιο ισχυρού και στοχευμένου θεραπευτικού αποτελέσματος, η ασφάλεια χρήσης ιδιαίτερα των ογκολυτικών και ικανών προς αναπαραγωγή ικών φορέων χρειάζεται αρκετές βελτιώσεις. Οι βελτιώσεις αφορούν ζητήματα ασφάλειας που αφορούν κυρίως την χρωμοσωμική ενσωμάτωση, γιατί η τυχαία ενσωμάτωση στο DNA έχει προκαλέσει σοβαρά ανεπιθύμητα συμβάντα.

Ένα ακόμα ζήτημα, που προκαλεί ανησυχία είναι οι δυσκολίες που αντιμετωπίζουν οι επιστήμονες όσον αφορά την επιτυχημένη μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου στον άνθρωπο, γιατί σε σχέση με τους ανθρώπους, η μεταφορά στα πειραματόζωα είναι συνήθως επιτυχής (Augusta & Goncalves, 2017). Μια σύγχρονη ιδέα για μια πιθανή «γέφυρα» επιτυχίας, ιδιαίτερα στον τομέα της θεραπείας του καρκίνου, ήταν η στόχευση κατοικίδιων ζώων και όχι ποντικών όπως γίνεται συνήθως (Lukashev et al., 2016). Για παράδειγμα, οι κυνόδοντες των σκύλων αναπτύσσουν φυσικούς όγκους παρόμοιους με τους ανθρώπινους το οποίο θα μπορούσε να αποτελέσει ερευνητικό έργο με στόχο την καταπολέμηση παρόμοιων όγκων στον άνθρωπο.

Όπως είναι γνωστό με βάση τα πειραματικά δεδομένα δεν υπάρχει ένας φορέας κατάλληλος για όλες τις εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας. Έτσι γεννιέται ένα από τα πιο συχνά ερωτήματα στη γονιδιακή θεραπεία που αφορά την επιλογή του κατάλληλου ικού φορέα για τη στόχευση κάθε φορά διαφορετικών κυττάρων του ξενιστή (Augusta & Goncalves, 2017). Όπως γίνεται αντιληπτό, η κατανόηση της ποικιλομορφίας των ικών φορέων είναι πολύ σημαντική για την ανάπτυξη μιας σωστής θεραπείας και πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί σε αυτόν τον τομέα. Για παράδειγμα, οι αυτοαναπαραγόμενοι ιοί RNA (οικογένεια ρετροϊών), έχουν αποδειχθεί εξαιρετικοί για τη βραχυπρόθεσμη έκφραση διαγονιδίων υψηλού επιπέδου που απαιτείται στα πλαίσια της θεραπείας του καρκίνου και της ανάπτυξης εμβολίων κατά μολυσματικών ασθενειών και καρκίνων. Σε αντίθεση, κληρονομικά νοσήματα και χρόνιες ασθένειες, όπως η ανοσοανεπάρκεια, οι αιματολογικές ασθένειες και η μυϊκή δυστροφία, που η μακροχρόνια έκφραση των θεραπευτικών γονιδίων είναι αναγκαία, έχουν ευνοήσει την εφαρμογή των φορέων Ad, AAV και LV (Lukashev et al., 2016).

Βέβαια, όπως με κάθε μέθοδο ανάπτυξης φαρμάκων έτσι και στη γονιδιακή θεραπεία η διαχείριση σοβαρών ανεπιθύμητων ενεργειών είναι σημαντική γιατί η παροχή ικών φορέων όπως και κάθε φάρμακο προκαλεί ανεπιθύμητες ενέργειες. Για

το λόγο αυτό, έχουν γίνει προσπάθειες να μειωθεί ο κίνδυνος και η σοβαρότητα των ανεπιθύμητων ενεργειών από τη χρήση των ικών φορέων με την απαλοιφή μη ουσιώδους γενετικού υλικού από ικούς φορείς, τη χρήση εξασθενημένων ή λιγότερο κυτταροπαθογόνων ικών φορέων και την παρακολούθηση της εξάπλωσης των ιών μέσω της καθιέρωσης ελέγχου της ικανότητας αναπαραγωγής και έκφρασής τους (Nakayama, 2010; Zou et al., 2011). Άλλωστε, πολλές μακροχρόνιες μελέτες γονιδιακής θεραπείας δεν έδειξαν σημάδια παρενεργειών, όπως στο παράδειγμα όπου χορηγήθηκε επί 18 έτη θεραπευτική αγωγή με προϊόν γονιδιακής θεραπείας που περιείχε ικό φορέα RV σε ασθενή με SCID. Αυτά τα θετικά ευρήματα έχουν ενθαρρύνει τη μετάβαση σε κλινικές εφαρμογές (Augusta & Goncalves, 2017).

Ωστόσο, υπό την πίεση των ολοένα και αυστηρότερων απαιτήσεων που σχετίζονται με την κλινική αξιολόγηση, είναι σημαντικό ήδη στο πρώιμο στάδιο ανάπτυξης του φορέα, να συμπεριληφθούν τα κατάλληλα βήματα σχεδιασμού και μηχανικής για την πλήρη συμμόρφωση με τις απαιτήσεις για κλινικές μελέτες και τη διευκόλυνση των υλοποιήσεων (Nakayama, 2010; Zou et al., 2011).

4.1.1.Πεδία που αναμένονται μελλοντικές βελτιώσεις

Τα πεδία όπου αναμένονται μελλοντικές βελτιώσεις στη γονιδιακή θεραπεία μπορούν να καταταχθούν σε 4 κύριες κατηγορίες:

Το πρώτο αφορά τη βελτίωση στην ειδική και αποδοτική ως προς τον κυτταρικό τύπο γονιδιακή μεταφορά, μέσω ιών που έχει τροποποιηθεί ο φάκελός τους (Wang et al., 2023). Η βελτίωση της αποδοτικότητας της γονιδιακής μεταφοράς μέσω ιών είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας. Μερικές πιθανές βελτιώσεις αφορούν την επιλογή των ιών, τον σχεδιασμό φακέλου, όπου αυτό μπορεί να περιλαμβάνει τη βελτίωση της στόχευσης των κυττάρων-στόχων και τη μείωση των ανεπιθύμητων παρενεργειών, και ακόμα τη βελτίωση του ιού με την τροποποίηση του γενετικού υλικού του ούτως ώστε να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της γονιδιακής μεταφοράς (Wang et al., 2023).

Δεύτερον και αρκετά σημαντικό είναι η σωστή ρύθμιση της έκφρασης ενός γονιδιακού προϊόντος από στοιχεία που αποκρίνονται σε φαρμακευτικές ουσίες και τα οποία εμπεριέχονται στον θεραπευτικό ικό φορέα (Wang et al., 2023). Πολύ σημαντικό στην περίπτωση αυτή είναι η επικέντρωση του αρχικού σχεδιασμού στην επιλογή ενός κατάλληλου θεραπευτικού ικού φορέα που να είναι συμβατός με τον στόχο παράδοσης και να διασφαλίζει την αποτελεσματική μεταφορά του γονιδιακού προϊόντος (Meyer & Charman, 2022). Ακόμα καταλυτικό παράγοντα αποτελούν

προωθητικά στοιχεία που ανταποκρίνονται σε φαρμακευτικές ουσίες ώστε να επιτρέπεται ο ακριβής έλεγχος της έκφρασης του γονιδιακού προϊόντος (Wang et al., 2023).

Το τρίτο αφορά τη στοχευμένη ένθεση του θεραπευτικού φορέα σε συγκεκριμένο σημείο του γονιδιώματος και την ειδική *in situ* επιδιόρθωση μονογονιδιακών διαταραχών (Wang et al., 2023), που αφορούν συνήθως τις τεχνικές γονιδιακές θεραπείες. Αυτές οι τεχνικές συχνά χρησιμοποιούν το CRISPR-Cas9, που επιτρέπει την ακριβή επεξεργασία του γονιδίου σε συγκεκριμένες θέσεις του γονιδιώματος (Meyer & Charman, 2022). Η επιλογή της συγκεκριμένης θέσης εξαρτάται από τη διαταραχή που πρέπει να διορθωθεί. Η "*in situ*" επιδιόρθωση σημαίνει ότι η διόρθωση γίνεται ακριβώς στη θέση του ελαττωματικού γονιδίου, αντί να αντικαθίσταται ολόκληρο το γονίδιο. Αυτό μπορεί να είναι πολύ χρήσιμο για τη θεραπεία μονογονιδιακών ασθενειών, καθώς μειώνει τον κίνδυνο παρενεργειών (Wang et al., 2023).

Τέλος, πρόκειται για τις αναγκαίες βελτιώσεις που αφορούν τη μακροχρόνια έκφραση από ικούς φορείς χωρίς την πρόκληση καρκινικών διαταραχών λόγω ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού των μολυσμένων κυττάρων από τον ικό φορέα (Wang et al., 2023). Αυτό αποτελεί ένα πολύ σύνθετο πρόβλημα που απαιτεί προηγμένη έρευνα και ανάπτυξη στον τομέα της ιολογίας και της γενετικής (Meyer & Charman, 2022). Ορισμένες πιθανές βελτιώσεις που θα μπορούσαν να εξεταστούν περιλαμβάνουν τη δημιουργία ασφαλέστερων μεθόδων, γεγονός που απαιτεί την ανάπτυξη τεχνικών της γενετικής μηχανικής και την αφαίρεση γονιδίων που σχετίζονται με την καρκινογένεση του ιού, καθώς και ο αυστηρός έλεγχος της επιλεκτικής αναπαραγωγής, δηλαδή την εξερεύνηση της δυνατότητας να επιτρέπεται η αναπαραγωγή των ιών μόνο σε συγκεκριμένες συνθήκες, όπως σε ειδικές κυτταρικές πλατφόρμες (Wang et al., 2023).

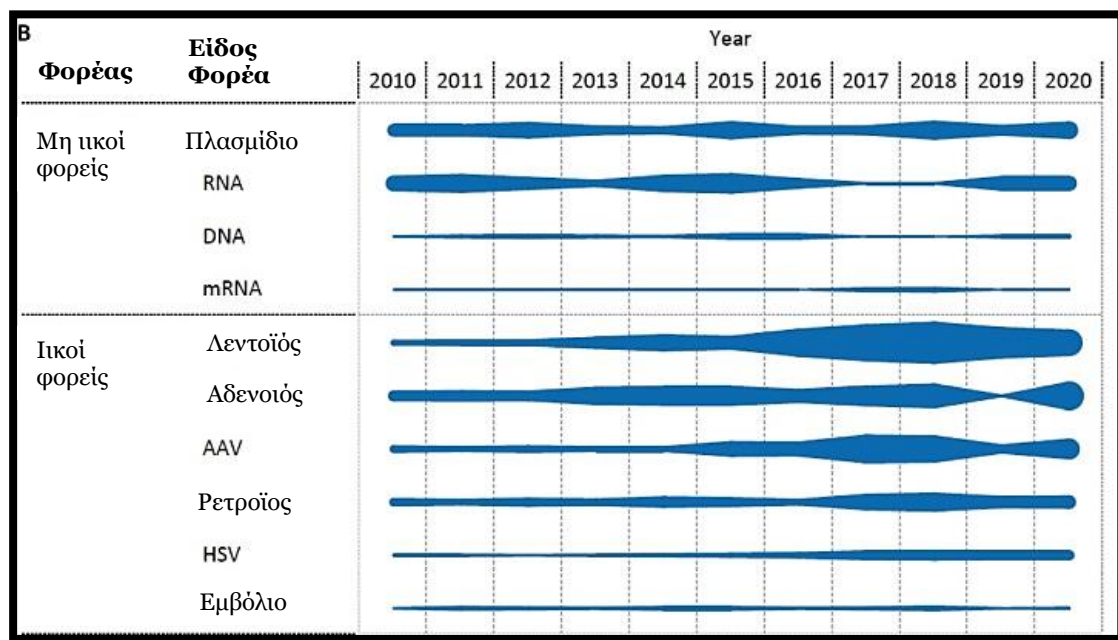
Εφόσον τα περισσότερα από τα παραπάνω ζητήματα επιλυθούν, η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να παρέχει λύσεις σε έναν αριθμό προβλημάτων όπου η παραδοσιακή φαρμακολογία είναι κάθε άλλο παρά επιτυχημένη (Meyer & Charman, 2022).

4.1.1.1. Το μέλλον για τους φορείς AAV

Παρά τις αποτυχίες σε πολλές κλινικές δοκιμές, οι φορείς AAV εξακολουθούν να υπόσχονται ενθαρρυντικά θεραπευτικά αποτελέσματα για τη διόρθωση συγκεκριμένων ασθενειών (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020). Οι

πρόσφατες προκλινικές επιτυχίες που παρατηρούνται με τη χρήση του συστήματος CRISPR/Cas, το οποίο επιτρέπει την προγραμματισμένη επεξεργασία σε σχεδόν οποιοδήποτε μέρος στο γονιδίωμα, είναι ενθαρρυντικές για την ανάπτυξη ασφαλών και λειτουργικών AAVs (Wang et al., 2023). Ωστόσο, κάθε προσέγγιση έχει τα μειονεκτήματά της.

Οι φορείς AAV θεωρούνταν όλα τα χρόνια σχετικά ασφαλείς, ωστόσο έχουν εγείρει ανησυχίες σχετικά με την αποτελεσματικότητά τους και τα μακροπρόθεσμα προφίλ ασφαλείας, λόγω της πρόσφατης απόδειξης ότι τα γονιδιώματα φορέων AAV που φέρουν συστατικά CRISPR μπορούν να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα του κυττάρου-ξενιστή στη θέση των δίκλωνων θραύσεων (Lukashev & Zamyatnin, 2016). Πράγματι, σε μια 10ετή μελέτη παρακολούθησης σε έξι σκύλους που έλαβαν φορέα γονιδιακής θεραπείας για τη Β-θαλασσαιμία, τα γονιδιώματα του φορέα βρέθηκαν να ενσωματώνονται σταθερά στο γονιδίωμα του ξενιστή, γεγονός που έχει εγείρει εκ νέου ανησυχίες για την ογκογόνο ενσωμάτωση του AAV. Παρά το συνολικό αισιόδοξο ιστορικό ασφαλείας για τις θεραπείες AAV σε ανθρώπους τα τελευταία χρόνια, οι συνεχείς προσπάθειες για τη μέτρηση της μακροπρόθεσμης και βραχυπρόθεσμης ασφαλείας για φορείς AAV συνεχίζονται (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020).



Εικόνα 26: Η συνεισφορά των ιικών και μη ιικών φορέων, και οι τύποι τους, σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας 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 [Προσαρμογή από (Wang et al., 2023)].

4.1.1.2. Προκλήσεις στη χρήση των AAV

Ο αυξανόμενος αριθμός κλινικών δοκιμών που χρησιμοποιούν rAAVs στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας είναι ένα θετικό σημάδι και υπόσχεται πολλά. Ωστόσο, υπάρχουν πολλές προκλήσεις που ο τομέας δεν έχει ακόμη αντιμετωπίσει. Η ανοσογονικότητα προς τον φορέα παραμένει η μεγαλύτερη πρόκληση για γονιδιακές θεραπείες που βασίζονται σε AAV (Wang et al., 2023). Στην πραγματικότητα, το ανοσοποιητικό σύστημα θα αποτελεί πάντα το πιο σημαντικό εμπόδιο για οποιαδήποτε εφαρμογή της γονιδιακής θεραπείας. Μέχρι στιγμής, η προσαρμοστική ανοσία στο καψίδιο και στο ξένο διαγονίδιο αποτελεί κύριο παράγοντα της μειωμένης αποτελεσματικότητας (McCarty et al., 2020).

Οι έρευνες σχετικά με τους μηχανισμούς για την έμφυτη ανοσία ως αποτέλεσμα απόκρισης στους ιούς, έχουν περιγραφεί καλά, αλλά η έμφυτη ανοσοαπόκριση προς τους φορείς AAV δεν έχει μελετηθεί επαρκώς (Wang et al., 2023). Έχουν παρατηρηθεί ειδικές αποκρίσεις που αφορούν τους διαφορετικούς ορότυπους των AAV και μπορούν να αντιμετωπιστούν άμεσα. Συγκεκριμένα, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στη δέσμευση των υποδοχέων μεταξύ των AAV2 και AAV8, όπου για παράδειγμα η προτίμηση του AAV2 για πρωτεογλυκάνες ηπαρίνης μπορεί να προσδώσει υψηλότερη απόκριση T-λεμφοκυττάρων (Wang et al., 2023). Επιπλέον, συσσωρεύονται στοιχεία για την πιθανότητα ότι το γονιδίωμα του φορέα AAV μπορεί να προκαλέσει μια έμφυτη ανοσολογική απόκριση, γεγονός που απαιτεί εκτεταμένη έρευνα (McCarty et al., 2020).

Τέλος, μια πρόκληση που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι η διαχείριση των σωστών δόσεων θεραπείας, η οποία μπορεί να βρίσκεται στο επίκεντρο των ισχυρών ανοσολογικών αποκρίσεων και των επακόλουθων τοξικοτήτων που παρατηρούνται σε πρόσφατες δοκιμές (McCarty et al., 2020). Αν και η γονιδιακή θεραπεία για SMA που βασίζεται σε AAV έχει αποδειχθεί ασφαλής, οι διαφορές μεταξύ ασθενών μπορεί να επηρεάσουν την ανταπόκριση. Σε μια προκλινική μελέτη σε χοιρίδια και πρωτεύοντα πλην του ανθρώπου, όπου επιτεύχθηκε υπερφυσιολογική έκφραση διαγονιδίων, παρατηρήθηκε τοξικότητα που οφειλόταν σε υψηλή μεταγωγή των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας (Wang et al., 2023). Πράγματι, πρόσφατα δεδομένα 33 κλινικών μελετών που εξέταζαν 256 ποντίκια, έδειξε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ζώων στα οποία χορηγήθηκε το θεραπευτικό προϊόν μέσω εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) εμφάνισαν αρκετές παθολογίες. Αυτές και περαιτέρω μελέτες υποδεικνύουν ότι απαιτείται καλύτερη και πιο αξιόπιστη αξιολόγηση των κατάλληλων οδών χορήγησης,

επιλογής καψιδίου και σχεδιασμού γονιδιώματος φορέα, ακόμη και για εγκεκριμένα φάρμακα (McCarty et al., 2020).

4.1.2.1. Το μέλλον για τους λεντοϊκούς φορείς

Όπως έχει αναφερθεί λόγω της ικανότητας των λεντοϊών να εισάγουν το γενετικό τους υλικό σε μη διαιρούμενα κύτταρα, όπως τα δενδριτικά, οι γενετικά τροποποιημένοι λεντοϊοί μπορούν να προκαλέσουν ανοσία λόγω της απόκρισης T και B κυττάρων έναντι μολυσματικών ασθενειών και καλά διαφοροποιημένων όγκων (Herzog & Porplewell, 2020). Όμως, σύμφωνα με τις τελευταίες έρευνες για τη δημιουργία ενός συστήματος ανασυνδυασμένων λεντοϊών που δεν ενσωματώνονται στο DNA του κυττάρου-ξενιστή έχουν μειωθεί σημαντικά οι παρενέργειες σχετικά με τη μεταλλαξιγένεση εισαγωγής έχοντας έτσι επιτυχή παρατεταμένη διαγονιδιακή έκφραση του θεραπευτικού γονιδίου χωρίς την εισαγωγή του γενετικού υλικού του ίδιου του ιού (Herzog & Porplewell, 2020). Η εφαρμογή του συστήματος των λεντοϊικών φορέων που δεν ενσωματώνουν το γενετικό τους υλικό στα κύτταρα-στόχους για την παράκαμψη των ανοσολογικών αποκρίσεων που δημιουργούνται ενάντια στην παρατεταμένη έκφραση εργαλείων επεξεργασίας γονιδιώματος, όπως το CRISPR/Cas, διευκολύνει τη χρήση τέτοιων συστημάτων στη θεραπευτική επεξεργασία γονιδίων (Nóbrega et al., 2020).

Ένα μοντέρνο σύστημα λεντοϊικών φορέων ελαττωματικών ως προς τη δράση της ιντεγκράσης έχει σχεδιαστεί ως πρότυπο σύστημα εμβολίων κατά των αντιγόνων της γρίπης και της ελονοσίας. Τέτοιοι λεντοϊικοί φορείς αναπτύσσονται και βελτιστοποιούνται συνεχώς και θα μπορούσαν να έχουν ευρύτερη εφαρμογή σε μελλοντικές γονιδιακές θεραπείες. Επιπλέον, η ανάπτυξη ασφαλέστερων φορέων μέσω φωτο-εναλλαγής μη κανονικών αμινοξέων για τη ρύθμιση της διαγονιδιακής έκφρασης με χωρικό και χρονικό τρόπο, αντιπροσωπεύει επίσης την επόμενη γενιά φορέων λεντοϊικών (Nóbrega et al., 2020). Ο φορέας Lentivirus έχει γίνει ένα από τα προτιμώμενα εργαλεία για την ex vivo παράδοση διαγονιδίων στα πλαίσια γονιδιακής θεραπείας, εξαιτίας των πολλών ελκυστικών χαρακτηριστικών του. Τα συστήματα φορέων λεντοϊικών έχουν εξελιχθεί πολύ και βελτώνονται ολοένα και περισσότερο. Αυτή η προσπάθεια αναμένεται να οδηγήσει σε ευρύτερη υιοθέτηση λεντοϊικών φορέων για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών (Herzog & Porplewell, 2020).

4.1.2.2. Μειονεκτήματα χρήσης των λεντοϊκών φορέων

Η χρήση νέων συστημάτων για την παράδοση γονιδίων είναι αναμενόμενο να εμφανίζει ορισμένα μειονεκτήματα (Herzog & Popplewell, 2020). Η χρήση λεντοϊκών φορέων τρίτης γενιάς (αυτο-απενεργοποιούμενων φορέων) έχει βοηθήσει στον μετριασμό του κινδύνου μεταλλαξιγένεσης ένθεσης. Ωστόσο, έχει διατυπωθεί ότι ακόμη και αυτο-απενεργοποιούμενοι λεντοϊκοί φορείς με ισχυρά στοιχεία υποκινητή και ενισχυτή μπορούν ακόμα να ενεργοποιήσουν γειτονικά γονίδια (Milone & O'Doherty et al., 2018). Η ενσωμάτωση αλληλουχιών μονωτή για την εξουδετέρωση της επίδρασης της δράσης των ενισχυτών που δρουν in trans μπορεί να μειώσει αυτά τα αποτελέσματα. Όμως, αυτή η ενσωμάτωση μπορεί στο μέλλον να σχηματίσει συντήξεις χιμαιρικών γονιδίων τα οποία αποτελούνται από αλληλουχίες προϊόν και ξενιστή. Τέλος, οι λεντοϊκοί φορείς έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν μη φυσιολογική συρραφή κατά την μεταγραφή στα κύτταρα (Herzog & Popplewell, 2020).

4.1.3. Περαιτέρω χρήση ιικών φορέων στη γονιδιακή θεραπεία

4.1.3.1. Αδενοϊοί

Λόγω του προφίλ ασφαλείας και της έκφρασής τους, οι αδενοϊοί αποτελούν αποτελεσματικά οχήματα μεταφοράς γονιδίων (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020). Παρέχοντας θεραπευτικά αποτελέσματα στην γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου, αυτοί οι φορείς έχουν ανοίξει νέους δρόμους στην παράδοση γονιδίων, την ανάπτυξη εμβολίων και την ανάδειξη της μοριακής ογκολογίας στοχεύοντας τα ογκολυτικά γονίδια σε μοριακό επίπεδο (Lee et al., 2017; Yip et al., 2020). Οι ογκολυτικοί αδενοϊκοί φορείς είναι οι καλύτεροι δυνατοί υποψήφιοι για την ενίσχυση και την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Είναι επίσης σημαντικοί στην ανάπτυξη εμβολίων για αναδυόμενες μολυσματικές ιογενείς ασθένειες. Επομένως, αδενοϊκοί φορείς βελτιώνονται συνεχώς για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί τους, που αφορούν την τοξικότητα, προϋπάρχουσες προκλήσεις ανοσίας και εμπόδια κατασκευής.

Καθώς η έρευνα για τους αδενοϊούς έχει εξελιχτεί, η κατανόησή μας για ορισμένες πτυχές έχει αυξηθεί σημαντικά (Lee et al., 2017; Yip et al., 2020). Αυτοί οι φορείς μπορούν να βελτιωθούν σε συνδυασμό με την τεχνολογία CRISPR για γονιδιακή θεραπεία, εξαλείφοντας μολυσματικά γονίδια και δημιουργώντας χώρο για την εισαγωγή του επιθυμητού γονιδίου (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020). Διπλασιάζοντας την ικανότητα συσκευασίας, μπορούν να βελτιωθούν οι αναποτελεσματικές μέθοδοι παραγωγής. Για να αποφευχθεί μια επιθετική

ανοσολογική απόκριση, η δέσμευση των αδενοϊκών φορέων σε ηπατικά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα ή λεμφοκύτταρα κατά την ενδοφλέβια ένεση μπορεί να αποφευχθεί τροποποιώντας τον τροπισμό τους και κατευθύνοντας τον ιό σε νέους υποδοχείς. Η έρευνα βρίσκεται σε εξέλιξη σχετικά με όλες αυτές τις προσεγγίσεις και υπόσχεται ένα λαμπρό μέλλον για τους φορείς Ad (Lee et al., 2017; Yip et al., 2020).

4.1.3.2. Βακουλοϊοί

Οι βακουλοϊοί έχουν επίσης αναπτυχθεί ως ασφαλείς και αποτελεσματικοί φορείς για την παροχή γονιδίων στα κύτταρα ξενιστές, με βάση τον ευρύ τροπισμό εισόδου και την ελαττωματική αντιγραφή τους σε κύτταρα θηλαστικών (McCarty, 2020). Ακόμη έχουν αρχίσει να ερευνώνται περαιτέρω για τη μεταφορά γονιδίων σε διάφορα είδη κυττάρων. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αναβαθμισμένες θεραπείες για ασθένειες που προσβάλλουν συγκεκριμένους ιστούς, όπως η θεραπεία της νόσου του Parkinson (McCarty, 2020). Συμπερασματικά, με τα προφανή πλεονεκτήματα των βακουλοϊών για γονιδιακή θεραπεία, την ύπαρξη εγκεκριμένων από τον FDA εμβολίων παραγωγής βακουλοϊών όπως το Flublok, τις πρόσφατες σταθερές εξελίξεις στις τεχνολογίες παραγωγής και επεξεργασίας φορέων βακουλοϊών και τις ολοκληρωμένες προσπάθειες για τη θέσπιση μεθόδων ποιοτικού ελέγχου και προτύπων για προϊόντα BV, η υλοποίηση της γονιδιακής θεραπείας με βάση τους βακουλοϊούς στην κλινική πράξη μέσα στα επόμενα 5 έως 10 χρόνια είναι μια εύλογη προσδοκία (McCarty, 2020).

4.1.3.3. Βακτηριοφάγοι

Με την παγκόσμια αύξηση των ερευνητικών δεδομένων που σχετίζονται με τα σωματίδια βακτηριοφάγων, ο αριθμός των πιθανών βιοτεχνολογικών εφαρμογών αυτών των μεταβολικά αδρανών οντοτήτων αυξάνεται καθημερινά. Στην πραγματικότητα, οι επιστήμονες εκμεταλλεύονται τους φυσικούς θηρευτές των βακτηρίων για να καταπολεμήσει παθογόνους μικροοργανισμούς και να αυξήσει την ποιότητα ζωής του ανθρώπου. Μελέτες που επικεντρώνονται στους βακτηριοφάγους παρέχουν πληροφορίες για την εξέλιξη του γονιδιώματος, την προσαρμογή βακτηρίων σε νέες συνθήκες, την έκφραση και αντιγραφή του DNA, και δυνητικά παρέχουν νέα προϊόντα βιοτεχνολογίας (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020).

Σε σύγκριση με τη γονιδιωματική των βακτηρίων, η γονιδιωματική των βακτηριοφάγων έχει προχωρήσει αργά και εξακολουθεί να εξελίσσεται. Τα γονιδιώματα φάγων κωδικοποιούν προϊόντα που είναι χρήσιμα για εφαρμογές

βιοτεχνολογίας, όπως είναι οι ακόλουθες: βιοσυντήρηση και ασφάλεια τροφίμων, διαγνωστικά και θεραπευτικά προϊόντα, μέθοδοι μεταφοράς γονιδίων σε φυτά και ζώα, αντιμικροβιακή θεραπεία, φορείς εμβολίων, θεραπείες στελεχών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά, οχήματα μεταφοράς DNA, κατασκευή στελεχών, βιοέλεγκοι παθογόνων φυτών, έλεγχος βιοφίλμ, νανοτεχνολογία και έλεγχος διάβρωσης, για να αναφέρουμε μόνο μερικά. Σήμερα, με τη χρήση τεχνικών γενετικής μηχανικής και της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA, είναι δυνατό να παραχτούν ανασυνδυασμένα σωματίδια βακτηριοφάγων, λυσίνες και άλλες αντιβακτηριακές πρωτεΐνες φάγου, προκειμένου να αυξηθεί η παθογόνος δράση τους και να μολύνουν βιομεμβράνες με ευρύτερο φάσμα δράσης αυξάνοντας τόσο την ισχύ όσο και την αποτελεσματικότητά τους (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020).

Μεταξύ των τεχνολογιών γενετικής που βασίζονται σε φάγους, βρίσκουμε δύο που φαίνεται να είναι η αιχμή στο πεδίο. Πρώτον, η τεχνολογία απεικόνισης φάγων, η οποία παρέχει συνεχώς νέες θεραπείες και θεραπευτικές στρατηγικές για την ιατρική. Δεύτερον, ένζυμα που προέρχονται από φάγους. Αυτά τα ένζυμα δεν είναι μόνο απλές πρωτεΐνες ικανές να σκοτώσουν βακτήρια, αλλά και πηγή περιοχών δέσμευσης με υποδοχείς βακτηρίων, προϊόντων αποικοδόμησης βιοφίλμ και άλλων ενεργών στοιχείων που στο μέλλον μπορούν να παίξουν ρόλο χρήσιμων βιομεμβρανών για περαιτέρω τροποποίηση (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020).

Ωστόσο, η αναμενόμενη εμφάνιση προβλημάτων, σχετικά με την αναζήτηση και την εισαγωγή νέων αντιβιοτικών χημικών μορίων, επανέφερε τη μνήμη της θεραπείας με φάγους. Έτσι, είναι εξαιρετικά σημαντικό να διαμορφωθεί ένας κώδικας χρήσης των βακτηριοφάγων στην ιατρική θεραπεία με τη χρήση φάγων, περιορίζοντας έμμεσα ή άμεσα ορισμένες μη ιατρικές εφαρμογές βακτηριοφάγων. Η αντιμετώπιση της βακτηριακής αντοχής μέσω της γονιδιακής θεραπείας ανοίγει νέους ορίζοντες στον τομέα της ιατρικής, δίνοντας ελπίδα σε ασθενείς που το πάλοι ποτέ θα είχαν περιορισμένες επιλογές θεραπείας (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020). Είναι σημαντικό να προχωρούμε σε αυτόν τον τομέα με σύνεση και διαφάνεια, διασφαλίζοντας ότι οι εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας στην αντιμετώπιση της βακτηριακής αντοχής είναι ασφαλείς και αποτελεσματικές (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020).

4.1.3. Το μέλλον της θεραπείας με φάγους

Παρά τις προκλήσεις που αντιμετωπίζουν οι επιστήμονες, οι προοπτικές για τη χρήση φάγων για θεραπεία είναι ελπιδοφόρες. Όπως έγινε γνωστό ο FDA πρόκειται να εγκρίνει νέες θεραπείες με φάγους (Brockmeier, 2020). Το Εθνικό Ινστιτούτο

Υγείας των ΗΠΑ έχει ενισχύσει οικονομικά πολλές εταιρίες για να μελετήσουν τη θεραπεία με χρήση φάγων (Brockmeier, 2020). Τέτοιες μελέτες αφορούν κλινικές δοκιμές αξιολόγησης της μικροβιολογικής δυνατότητας μιας εφάπαξ δόσης θεραπείας με φάγο σε ασθενείς με χρόνια κυστική ίνωση λόγω του παθογόνου *Pseudomonas aeruginosa*. Επιπλέον στο στάδιο κλινικών δοκιμών 2 βρίσκεται η εταιρία Locus, η οποία αξιολογεί την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της φαρμακοκινητικής ενός φαρμακευτικού προϊόντος φάγου για τη θεραπεία της ουρολοίμωξης που προκαλείται από το *E. coli* (Bakondi et al., 2016, Long et al., 2014, Nelson et al., 2016).

Όσο αφορά τη γενετική επεξεργασία του γονιδιώματος των φάγων για την εισαγωγή του θεραπευτικού γονιδίου, η εταιρία Locus έχει αναπτύξει θεραπεία με φάγους που χρησιμοποιούν την τεχνολογία CRISPR-Cas3. Οι φάγοι παραδίδουν το CRISPR-Cas3 στον βακτηριακό ξενιστή τους, ο οποίος τεμαχίζει ανεπανόρθωτα το βακτηριακό DNA, και συνεπώς, σε σύγκριση με τους κανονικούς φάγους, επιτρέπει πιο ισχυρή θανάτωση (Bakondi et al., 2016, Long et al., 2014, Nelson et al., 2016). Η εταιρία Locus τόνισε ότι η ικανότητα τροποποίησης φάγων, συμπεριλαμβανομένων πολλών άλλων ωφέλιμων γονιδίων για τον ξενιστή, εκτός της Cas, ενισχύει τις δυνατότητές τους ως βασικού εργαλείου για την καταπολέμηση πολλών βακτηριακών παθογόνων (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020).

Το μέλλον της φαγοθεραπείας βρίσκεται στα χέρια της επόμενης γενιάς επιστημόνων. Υπάρχει μια αυξανόμενη κοινότητα νέων ερευνητών που είναι ενθουσιασμένοι με την προοπτική της θεραπείας με φάγους (Bakondi et al., 2016, Long et al., 2014, Nelson et al., 2016). Είναι αυτός ο ζήλος, σε συνδυασμό με τη συνεργασία, την αυξημένη χρηματοδότηση και την πρόοδο στις κλινικές δοκιμές, που θα είναι το κλειδί για την ολοκληρωμένη θεραπεία με φάγους (Deyle & Russell et al., 2009; Yip et al., 2020).

4.2. Ηθικοί προβληματισμοί

Συζητήσεις που αφορούσαν την ηθική πλευρά της επεξεργασίας του ανθρώπινου γονιδιώματος υπήρχαν ήδη από τα πρώτα κιόλας πειράματα γονιδιακής θεραπείας το 1950 (Kerr et al., 2018; Tian et al., 2021). Η ταχεία και αναπτυσσόμενη κατανόηση της λειτουργίας των γονιδίων έφερε στο προσκήνιο την ιδέα της άμεσης χειραγώγησής τους με σκοπό τη θεραπεία ασθενειών. Στις αρχές της δεκαετίας του 1970, οι επιστήμονες άρχισαν να φαντάζονται την τροποποίηση των γονιδίων στα άτομα, κάτι που κανένας ηθικιστής επικεντρωμένος στα κοινωνικά σχήματα δεν θα μπορούσε να φανταστεί, ή ακόμη και να ήθελε (Kerr et al., 2018 ; Tian et al., 2021).

Ξεκινώντας με την εφεύρεση της «γονιδιακής θεραπείας» σε σωματικά κύτταρα

του ανθρώπου, επιστήμονες όλων των ειδικοτήτων χρησιμοποίησαν τη διάκριση μεταξύ σωματικής και γαμετικής σειράς ως ηθικό όριο (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020). Γονιδιακή θεραπεία στη σωματική σειρά σημαίνει τροποποίηση γονιδίων σε ορισμένα από τα κύτταρα ενός υπάρχοντος ατόμου με τρόπο που δεν επηρεάζει τα αναπαραγωγικά του κύτταρα ενώ στη γαμετική σειρά σημαίνει αλλαγή των γονιδίων στους απογόνους κάποιου (Kerr et al., 2018 ; Tian et al., 2021). Συνεπώς, το αποτέλεσμα της τροποποίησης των κυττάρων της γαμετικής σειράς είναι ότι τα τροποποιημένα γονίδια μεταβιβάζονται στους απογόνους του ανθρώπου, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται με την τροποποίηση των σωματικών κυττάρων (Mintz et al., 2019).

Όπως γίνεται αντιληπτό, για περισσότερα από 60 χρόνια, το θέμα της βιοηθικής σχετικά με τις τροποποιήσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος απασχολεί την κοινωνία (Mintz et al., 2019). Μέσα στα χρόνια έχουν δημιουργηθεί διάφορα εμπόδια σχετικά με τη θεραπεία μιας νόσου που αφορούν κυρίως την ασφάλεια στη χρήση των ιών ως φορέων παράδοσης του θεραπευτικού γονιδίου (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020).

Οι λόγοι οι οποίοι εγείρουν ανησυχία ως προς την εφαρμοσιμότητα της γονιδιακής θεραπείας στα γαμετικά κύτταρα αφορούν τόσο ζητήματα ασφάλειας όσο και ηθικά (Mintz et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα, δεν υπάρχουν ακόμη οι απαραίτητες εγγυήσεις σχετικά με την ασφάλεια της μεθόδου, και έτσι αυτή συνοδεύεται από απρόβλεπτες για το γονιδίωμα συνέπειες, οι οποίες δεν ξέρουμε πόσο επιζήμιες μπορεί να είναι για τον προς τροποποίηση οργανισμό (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020). Επιπλέον, αν και επαναστατική, πρόκειται για μια άκρως επεμβατική μέθοδο. Γεννώνται εύλογα ερωτήματα για το πόσο ηθικά αποδεκτή είναι η επέμβαση στο ανθρώπινο γονιδίωμα, το οποίο και αποτελεί τη βιολογική ταυτότητα των ατόμων και προσδίδει τη γενετική ποικιλομορφία στο ανθρώπινο είδος (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020).

Με βάση όσα ειπώθηκαν, είναι ζωτικής σημασίας να ξεπεραστούν τα ηθικά διλήμματα ζυγίζοντας τα θετικά και αρνητικά της ανερχόμενης γονιδιακής θεραπείας και αναζητώντας τρόπους προσαρμογής της ώστε να εξασφαλιστεί ότι η δράση της δεν θα είναι επιζήμια για το ανθρώπινο είδος (Mintz et al., 2019). Επιπρόσθετα, είναι απαραίτητο να γίνουν επικοινωνιακές συζητήσεις μεταξύ επιστημόνων ανά τον κόσμο, ώστε να τεθούν κοινές βάσεις για τον τρόπο χειρισμού των μεθόδων και να οριστεί ενιαία νομοθεσία για την εφαρμογή τους (Imperial & Kochanek et al., 2004; Yip et al., 2020).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα δεδομένα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, διαπιστώνουμε ότι έχουν περάσει περίπου τρεις δεκαετίες από τότε που προτάθηκε η γονιδιακή θεραπεία ως μέθοδος θεραπείας ασθενειών οι οποίες μέχρι τότε θεωρούνταν δύσκολες στο να θεραπευτούν ή ακόμα και ανίατες. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η τάση της εξέλιξης της γονιδιακής θεραπείας με τη χρήση των ικών φορέων ως φορέων παράδοσης του θεραπευτικού γονιδίου τα τελευταία χρόνια. Η μοναδική ικανότητά τους να εισβάλλουν στα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού και να ενσωματώνουν γονίδια τους καθιστά ιδανικούς φορείς για τη μεταφορά γονιδίων. Αυτό έχει οδηγήσει σε επαναστατικές εφαρμογές στη θεραπεία γενετικών ασθενειών. Σύμφωνα με τις παραπάνω αναφορές, είναι εμφανές, ότι έχουμε εισέλθει σε μια νέα εποχή, όπως αποδεικνύεται από τον αυξανόμενο αριθμό προϊόντων γονιδιακής θεραπείας, που έχουν εγκριθεί την τελευταία δεκαετία. Η παρούσα ανασκόπηση κάλυψε τις κύριες πτυχές των στρατηγικών, κυρίως σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας που χρησιμοποιήθηκαν τα τελευταία δέκα χρόνια.

Καίριο σημείο αποτελούν οι τεχνικές γονιδιακής θεραπείας που έχουν αναδειχτεί με την πάροδο του χρόνου. Οι γενετικές εξελίξεις και οι ανακαλύψεις στη βιοτεχνολογία, όπως η επεξεργασία γονιδίων CRISPR-Cas, έχουν προωθήσει τη γονιδιακή θεραπεία με έναν νέο ρόλο στη καταπολέμηση ενός ευρύτερου φάσματος ασθενειών. Η γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιεί μια ποικιλία στρατηγικών για τη θεραπεία της νόσου με βάση την υποκείμενη παθολογία, όπως η απαλοιφή ενός ελαττωματικού αλληλόμορφου ή η προσθήκη ενός σωστού αντιγράφου/τροποποιημένου αντιγράφου, ενός αλληλόμορφου κυρίως με τη χρήση των ικών φορέων. Ο εμβολιασμός έχει επιτευχθεί μέσω της εισαγωγής νέων γονιδίων που κωδικοποιούν βασικές δομικές υπομονάδες μολυσματικών σωματίων, γεγονός που τονίζει την σημαντικότητα και τη χρησιμότητα των ιών ως φορείς. Αν και οι κλινικές εφαρμογές της γονιδιακής θεραπείας αφορούν κυρίως τον καρκίνο και γενετικές διαταραχές, έχει επίσης εφαρμοστεί σε κλινικές δοκιμές προχωρημένης φάσης για μολυσματικές ασθένειες όπως το AIDS, η ελονοσία και ο HPV, καθώς και σε επίκτητες ασθένειες όπως η περιφερική αγγειακή νόσος, η οστεοαρθρίτιδα, οι αμφιβληστροειδοπάθειες, η καρδιακή ανεπάρκεια, η αλλεργική ρινίτιδα, η νόσος Alzheimer, κ.λπ. Ακόμα προηγούμενες επιτυχημένες προσπάθειες στη χρήση ιών στη γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνουν τη θεραπεία της κυστικής ίνωσης και της θαλασσαιμίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι ιοί χρησιμοποιήθηκαν για να εισάγουν υγιή αντίγραφα των ελαττωματικών γονιδίων στα κύτταρα του ασθενούς, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής τους.

Μια δεκαετής ανάλυση τάσεων δεδομένων σχετικά με στρατηγικές που χρησιμοποιούνται σε κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας αποκάλυψε ότι η χρήση

ικών φορέων, ιδιαίτερα των λεντοϊών, των αδενοϊών και των AAV, έχει γίνει πιο ελκυστική για κλινικές μελέτες με την πάροδο του χρόνου. Ακόμα ιδιαίτερα σημαντικοί στη χρήση τους στη γονιδιακή θεραπεία είναι οι βακουλοϊοί, ως συστήματα παράδοσης του θεραπευτικού γονιδίου και οι βακτηριοφάγοι ως εναλλακτική λύση για την καταπολέμηση της βακτηριακής αντοχής. Ειδικότερα, η ευρεία χρήση λεντοϊκών φορέων οφείλεται στη χρήση τους στην *ex-vivo* γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου χρησιμοποιώντας CAR-T κύτταρα ή TCR τροποποιημένα κύτταρα, ενώ οι AAV χρησιμοποιούνται κυρίως ως *in vivo* φορείς για τη θεραπεία γενετικών ασθενειών. Όπως προκύπτει, οι *ex-vivo* γονιδιακές θεραπείες ήταν πιο συχνές από ό,τι *in vivo* γονιδιακές θεραπείες την τελευταία δεκαετία. Ενώ η *ex-vivo* γονιδιακή θεραπεία είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στρατηγική για τον καρκίνο, η *in vivo* γονιδιακή θεραπεία χρησιμοποιείται πιο συχνά για γενετικές ασθένειες και αντι-ιικές θεραπείες.

Η εξέταση των τάσεων των στρατηγικών που χρησιμοποιούνται σε επιτυχημένες κλινικές δοκιμές παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για μελλοντικές έρευνες, βελτιωμένα σχέδια μελετών και πρακτική χάραξη πολιτικής από φαρμακευτικές εταιρείες και ερευνητικά ινστιτούτα γονιδιακής θεραπείας. Συνολικά, οι ιοί αποτελούν πολύτιμα εργαλεία στον τομέα της γονιδιακής θεραπείας και ενδέχεται να προσφέρουν νέα ελπίδα σε πολλούς ασθενείς που πάσχουν από γενετικές ασθένειες.

Παρά την υποσχόμενη φύση αυτής της τεχνολογίας, υπάρχουν προκλήσεις. Η ηθική διάσταση περιλαμβάνει τη σωστή χρήση των ιών και τη διασφάλιση της ασφάλειας των ασθενών. Επίσης, το κόστος και η προσβασιμότητα τέτοιων θεραπειών πρέπει να εξεταστούν προσεκτικά. Η έρευνα συνεχίζεται ενεργά σε αυτόν τον τομέα, με πολλές ελπιδοφόρες προοπτικές. Η γονιδιακή θεραπεία με ιούς έχει το δυναμικό να ανατρέψει την ιατρική και να προσφέρει νέες λύσεις για ασθένειες που παλιότερα θεωρούνταν ανίατες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεταφορά του θεραπευτικού γονιδίου στα πλαίσια της γονιδιακής θεραπείας, έχει στηριχτεί κατά βάση στους αδено-σχετιζόμενους ιούς, στους ρετροϊούς και στους αδενοϊούς. Ωστόσο σημαντική θέση κατέχουν επίσης οι βακτηριοφάγοι για την καταπολέμηση βακτηρίων ανθεκτικών σε αντιβιοτικά και οι βακουλοϊοί για την παράδοση θεραπευτικών γονιδίων.

Εδώ δίνεται έμφαση στις βασικές αρχές ανάπτυξης ενός φορέα και στα επόμενα τεχνολογικά βήματα για την επίτευξη αυτού. Αυτά βασίζονται κυρίως στην βέλτιστη επιλογή υποκινητή με σκοπό την έκφραση του διαγονιδίου και στην εφαρμογή μονωτών χρωματίνης για απομόνωση του φορέα από τη χρωματίνη στη συγκεκριμένη θέση ενσωμάτωσης. Βελτιώσεις στα βήματα επεξεργασίας, για την παραγωγή του τελικού θεραπευτικού φορέα είναι απαραίτητες και αφορούν τις αλληλουχίες που χρειάζονται *in cis* και την αναγνώριση των λειτουργιών που μπορούν να υποκατασταθούν *in trans*.

Το κυριότερο ζήτημα που πραγματεύεται η παρούσα μελέτη είναι η πληθώρα δυνατοτήτων που προσφέρουν οι ιοί στην παράδοση του θεραπευτικού γονιδίου για την αντιμετώπιση ενός πλήθους ασθενειών με υψηλό ποσοστό ακρίβειας και ασφάλειας. Αναφέρονται αρκετά παραδείγματα που αποδεικνύουν τη θεραπευτική δράση των ιικών φορέων στην πράξη, με κυριότερα τις νευρομυϊκές διαταραχές, διάφορους τύπους καρκίνου, καθώς και τις αιματολογικές και νευρολογικές διαταραχές. Παρουσιάζονται τα δεδομένα που είναι διαθέσιμα μέχρι στιγμής, οι προκλήσεις που τα συνοδεύουν και αναλύονται τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών. Εξετάζονται μελλοντικές εξελίξεις στον τομέα, συμπεριλαμβανομένων των τεχνολογιών επεξεργασίας CRISPR και οι ελπίδες για την περαιτέρω ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών θεραπειών για γενετικές ασθένειες.

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατασκευή ιικών φορέων, όμως όπως επιβεβαιώνουν και οι κλινικές δοκιμές, εντοπίζονται πολλά προβλήματα που αφορούν κυρίως στην ένθεση του θεραπευτικού γονιδίου. Για αυτό τον λόγο οι επιστήμονες έχουν στραφεί σε φορείς παροχής γονιδίων που δεν βασίζονται στην ενσωμάτωση του γονιδιώματος και τους προσφέρουν την ικανότητα της γενετικής επιδιόρθωσης, όπως οι αδено-σχετιζόμενοι ιικοί φορείς.

ABSTRACT

The transfer of therapeutic genes in the context of gene therapy has primarily relied on adeno-associated viruses, retroviruses and adenoviruses. However, bacteriophages also play a significant role in combating antibiotic-resistant bacteria, and baculoviruses are essential for the delivery of therapeutic genes.

This study emphasizes the fundamental principles of developing a vector and the subsequent technological steps required to achieve this. These primarily involve the optimal choice of promoter in order to obtain transgene expression and the application of chromatin insulators to isolate the vector from chromatin at the specific integration site. Improvements in the processing steps for the generation of the final therapeutic vector are necessary and involve the sequences needed *in cis* and the recognition of functions that can be substituted *in trans*.

The main focus of this study is the plethora of possibilities offered by viruses in delivering the therapeutic gene to address a variety of diseases with high precision and safety rates. Several examples are provided that demonstrate the therapeutic action of viral vectors in practice, including neuromuscular disorders, various types of cancer, as well as hematological and neurological disorders. Data available to date are presented, along with the challenges they entail, and the results of clinical trials are analyzed. Future developments in the field, including CRISPR processing technologies, are examined, along with hopes for further advancements in the development of safe and effective treatments for genetic diseases.

In recent years, significant progress has been made in constructing viral vectors, however, as clinical trials confirm, numerous issues mainly pertain to the insertion of the therapeutic gene. For this reason, scientists have turned to gene delivery vectors that do not rely on genome integration and offer them the capability to perform genetic repair, such as adeno-associated viral vectors.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Asbroek AL, van Kempen LC. The tumor microenvironment: involvement of immune cells in tumor development and therapeutic strategies. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):946.
<https://doi.org/10.1038/s41573-022-00520-5>
2. Augusta G. & M. Goncalves, (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives, Einstein, Sao Paolo.
<https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024>
3. Algarroba GN, Fierro NA, Avila DG. Addressing the major clinical barriers to gene delivery: current insights on viral vectors. *Curr Pharmacol Rep*. 2020;6(6):503518
<https://link.springer.com/article/10.1134/S0006297916070063#citeas>
4. Athanasopoulos T., PhD Mustafa M. Munye, PhD Rafael J. Yáñez-Muñoz, PhD, (2017). Nonitergrating Gene Therapy Factors, P753-770
<https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.06.007>
5. Barman, A., Deb, B., & Chakraborty, S. (2020). A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Current Genetics*, 66(3), 447–462.
<https://doi.org/10.1007/s00294-019-01040-3>
6. Barboric M., Nisse, R. M. Kanazawa, S. Jabrane-ferrat, N. Peterlin, B. M. & Francisco S. (2001). NF- κ B Binds P-TEFb to Stimulate Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II University of California at San Francisco Medical Faculty of the University of Ljubljana. *Molecular Cell*, 8, 327–337.
7. Baum C, Dullmann J, Li Z, et al. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003;101(6):2099-2114.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2314>
8. Bing Zhao, (2020). *Protein & Cell*, Volume 11, Issue 10, Pages 771–775.
<https://doi.org/10.1007/s13238-020-00718-6>
9. Berkats H. , P. Kluge, B. Rajecky, L. Krejci, C. Friedel, D. Blazek (2019). Adeno-Associated Virus- Induced Dorsal Roo Gaglian Pathology *20:e47592*
<https://doi.org/10.15252/embr.201847592>
10. Brian P. Gibb & Michael Hadjiargyrou, (2021). Bacteriophage therapy for bone and joint infections, 103-B, No. 2 | Pages 234 - 244
<https://doi.org/10.1302/0301-620X.103B2.BJJ-2020-0452.R2>
11. Bon H. Yip, (2020). Recent Advances in CRISPR/Cas9 Delivery Strategies, *Biomolecules* 2020, 10(6), 839
<https://doi.org/10.3390/biom10060839>
12. BrounsRutering, J., Ilmer, M., Recio, A., Coleman, M., Vykoukal, J., Alt, E., & Orleans, N. (2008). Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science*, 5(6), 1–8. <https://doi.org/10.1126/science.1159689.Small>
13. Brendel C., & Grimm D. (2017). Current status of gene therapy for inherited retinal disease. *Ophthalmic research*, 58(1), 13-19.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094534>
14. Brister J. R., Ako-Adjei, Bao, Y. & Blinkova, O. (2014). NCBI viral genomes resource. *Nucleic acids research*, 43(D1), D571-D577.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku1207>
15. Chen H., Choi J. & Bailey, S. (2014). Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 289(19), 13284–13294. <https://doi.org/10.1074/jbc>
16. Chen M., Mao A., Xu M. Weng, Q., Mao J. & Ji J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Letters*, 447 (October 2018), 48–55.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017>
17. Chen, Shengmiao, Yao Y., Zhang Y. & Fan G. (2020). CRISPR system: Discovery, development and off-target detection. *Cellular Signalling*, 70 (December 2019), 109577. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109577>
18. Chen Shuliang, Yu X. & Guo D. (2018). CRISPR-Cas targeting of host genes as an antiviral [115] strategy. *Viruses*, 10(1), 1–28.

- <https://doi.org/10.3390/v10010040>
19. Chandrasekaran A., Song M., Kim K.S., Ramakrishna S., (2018). Chapter Six - Different Methods of Delivering CRISPR/Cas9 Into Cells, Volume 159, 2018, Pages 157-176.
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.05.001>
 20. Check, E. (2005). Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature*, 433(7026), 561.
 21. Check E. Brumfiel, G. Baldwin, D. Reichhardt, T. & Powell, K. (2022). Harmful potential of viral vectors fuels doubts over gene therapy
<https://doi.org/10.1038/433561a>
 22. Chan F., Alphonse M., & Liu Q. (2020). Strategies for no viral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 12(3), 1–14.
<https://doi.org/10.1002/wnan.1609>
 23. Chaga-Golubchuk M, Grinkevich V. Oncolytic adenoviruses: from basic research to clinical application. *Front Oncol.* 2020;10:601150.
 24. Cossum R. & Li Z. (2020). Genome editing with CRISPR–Cas9 technology 2003;101(6):2099-2114.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2314>
 25. Cronin J., Zhang X. Y. & Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Current gene therapy*, 5(4), 387-398.
<https://doi.org/10.2174/1566523054546224>
 26. Deyle, D. R. & Russell, D. W. (2009). Adeno-associated virus vector integration. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 11(4), 442–447.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.011.A>
 27. Duan D. (2018). Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Therapy*, 26(10), 2337–2356.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.011>
 28. Darbey A. & Lee B. Smith (2018). Deliverable transgenics & gene therapy possibilities for the testes, Pages 81-94
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.11.023>
 29. Douglas L. Mann, Douglas P. Zipes, Peter Libby, και Robert O. Bonow. *A Textbook of Cardiovascular Medicine*
 30. Douglas P. Zipes, Peter Libby, Robert O. Bonow, και Eugene Braunwald. *raunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine"*
 31. Doolittle R. F., Feng D. F., Tsang S., Cho G. & Little, E. (1996). Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock. *Science*, 271(5248), 470-477.
<https://doi.org/10.1126/science.271.5248.470>
 32. Donald B. Kohn, (2021). Improved Expression in Hematopoietic and Lymphoid Cells in Mice After Transplantation of Bone Marrow Transduced With a Modified Retroviral Vector, 94 (10): 3349–3357.
https://doi.org/10.1182/blood.V94.10.3349.422k05_3349_3357
 33. Dr. Barrie J. Carter, (2004). Adeno-Associated Virus Vectors in Clinical Trials, *HUMAN GENE THERAPY* 16:541-550.
<https://doi.org/10.1089/hum.2005.16.541>
 34. Eric B. Kmiec & Kevin Bloh (2021). A toolmaker’s perspective on CRISPR-directed gene editing as a therapeutic strategy for leukemia and beyond, Pages 587-592
<https://doi.org/10.1080/17474086.2021.1935853>
 35. Evanno G, Godet J, Peluso M, et al. Tumour-associated macrophages provide a pro-metastatic niche to early NSCLC cells. *Nature*. 2015;17(7):EEMOR1599.
<https://doi.org/10.1002/hep.31432>
 36. Fausto Cossu, (2010). Genetics Of SCID, *Italian Journal of Pediatrics* volume 36, Article number: 76.
<https://doi.org/10.1186/1824-7288-36-76>
 37. Ferguson MS, Lemoine NR, Wang Y. Systemic delivery of oncolytic viruses: hopes and hurdles. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;166:65-86.
<https://doi.org/10.1155/2012/805629>

38. Gardlík R., R. Pálffy, J. Hodosy, J. Lukács, J. Turňa, P. Celec (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy, *Med Sci Monit*, 11(4): RA110-121.
https://www.researchgate.net/profile/Peter-Celec-2/publication/7939678_Vectors_and_delivery_systems_in_gene_therapy/links/004635255b2cf4096c000000/Vectors-and-delivery-systems-in-gene-therapy.pdf
39. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Siegemund M., Sniekers S., Vlieghe D. & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*, 571-607.
<https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-890-0:571#citeas>
40. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG (2014). Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries* 8:129–136.
<https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
41. Golkar Z, Bagasra O, Pace DG (2014) Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Ctries* 8:129–136.
<https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
42. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med*. 2018;20(5):e3015.
<https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
43. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: an update. *J Gene Med*. 2018;20(5):e3015.
<https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
44. Ginn S. L., Alexander I. E., Edelstein M. L., Abedi M. R. & Wixon J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012—An update. *Journal of gene medicine*, 15(2), 65-77.
<https://doi.org/10.1002/jgm.2698>
45. Grimm D., Kay M. A. & Kleinschmidt J. A. (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Molecular therapy*, 7(6), 839-850.
[https://doi.org/10.1016/s1525-0016\(03\)00095-9](https://doi.org/10.1016/s1525-0016(03)00095-9)
46. Jaenisch R. and B. Mintz, (1974). Simian Virus 40 DNA Sequences in DNA of Healthy Adult Mice Derived from Preimplantation Blastocysts Injected with Viral DNA, *PNAS* 71 (4) 1250-1254.
<https://doi.org/10.1073/pnas.71.4.1250>
47. Jeppensen R. & M. Benros (2021). Autoimmune diseases and psychotic disorders, *Front. Psychiatry, Sec. Molecular Psychiatry, Volume 10 - 2019*
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00131>
48. High KA, Roncarolo MG. Gene therapy. *N Engl J Med*. 2019;381(5):455-464.
<https://doi.org/10.1056/nejmra1706910>
49. Hartley JW⁵⁰, Wolford NK, Old LJ, Rowe WP. A new class of murine leukemia virus associated with development of spontaneous lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(2):789-792.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.789>
50. Herzog R., L. Popplewell (2020). *Fast Facts: Gene Therapy, First Publish 2020*, S Karger Publisher Lt
51. Honaramooz A., S. Megee, W. Zeng, M. Destrempe, S. A. Overton, J. Luo, H. G. Homer, M. Modelski, F. Chen, S. Blash, D. T. Melican, W. G. Gavin, S. Ayres, F. Yang, P. Wang, Y. Echelard, I. Dobrinski (2007). Adeno-associated virus (AAV)-mediated transduction of male germ line stem cells results in transgene transmission after germ cell transplantation, *P* 374-382.
<https://doi.org/10.1096/fj.07-8935com>
52. Imperial M. J., & Kochanek S. (2004). Adenovirus vectors: Biology, design, and production. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 273, 335–357.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-05599-1_10
53. Kaminski, R. Chen, Y. Salkind, J. Bella, R. Young, W. Bin, Ferrante, P. Karn, J. Malcolm, T. Hu, W. & Khalili, K. (2016). Negative Feedback Regulation of HIV-1 by Gene Editing Strategy. *Scientific Reports*, 6(June), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep31527>
54. Kakarla S, Gottschalk S. CAR T cells for solid tumors: armed and ready to go? *Cancer J*. 2014;20(2):151-155.
<https://doi.org/10.1097/ppo.000000000000032>

55. Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med.* 2001;7(1):33-40.
<https://doi.org/10.1038/83324>
56. Kalluri R. & V.LeBleu (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes, vol 367, Issue 6478
<https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
57. Keeler M., M. ElMallah & T. Flotte (2021). *Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions*, 10(4): 242–248.
<https://doi.org/10.1111%2Fcts.12466>
58. Konopka K, Nguyen VH, Jazowiecka-Rakus J, Wiatrak P. Possible uses of oncolytic virotherapy in head and neck cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):779
59. Kotin R. M. (1994). Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. *Human gene therapy*, 5(7), 793-801.
<https://doi.org/10.1089/hum.1994.5.7-793>
60. Kost T. A., Condreay J. P. & Jarvis D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, 23(5), 567-575.
<https://doi.org/10.1038/nbt1095>
61. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of applied crystallography*, 26(2), 283-291.
<https://doi.org/10.1002/jmr.261>
62. Liliam K. Harada , Erica C. Silva , Welida F. Campos , Fernando S. Del Fiol , Marta Vila , Krystyna Dąbrowska , Victor N. Krylov , Victor M. Balcão (2018). Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.007>
63. Leïla Boudra, (2023). The cultural-historical development of occupational accidents and diseases prevention in France: A scoping review, 106016.
<https://doi.org/10.1016/j.ssci.2022.106016>
64. Lee C. S. Bishop, E. S. Zhang, R. Yu, X. Farina, E. M., Yan S., Zhao C. Zeng, Z., Shu Y. Wu X. Lei, J. Li Y., Zhang W, Yang, C. Wu, K. Wu, Y. Ho S., Athiviraham, A. Lee, M. J., He, T. C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes and Diseases*, 4(2) <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>
65. Lee K. Conboy, M. Park, H. M., Jiang F., Kim H. J., Dewitt A. Mackley, V. A., Chang K. Rao, A. Skinner C., Mehdipour M. Liu, H. Huang W., Lan F., Bray N. L., Li S., Corn J. E., Kataoka K., & Doudna J. A. (2018). in vivo induces homology-directed DNA repair. *Nat Biomed Eng.*, 889–901.
<https://doi.org/10.1038/s41551-017-0137->
66. Lukashov A. N. & A. A. Zamyatnin Jr. (2016). Viral vectors for gene therapy: Current state and clinical perspectives, 700–708.
<https://link.springer.com/article/10.1134/S0006297916070063#citeas>
67. Liu J., Li C., Yu Z., Huang P., Wu H., Wei C., Zhu N., Shen Y., Chen Y., Zhang B., Deng W. M. & Jiao, R. (2012). Efficient and Specific Modifications of the *Drosophila* Genome by Means of an Easy TALEN Strategy. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(5), 209–215
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.003>
68. Lidke DS, Nagy P. Post-translational mechanisms controlling the organization and function of ezrin. *Eur J Cell Biol.* 2019;98(8-9):373-384.
<https://doi.org/10.1038/s41580-022-00507-5>
69. Lundstrom K. & T. Boulikas, (2003). *Viral and Non-viral Vectors in Gene Therapy: Technology Development and Clinical Trials*, Volume 2, Issue 5
Pages: 471 – 485.
<https://doi.org/10.1177/153303460300200513>
70. Lux K., Goerlitz N., Schlemminger S., Perabo L., Goldnau D., Endell, J., ... & Kleinschmidt, J. A. (2005). Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking.
<https://doi.org/10.1128/jvi.79.18.11776-11787.2005>

71. Lobočka M., Hejnowicz M. S., Dąbrowski K., Gozdek A., Kosakowski J., Witkowska, M. & Lavigne, R. (2014). Genomic mosaic of the lytic bacteriophage ϕ O1205, virulent for *Aeromonas salmonicida*. *Journal of virology*, 88(17), 10092-10105.
72. Matthew L. Hirsch, Sonya J. Wolf & R. J. Samulski (2016). Delivering Transgenic DNA Exceeding the Carrying Capacity of AAV Vectors, Part of the *Methods in Molecular Biology* book series (MIMB, volume 1382). https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-3271-9_2
73. Mark F. Carty & James J. DiNicolantonio (2020). Nutraceuticals have potential for boosting the type 1 interferon response to RNA viruses including influenza and coronavirus, 63(3): 383–385 <https://doi.org/10.1016%2Fj.pcad.2020.02.007>
74. Ma, S., Zhang, S., Wang, F., Liu, Y., Liu, Y., Xu, H., Liu, C., Lin, Y., Zhao, P., & Xia, Q. (2012). Efficient and Specific Genome Editing in Silkworm Using Custom TALENs. *PLoS ONE*, 7(9), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045035>
75. Ma, D., Xu, Z., Zhang, Z., Chen, X., Zeng, X., Zhang, Y., Deng, T., Ren, M., Sun, Z., Jiang, R., & Xie, Z. (2019). Engineer chimeric Cas9 to expand PAM recognition based on evolutionary information. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08395-8>
76. Ma, Y, Shen, B, Zhang, X, Lu, Y, Chen, W, Ma, J, Huang, X., & Zhang, L. (2014). Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9. *PLoS ONE*, 9(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089413>
77. Ma, Y, Zhang, L, & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS Journal*, 281(23), 5186–5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
78. Mossman K., C. Upton, R.M.L. Buller, G. McFadden, (1995). Species Specificity of Ectromelia Virus and Vaccinia Virus Interferon- γ Binding Proteins, Volume 208, Issue 2, Pages 762-769 <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1208>
79. Mohammadi, Alireza; Amooeian, Vahid G.; Rashidi, Ehsan, (2018). Dysfunction in Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Pathway and Susceptibility to Schizophrenia, Parkinson's and Alzheimer's Diseases, pp. 45-63(19). <https://doi.org/10.2174/1566523218666180302163029>
80. Mingozzi F, High KA. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet*. 2011;12 (5):341-355. <https://doi.org/10.1038/nrg2988>
81. Michael C. Milone & U. O'Doherty (2018). Clinical Use Of Lentiviral Vectors Leukemia volume 32, pages 1529–1541. <https://www.nature.com/articles/s41375-018-0106-0#article-info>
82. Miller O. J., Leuchs B. & Grimm D. (2006). Dog's hepatitis—the forgotten fox? Biology, pathogenesis and protection. *Veterinary research*, 37(6), 61-77.
83. Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F. H. & Verma I. M. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263-267. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263>
84. Nancy L. Meyer & Michael S. Chapman, (2022). Adeno-associated virus (AAV) cell entry: structural insights, P432-451 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.09.005>
85. Nathwani AC, Tuddenham EGD, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2011;365(25):2357-2365. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1108046>
86. Nóbrega C., L. Mendonca & Carlos A. Matos (2020). Viral Vectors For Gene Therapy, pp 39-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612075113>
87. Obuchi M, Fernandez-Cuesta L, Sun N, et al. Systematic identification of genes with a cancer-relevant role in int6 regulation. *PLoS ONE*. 2015;10(10):e0140340. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2421>
88. Patel BP, Shah KP, Maroli AS, Patel JS, Shrivastav PS, Patel JK. Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment. *Curr Drug Targets*. 2017;18(9):1031-1046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.013>

89. Palmer JN, Federspiel MJ, Feldman MD, et al. Integrating molecular advances into the diagnosis and management of thyroid cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(10):1228-1240.
<https://doi.org/10.3390/cancers14041061>
90. Paul A., M. Kveta, P. Kluge, B. Rajecky, J. Oppelt, P. Khirsariya, K. Paruch, L. Krejci, C. Friedel, D. Blazek (2019). CDK12 controls G1/S progression by regulating RNAPII processivity at core DNA replication genes, *EMBO Reports* (2019)20:e47592
<https://doi.org/10.15252/embr.201847592>
91. Quantin B., L D Perricaudet, S Tajbakhsh, and J L Mandel Authors Info & Affiliations (1992). Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo, *89 (7) 2581-2584*
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2581>
92. Rapti K, Louis-Jeune V, Kohlbrenner E, et al. In vivo enhancement of peptide display by in situ modification of viral vector particles. *Sci Transl Med.* 2012;4(140):140ra89.
93. Russell SJ, Peng KW, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol.* 2012;30(7):658-670.
<https://doi.org/10.1038/nbt.2287>
94. Sauer R. and N. Henderson, (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *85 (14) 5166-5170.*
<https://doi.org/10.1172/JCI13662>
95. Sampson JH, Maus MV, June CH. Immunotherapy for brain tumors. *J Clin Oncol.* 2017;35(21):2450-2456.
<https://doi.org/10.1200/jco.2017.72.8089>
96. Salima Hacein-Bey-Abina,1,2 Alexandrine Garrigue,2 Gary P. Wang,3 Jean Soulier,4 Annick Lim,5 Estelle Morillon,2 Emmanuelle Clappier,5 Laure Caccavelli,1 & Eric Delabesse,6, (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1, *Clin Invest*, 118(9):3132–3142.
<https://doi.org/10.1172/JCI35700>
97. Singhto N. & V. Thongboonkerd (2018). Exosomes derived from calcium oxalate-exposed macrophages enhance IL-8 production from renal cells, neutrophil migration and crystal invasion through extracellular matrix, *Journal of proteomics*, volume 18 pages 64-<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.06.015>
98. Sakuma T., A. Barry & Y. Ikeda (2012). Lentiviral Vectors: Basic to Transitional. *Biochem J* 443 (3): 603–618.
<https://doi.org/10.1042/BJ20120146>
99. Shyam Daya, Kenneth I. Berns (2008). Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Associated Virus Vectors.
<https://doi.org/10.1128/cmr.00008-08>
100. Shahbazizadeh S, Jigmeddagva U, Hishiki T, et al. Structure of rhinovirus C ARG16/GLN21 pocket suggests conserved water-mediated interfacial dynamics modulate viral uncoating and infection. *Structure.* 2020;28(4):469-480.e7.
101. Summers M. D., & Smith G. E. (1987). A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agriculture Experiment Station Bulletin, 1555, 1-57.
<https://oaktrust.library.tamu.edu/bitstream/handle/1969.1/145892/Bull1555a.pdf?sequence=1>
102. Srivastava A., & Hine C. (2009). Baculovirus expression: insect-based production of recombinant protein. *Current protocols in protein science*, 15(5), 1.27. 1-1.27. 24.
<https://doi.org/10.1515/znc-2017-0066>
103. Temin and Mizutani, (1994). Selection of high-affinity RNA ligands to reverse transcriptase: Inhibition of cDNA synthesis and RNase H activity, *33, 29, 8746–8756.*
<https://doi.org/10.1021/bi00195a016>
104. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2003;4(5):346-358.
<https://doi.org/10.1038/nrg1066>
105. To, L., & Editor, T. H. E. (2017). A non-viral CRISPR / Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 in vivo. *5, 440–443.*
<https://doi.org/10.1038/cr.2017.16>

106. Toshiharu Yamashita, Hidefumi Tonoki, Daichi Nakata, Shigeru Yamano, Kaoru Segawa & Tetsuya Moriuchi (1999). Adenovirus Type 5 E1A Immortalizes Primary Rat Cells Expressing Wild-Type p53, 年 43 卷 11 号 p. 1037-1044.
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/mandi1957/-char/ja>
107. Tian Z., Xi. Guo, P. Michaud, M. Zha, L. Zhu, X. Liu (2023). The gut microbiome of *Helicoverpa armigera* enhances immune response to baculovirus infection via suppression of Duox-mediated reactive oxygen species
<https://doi.org/10.1002/ps.7546>
108. Yang Y., Nunes F. A., Berencsi K. & Furth E. E. (1994). Gonadal steroids inhibit follicular atresia and apoptosis in the rat ovary. *Endocrinology*, 135(5), 2206-2212.
<https://doi.org/10.1210/edrv-15-6-707>
109. Yang, Y, Wang, L, Bell, P., Mcmenamin, D., He, Z., White, J., Yu, H., Xu, C., Morizono, H., Musunuru, K., Batshaw, M. L., & Wilson, J. M. (2016). Metabolic Liver Disease in Newborn Mice. *Nature Biotechnology*, 34(3), 334–338.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3469.A>
110. Yang Y., Wang L., Bell P., Mcmenamin D., He Z., White J., Yu H., Xu C., Morizono H., Musunuru K., Batshaw M. L. & Wilson, J. M. (2016). Metabolic Liver Disease in Newborn Mice. *Nature Biotechnology*, 34(3), 334–338.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3469.A>
111. Yin H, Xue W, Anderson DG. CRISPR-Cas: a tool for cancer research and therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(5):281-295.
<https://doi.org/10.1038/s41571-019-0166-8>
112. Yin H., Song C., Suresh S., Wu Q., Walsh S., Rhym L. H., Mintzer E., Bolukbas, M. F., Zhu L. J., Kauffman K., Mou H. Oberholzer, A. Ding, J. Kwan, S. Bogorad, R. L. Zatzepin, T. Koteliensky, V. Wolfe, S. A. Xue, W., ... *Biology*, I. (2018). HHS Public Access. 35(12), 1179– 1187.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4005.Structure-guided>
113. You L., Tong R., Li M., Liu Y., Xue J. & Lu, Y. (2019). Advancements and Obstacles of CRISPRCas9 Technology in Translational Research. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 13(June), 359–370.
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.02.008>
114. Verdera HC, Kuranda K, Mingozi F. AAV vector immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer. *Mol Ther*. 2020;28(3):723-746.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.12.010>
115. Vivian W.Choi & Richard J.Samulski (2010). Self-complementary AAV Virus (scAAV) Safe and Long-term Gene Transfer in the Trabecular Meshwork of Living Rats and Monkeys, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Vol.51, 236-248
<https://doi.org/10.1167/iovs.09-3847>
116. Wang Y., & Davidson B. L. (2008). Viral vectors for gene delivery to the central nervous system. *Neurobiology of disease*, 8(1-2), 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.014>
117. Wang G., Zhao N., Berkhout B. & Das A. T. (2016). CRISPR-Cas9 can inhibit HIV-1 replication but NHEJ repair facilitates virus escape. *Molecular Therapy*, 24(3), 522–526
<https://doi.org/10.1038/mt.2016.24>
118. Wang G., Zhao N., Berkhout B. & Das A. T. (2018a). CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Research*, 244 (July 2017), 321–332.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.020>
119. Wang G., Zhao N., Berkhout B. & Das, A. T. (2018b). CRISPR-Cas based antiviral strategies against HIV-1. *Virus Research*, 244 (May 2017), 321–332.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.020>
120. Wang G., Zhao N., Berkhout B., Das A. T., Wang G., Zhao N., Berkhout B. & Das, A. T. (2016). Report A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Report A Combinatorial CRISPR-Cas9 Attack on HIV-1 DNA Extinguishes All Infectious Provirus in Infected T Cell Cultures. *CellReports*, 17(11), 2819– 2826.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.11.057>

121. Wang H., La Russa M. & Qi L. S. (2016). CRISPR/Cas9 in Genome Editing and beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 227–264. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014607>
122. Wang H. X., Li M., Lee C. M., Chakraborty S., Kim H. W., Bao G. & Leong, K. W. (2017). CRISPR/Cas9-Based Genome Editing for Disease Modeling and Therapy: Challenges and Opportunities for Nonviral Delivery. *Chemical Reviews*, 117(15), 9874–9906. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00799> [126]
123. Wang J., Li J., Zhao H., Sheng G., Wang M., Yin M. & Wang, Y. (2015). Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell*, 163(4), 840–853. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.008>
124. Wang L., Li F., Dang L., Liang C., Wang C., He B., Liu J., Li D., Wu X., Xu X., Lu A. & Zhang G. (2016). In Vivo delivery systems for therapeutic genome editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/ijms17050626>
125. Wang Q., Liu S., Liu Z., Ke Z., Li C., Yu X., Chen S., & Guo D. (2018). Genome scale screening identification of SaCas9/gRNAs for targeting HIV-1 provirus and suppression of HIV-1 infection. *Virus Research*, 250 (April), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.04.002>
126. Wang W., Ye C., Liu J., Zhang D., Kimata J. T. & Zhou P. (2014). CCR5 gene disruption via lentiviral vectors expressing Cas9 and single guided RNA renders cells resistant to HIV-1 infection. *PLoS ONE*, 9(12), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115987>
127. Wang, Z., Pan, Q., Gendron, P., Zhu, W., Guo, F., Cen, S., Wainberg, M. A., & Liang, C. (2016). CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Reports*, 15(3), 481–489. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.042>
128. William C Summers, (2017). Félix Hubert d'Herelle (1873–1949): History of a scientific mind, e1270090. <https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1270090>
129. Zhu W., Lei R., Le Duff Y., Li J., Guo, F. Wainberg, M. A. & Liang, C. (2021). The CRISPR/Cas9 system inactivates latent HIV-1 proviral DNA. *Retrovirology*, 12(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0150-z>
130. Zhen S, Hua L, Takahashi Y, Narita S, Liu YH, Li Y. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by CRISPR/Cas9. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450(4):1422-1426. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.014>
131. Zhu Y, Chen X, Zhang H, Zhao X. Gene therapy for cancer: smart drug delivery systems and prospects. *J Control Release*. 2020;315:63-75. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1876182>
132. Βασιλόπουλος Γ. & Σημαντηράκης Ε., (2016). Βασικές αρχές των ιικών φορέων της γονιδιακής θεραπείας, *Haema* 7(1): 57-71 Copyright EAE. http://haema-journal.gr/PDF/2016/HAEMA_2016-57.pdf