



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΣΠΟΥΔΩΝ**



ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ – ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

Η ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Γ. ΧΑΤΖΗΓΕΩΡΓΙΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ ΙΩΑΝΝΑ,

Επίκουρη Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας Παν. Θεσσαλίας,

Επιβλέπουσα

**ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κυτ. Βιολογίας
Παν. Θεσσαλίας, Συνεπιβλέπουσα**

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ,

Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Παν. Θεσσαλίας, Μέλος

**Λάρισα
2024**



**UNIVERSITY OF THESSALY
FACULTY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL SCHOOL
POSTGRADUATE MASTER
PROGRAMM
HUMAN GENETICS – GENETIC COUNCELING**



**CANCER GENE THERAPY
DIMITRIOS CHATZIGEORGIOU
POSTGRADUATE STUDENT**

EXAMINING BOARD MEMBERS

Ioanna Papathanasiou, Assistant Professor of Medical Biology,

University of Thessaly, Supervisor

Varvara Trachana, Associate Professor of Cell Biology,

University of Thessaly, Co- Supervisor

Aspasia Tsezou, Professor of Medical Genetics,

University of Thessaly, Member

LARISA

2024

Ευχαριστίες συγγραφέα

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή επιτροπή, την καθηγήτρια κυρία Τσέζου Ασπασία και την αναπληρώτρια καθηγήτρια κυρία Βαρβάρα Τραχανά για την ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα και την επίβλεψη στην εργασία αυτή.

Ιδιαίτέρως θέλω να ευχαριστήσω την επίκουρη καθηγήτρια κυρία Παπαθανασίου Ιωάννα για τις εύστοχες και πολύτιμες διορθώσεις, που βοήθησαν στην ολοκλήρωση αυτού του πονήματος. Θα ήταν παράλειψη να μην αναφερθώ στην υπομονή και κατανόηση, που επέδειξε κατά την αγαστή συνεργασία μας.

Στην ιερή μνήμα των γονιών μου

Γιώργου και Δωροθέας

που μου έμαθαν την αγάπη και την καλοσύνη...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Περίληψη	7
B. Abstract	8
Γ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
Γ.1 Συστήματα μεταφοράς γονιδιακής θεραπείας.....	11
Γ.1 α DNA ιοί.....	14
Γ.1 β RNA ιοί.	14
Γ.2 Μέθοδοι μεταφοράς διαγονιδίων χωρίς τη μεσολάβηση ιών	16
Γ.3 Νανοσωματίδια	20
Γ.4 Τρανσποζόνια.....	26
Γ.5 Τεχνητά χρωμοσώματα	27
Γ.6 Γονιδιωματική επιδιόρθωση -genome editing	30
Γ.6 α Μεγανουκλεάσες	32
Γ.6 β Zinc -finger ενδονουκλεάσες (ZFNs)	33
Γ.6 γ TALEN-ενδονουκλεάσες (Transcription Activator-like Effector Nucleases)	33
Γ.6 δ CRISPER-CAS 9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9)	34
Γ.7 Παρούσα κατάσταση της γονιδιακής θεραπείας.....	35
Δ. Στρατηγικές θεραπείας.....	37
Δ.1 Αντικατάσταση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.....	37
Δ.2 Αποσιώπηση ογκογονιδίων	39
Δ.3 Αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων (transcription factor decoys)	40
Δ.4 Θεραπεία με microRNAs	43
Δ.5 Γονιδιωματική επιδιόρθωση -genome editing.....	47
Δ.5 α Zinc -finger ενδονουκλεάσες (ZFNs).....	48

Δ.5 β TALEN-ενδονουκλεάσες (Transcription Activator-like Effector Nucleases)	48
Δ.5 γ CRISPER-CAS 9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9)	49
Δ.5 δ Prime editing	51
Δ.6 Θεραπεία αυτοκτονίας (suicide gene therapy).	54
Δ.7 CAR -T κύτταρα	60
Δ.8 CAR- N κύτταρα	68
Δ.9 Κυτοκίνες	69
Δ.10 Θεραπεία με εξωσώματα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα	74
E. Συστήματα μεταφοράς γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο	76
E.1 Ιϊκοί φορείς	76
E.2 Νανοσωματίδια	80
ΣΤ. Φάρμακα γονιδιακής θεραπείας που έχουν πάρει έγκριση από το FDA	88
Z. Κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας	94
H. Συμπεράσματα	95
Θ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	97

A. Περίληψη

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι μέχρι σήμερα εφαρμοζόμενες θεραπείες (χειρουργική, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ανοσοθεραπεία) δεν έχουν αποδώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα και δεν είναι άμοιρες επιπλοκών και αντίστασης στη θεραπεία. Η ανάγκη για μια αποτελεσματική και επιλεκτική θεραπεία οδήγησε στη δοκιμή της γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο, καθώς ο καρκίνος είναι μια γενετική νόσος, που χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μεταλλάξεων, έναντι των οποίων μπορεί να στραφεί η γονιδιακή θεραπεία. Οι στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο περιλαμβάνουν: την αποσιώπηση ογκογονιδίων, την καταστολή ογκοκατασταλτικών ογκογονιδίων, τους αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων, τα microRNAs, τη θεραπεία αυτοκτονίας, τη γονιδιωματική επιδιόρθωση με χρήση μεγανουκλεασών (zinc-finger νουκλεασών, TALEN νουκλεασών, το σύστημα CRISPR/CAS) το prime editing, τα CART κύτταρα, τα CARN κύτταρα, τη θεραπεία με γονίδια κυτοκινών, τη θεραπεία με εξωσώματα προερχόμενα από καρκινικά κύτταρα. Στο εμπόριο κυκλοφορούν 12 σκευάσματα γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας, ενώ οι κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο ανέρχονται σε 1346 παγκοσμίως. Ωστόσο οι περιορισμοί είναι αρκετοί και αφορούν τόσο στις ανεπιθύμητες ενέργειες όσο και στην αποτελεσματικότητα της. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν την τοξικότητα, την ανοσογονικότητα και την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης και δευτερογενώς καρκινογένεσης. Η αποτελεσματικότητα είναι περιορισμένη εξαιτίας της αποτυχίας μεταφοράς του διαγονιδίου σε δύσκολα προσεγγίσιμους καρκίνους, της αναποτελεσματικής διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων, της σταθερής και μακροχρόνιας έκφρασης του διαγονιδίου.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος, γονιδιακή θεραπεία, κυτταρική θεραπεία, αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια, CART κύτταρα.

B. Abstract

Cancer is the second cause of death in the world after cardiovascular diseases. Cancer treatments until now (surgery, chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy) have not been successful and often share side effects and resistance to therapy. The need for an effective and selective therapy has driven to the rehearsal of gene therapy in cancer, as cancer is a genetic disease, that involves many mutations, against which gene therapy can act. Strategies of gene therapy include: silencing of oncogenes, suppression of suppressor genes, suppressors of transcription factors, microRNAs, genome editing (zinc-finger nucleases, TALE Nucleases, CRISPR/CAS), prime editing, CART cells, CARN cells, therapy with cytokine genes, therapy with exosomes deriving from cancer cells. 12 therapeutic devices of gene and cellular treatment circulate in the market and clinical trials of cancer gene therapy that take place universally are 1346. However, there are limitations concerning side effects and effectiveness of treatment. Side effects include toxicity, immunogenicity and likelihood of insertional mutagenesis and secondary carcinogenesis. The effectiveness is limited because of failure of transfer of transgene to difficult accessible cancers, ineffective transduction of cancer cells, stable and long-lasting expression of transgene.

Key words: cancer, gene therapy, cellular therapy, antisense oligonoukleotides, CART cells.

Γ. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (<https://www.who.int/health-topics/cancer>). Οι θεραπευτικές επιλογές, που περιλαμβάνουν τη χειρουργική αφαίρεση, την ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία δεν έχουν αποδώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα και δεν είναι άμοιρες επιπλοκών ή και εμφάνισης αντίστασης στη θεραπεία (www.cancer.gov/about-cancer-treatment). Η ανοσοθεραπεία έχει τελευταία εισχωρήσει στη θεραπευτική μας φαρέτρα, αλλά και αυτή μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να είναι αναποτελεσματική ή και με επιπλοκές (Sordo-Bahamonde et al., 2023). Η ανάγκη για μια πιο στοχευμένη θεραπεία, που θα αφορά μόνο στα καρκινικά κύτταρα, οδήγησε την έρευνα στα μονοπάτια της γονιδιακής θεραπείας (Zoting Gayatri Subhash., Mrs.Pagire.2022).

Ο καρκίνος είναι μια γενετική νόσος, που μπορεί να οφείλεται σε ενεργοποίηση πρωτοογκογονιδίων ή στην καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Kontomanolis et al., 2020). Γενικά χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μεταλλάξεων, που οδηγούν στην εμφάνιση του νεοπλασματικού φαινότυπου (Kontomanolis et al., 2020). Επομένως να στοχεύσουμε σε αυτές τις μεταλλάξεις μπορεί να οδηγήσει στην αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου.

Η γονιδιακή θεραπεία είναι η τροποποίηση του γενετικού υλικού με σκοπό την αντιμετώπιση, πρόληψη ή και θεραπεία μιας νόσου ([medlineplus.gov/genetics/understand/therapy/gene therapy](http://medlineplus.gov/genetics/understand/therapy/gene-therapy)). Η γονιδιακή θεραπεία αποτελείται από την εισαγωγή γενετικού υλικού σε κύτταρα με σκοπό να προσφέρει μια νέα λειτουργία ή να διορθώσει μια κυτταρική λειτουργία (Gonçalves & Paiva, 2017). Η παρουσία ελαττωματικών γονιδίων είναι η αιτία διάφορων νοσημάτων όπως κυστική ίνωση, σύνδρομο συνδυασμένης ανοσοανεπάρκειας, μυϊκή δυστροφία, θαλασσαιμία, αιμοροφιλία και πολλοί καρκίνοι. Η γονιδιακή θεραπεία θα μπορούσε να διορθώσει αυτά τα ελαττωματικά γονίδια.

Ανάλογα με τον τύπο του ιστού, που επηρεάζεται διακρίνουμε τη γαμετική γονιδιακή θεραπεία, όπου το γονίδιο εισάγεται στα γαμετικά κύτταρα, που θα δώσουν γένεση στα ωάρια ή στα σπερματοζωάρια και τη σωματική γονιδιακή θεραπεία, όπου το γονίδιο εισάγεται στα σωματικά κύτταρα. Στη γαμετική γονιδιακή θεραπεία το τροποποιημένο γονίδιο μεταβιβάζεται στις επόμενες γενιές (Gonçalves & Paiva, 2017).

Στόχοι της γονιδιακής θεραπείας είναι:

Η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων ή η καταστολή της έκφρασης γονιδίων. Το πρώτο επιτυγχάνεται με την εισαγωγή φυσιολογικού γονιδίου για την παραγωγή του ελαττωμένου γονιδιακού προϊόντος

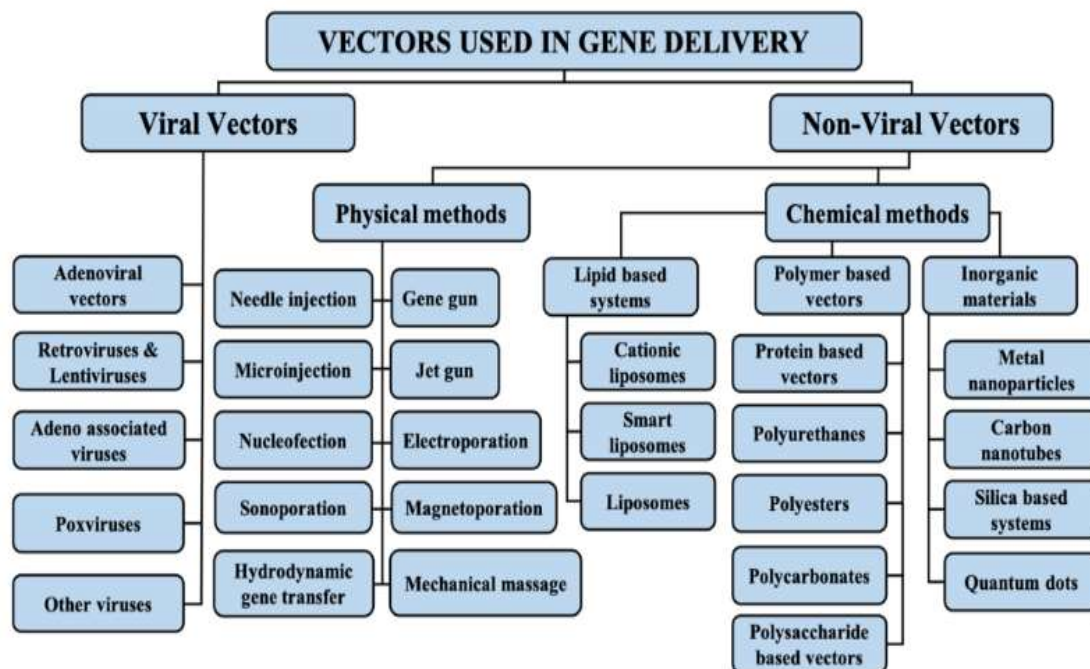
Η καταστολή της έκφρασης γονιδίων γίνεται με εισαγωγή αντινοσηματικού ολιγονουκλεοτιδίου (antisense oligonoukleotide ASOs) ή μη κωδικού RNA (non coding RNAs : siRNAs,miRNAs lncRNAs) που καταστέλλει την έκφραση ενός ελαττωματικού γονιδίου ή παρεμβαίνει στη δράση του γονιδιακού προϊόντος. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τη θεραπεία κληρονομικών ασθενειών, που οφείλονται σε ελαττωματική λειτουργικότητα του γονιδιακού προϊόντος, σε καρκίνους και σε μολυσματικές νόσους (Collotta et al., 2023).

Για να πραγματοποιηθεί η γονιδιακή θεραπεία πρέπει να παρασκευασθεί το θεραπευτικό μόριο, το οποίο είναι DNA ή RNA (ASOs ή non-coding RNA), να εντοπισθεί ο κυτταρικός ιστός, που έχει τη βλάβη και να επιλεγεί το κατάλληλο σύστημα μεταφοράς του θεραπευτικού μορίου, που εμφανίζει εκλεκτική επίδραση μόνο στον παθολογικό ιστό (Collotta et al., 2023).

Κατά την επιλογή του συστήματος μεταφοράς είναι επιθυμητό: να μην προκαλεί ανοσολογική αντίδραση, να παράγεται εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα, να μπορεί να μεταφέρει γενετικό υλικό ποικίλου μεγέθους, να εμφανίζει εκλεκτική δράση στα κύτταρα του οργανισμού, να ενσωματώνεται σε συγκεκριμένη θέση στο γονιδίωμα και να προκαλεί τη μακροχρόνια έκφραση γονιδίων (Gonçalves & Paiva, 2017).

Γ.1 Συστήματα μεταφοράς γονιδιακής θεραπείας

Στην παρακάτω εικόνα 1 φαίνονται τα βασικά συστήματα μεταφοράς και οι κύριες μέθοδοι μη-ϊικής γονιδιακής μεταφοράς



Εικόνα 1 Φορείς γονιδιακής θεραπείας. Ίικοί και μη ιικοί .Φυσικές και χημικές μέθοδοι μεταφοράς μη ιικών φορέων (Butt et al., 2022).

Οι θεραπευτικοί φορείς (vectors) διακρίνονται σε ιικούς φορείς και μη ιικούς φορείς. Η χορήγηση τους γίνεται είτε απευθείας στα όργανα -στόχους είτε με ενδομυϊκή ή ενδοφλέβια ένεση (Lundstrom, 2023). Οι ιοί όπως είναι γνωστό μετά την είσοδο τους στα κύτταρα εκμεταλλεύονται το μηχανισμό του κυττάρου-ξενιστή για να πολλαπλασιαστούν. Οι ιικοί φορείς από λοιμογόνους παραγοντες μετατρέπονται σε θεραπευτικά οχήματα (φορείς) με τεχνικές μοριακής γενετικής χάνοντας συγκεκριμένα γονίδια. Τελικά οι θεραπευτικοί αυτοί φορείς όταν εισαχθούν στα κύτταρα, τους προσδίδουν μη-ϊικές γενετικές πληροφορίες (Lundstrom, 2023). Οι ιικοί φορείς διακρίνονται σε αυτούς, που ενσωματώνονται στο DNA, όπως οι RNA ιοί : ρετροϊοί , λεντιοί και σε αυτούς, που δεν ενσωματώνονται στο DNA:DNA ιοί: αδενοϊοί, αδενοσυσχετιζόμενοι ιοί, ερπητοϊοί (Lundstrom, 2023).

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ιοί και τα βασικά χαρακτηριστικά τους απεικονίζονται στον πίνακα 1

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων ιϊκών φορέων (bin Umair et al., 2022b)

Table 1 Characteristics of the commonly used viral vectors

Viral system	Genome	Genome size	Insert capacity	Enveloped	Vector genome form	Transgene expression	Duration of gene expression	Host range	Immunogenicity	Advantages	Drawbacks	Examples
Adenovirus	dsDNA	36 kb	8-36 kb	No	Episomal	High	Transient	Relatively broad	High	High titers, efficient transduction of most types of cells and tissues	A potent inflammatory response is mediated by the capsid	HAd5, HAd26, HAd35
Adeno-associated virus	ssDNA	8.5 kb	<4 kb	No	Episomal (>90%), site specific integration (<10%)	Medium	Transient or stable	Relatively broad	Low	Safe delivery of transgenes, non-pathogenic, non-inflammatory	Packaging capacity is small, helper AdV is required for replication, hard to produce pure viral stock	AAV 2, 3, 5, 6, 8, 9
Retrovirus	ssRNA	7-11 kb	8 kb	Yes	Random chromosomal integration	Medium	Stable	Restricted, dividing cells only	Low	Persistent gene transfer in dividing cells	Transduces dividing cells only, chance of induction of oncogenesis during integration	MMSV, MSCV, MMLV
Lentivirus	ssRNA	8 kb	8 kb	Yes	Chromosomal integration	High	Stable	Broad	Low	Low cytotoxicity, inducible expression, persistent gene transfer in most tissues	Integration might induce oncogenesis in some applications	HIV-1, HIV-2, ELAV

Table 1 (continued)

Viral system	Genome	Genome size	Insert capacity	Enveloped	Vector genome form	Transgene expression	Duration of gene expression	Host range	Immunogenicity	Advantages	Drawbacks	Examples
Herpesvirus	dsDNA	150 kb	>30 kb	Yes	Episomal	High	Transient	Broad	High	Packaging capacity is large, strong tropism for neural cells	Inflammatory, gene expression is transient in non-neural cells, no expression during latent infection	HSV, HSV-1
Alphavirus	ssRNA	12 kb	8 kb	Yes	Cytosomal	High	Transient and extreme	Broad	Low	No integration, does not elicit anti-vector immunity, targets dendritic cells	Safety concerns regarding VEE, hard to produce	SFV, SIN, VEE, M1
Poxvirus	dsDNA	130-230 kb	>30 kb	Yes	Episomal	High	Transient	Broad	Low	Well suited as an oncolytic vector, particularly apt as attenuated recombinant vaccine, multiple sites for transgene insertion	Potentially cytotoxic, heterologous promoters difficult to use, complicated generation of recombinants	VV
Picornavirus	ssRNA	6.7-10.1 kb	6 kb	No	Episomal	High	Stable	Broad	High	High titers, non-genotoxic effect, non-coding oncogenes and easy manipulation in cDNA	Inherent genetic instability	Coxsackievirus, enteroviruses, rhinoviruses

Table 1 (continued)

Viral system	Genome	Genome size	Insert capacity	Enveloped	Vector genome form	Transgene expression	Duration of gene expression	Host range	Immunogenicity	Advantages	Drawbacks	Examples
Newcastle disease virus	ssRNA	15.2 kb	6 kb	Yes	Episomal	High	Stable	Restricted	High	Simple genome, easily programmable, improved oncolytic vector, replication in cytoplasm	Restricted to the avian respiratory tract, sensitive to interferon	Lasota strain, R2B
Measles virus	ssRNA	16 kb	6 kb	Yes	Cytosomal	High	Transient	Relatively broad	High	Oncolytic stain, self-amplifying RNA replicon, persistent immunity, infects dendritic cells, macrophages, no integration, genetic stability	Pre-existing immunity in individuals	MV-Edm

Γ.1 α DNA ιοί

Αδενοϊοί.

Είναι οι μεγαλύτεροι χωρίς φάκελο ιοί, που περιέχουν ένα γραμμικό διπλής έλικας DNA 26-45 kbp και μπορούν να μεταφέρουν 8 kbp διαγονίδια. Δεν ενσωματώνονται στο γενετικό υλικό των κυττάρων του ξενιστή. Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από αρχικά γονίδια (E1 ως E4), που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των μη δομικών πρωτεϊνών και τα τελικά (L1-L5), που κωδικοποιούν τα δομικά συστατικά του σωματιδίου του ιού (virion). Οι πρώτης γενιάς είναι ισχυρά ανοσογονικοί και μπορούν να μεταφέρουν διαγονίδια 8,2 kb καθώς στερούνται των περιοχών E1 και E3. Οι δεύτερης γενιάς δεν περιέχουν κανένα από τα αρχικά γονίδια και οι τρίτης αναφέρονται ως gutless (χωρίς σπλάχνα), είναι υψηλής ικανότητας μεταφοράς και γνωστοί ως helper-dependent adenoviruses. Διατηρούν μόνο τα ITRs και το σήμα πακεταρίσματος (Ψ), που είναι απαραίτητο για τη συναρμολόγηση του ιού (bin Umair et al., 2022b).

Αδενοσυσχετιζόμενοι ιοί.

Ανήκουν στην οικογένεια των Parvoviridae, είναι μονής αλύσου DNA ιοί χωρίς φάκελο και η αντιγραφή τους εξαρτάται από τους αδενοϊούς ή ερπητοϊούς. Το μικρό τους μέγεθος, η έλλειψη παθογονικότητας τους κάνουν ιδανικούς φορείς διαγονιδίων. Έχουν τακτοποιηθεί 12 ορότυποι ανάλογα με τα συστατικά του καψιδίου τους. Για να χρησιμοποιηθούν ως φορείς το γονιδίωμα τους ανάμεσα στις 2 ITRs αφαιρείται και εισέρχεται το διαγονίδιο (bin Umair et al., 2022b).

Ερπητοϊοί

Είναι ιοί διπλής έλικας DNA, που μπορούν να μεταφέρουν εξωγενές DNA μεγέθους 30 kb

Ιοί ευλογιάς (poxviruses)

Είναι DNA ιοί με φάκελο, πολλαπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα και σαν ογκολυτικοί έχουν αντικαρκινική δράση

Γ.1 β RNA ιοί.

Λεντιϊοί.

Μπορούν να προσβάλλουν το σύστημα ανοσίας του ανθρώπου και να προκαλέσουν χρόνια βλάβη του νευρικού συστήματος

Άλλοι ρετροϊοί .

Είναι ιοί με φάκελο, που περιέχουν 2 αντίγραφα ss RNA, μπορούν να μεταφέρουν διαγονίδια και να προκαλέσουν τη μακροχρόνια έκφραση τους.

Άλφα ιοί

RNA ιοί μονής έλικας, που χρησιμοποιούνται τόσο ως φορείς διαγονιδίων όσο και σε εμβόλια. Έχουν χρησιμοποιηθεί για εμβόλια σε εγκεφαλίτιδα ΖΙΚΑ, σε πυρετό ΛΑССΑ , στη νόσο EBOLA και σε SARS-COVID.

Ιός Newcastle

Ο ιός ανήκει στην οικογένεια των Paramyxoviridae, έχει φάκελο και γένωμα ss RNA . Πολλαπλασιάζεται στο κυταρόπλασμα και έτσι δεν έχει το κίνδυνο να ενσωματωθεί στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή. Ο ιός αυτός χρησιμοποιείται σε εμβόλια, σε ογκολυτικούς και ανοσογονικούς φορείς, σε φορείς γονιδίων.

Picornavirus ιοί

Είναι μικροί, χωρίς φάκελο ιοί με ss RNA και χρησιμοποιούνται σαν φορείς και εμβόλια στην αντικαρκινική θεραπεία καθώς στερούνται ογκογονιδίων και είναι εύκολοι στο χειρισμό λόγω μικρού μεγέθους.

Ιλαράς ιός.

Είναι ιός με φάκελο και γένωμα ss RNA.

Από τη χρήση των ιικών φορέων υπάρχουν ορισμένοι δυνητικοί κίνδυνοι, όπως η εισχωρητική μεταλλαξιγένεση (insertional mutagenesis), η οποία οφείλεται στην τυχαία ενσωμάτωση του θεραπευτικού φορέα στο γονιδίωμα και η οποία μπορεί να προκαλέσει την αδρανοποίησή ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου ή την ενεργοποίηση ενός ογκογονιδίου. Οι ρετροϊοί και οι λεντιϊοί προτιμούν να ενσωματώνονται σε περιοχές πλούσιες σε γονίδια ή και σε κάποια χρωμοσώματα. (Cornetta et al., 2022) Άλλος κίνδυνος είναι η ανοσολογική αντίδραση, η οποία επάγεται από τον ιό ή από το διαγονίδιο (transgene). Οι αδενοϊοί είναι ισχυρά ανοσογονικοί. (Watanabe et al., 2021). Τέλος, υπάρχει και η τοξικότητα από τη χορήγηση τους, αν και η μέχρι τώρα εμπειρία με χιλιάδες ασθενών να λαμβάνουν γενετικά τροποποιημένα κύτταρα έδειξε την ασφάλεια της θεραπευτικής αυτής μεθόδου (Lundstrom, 2023).

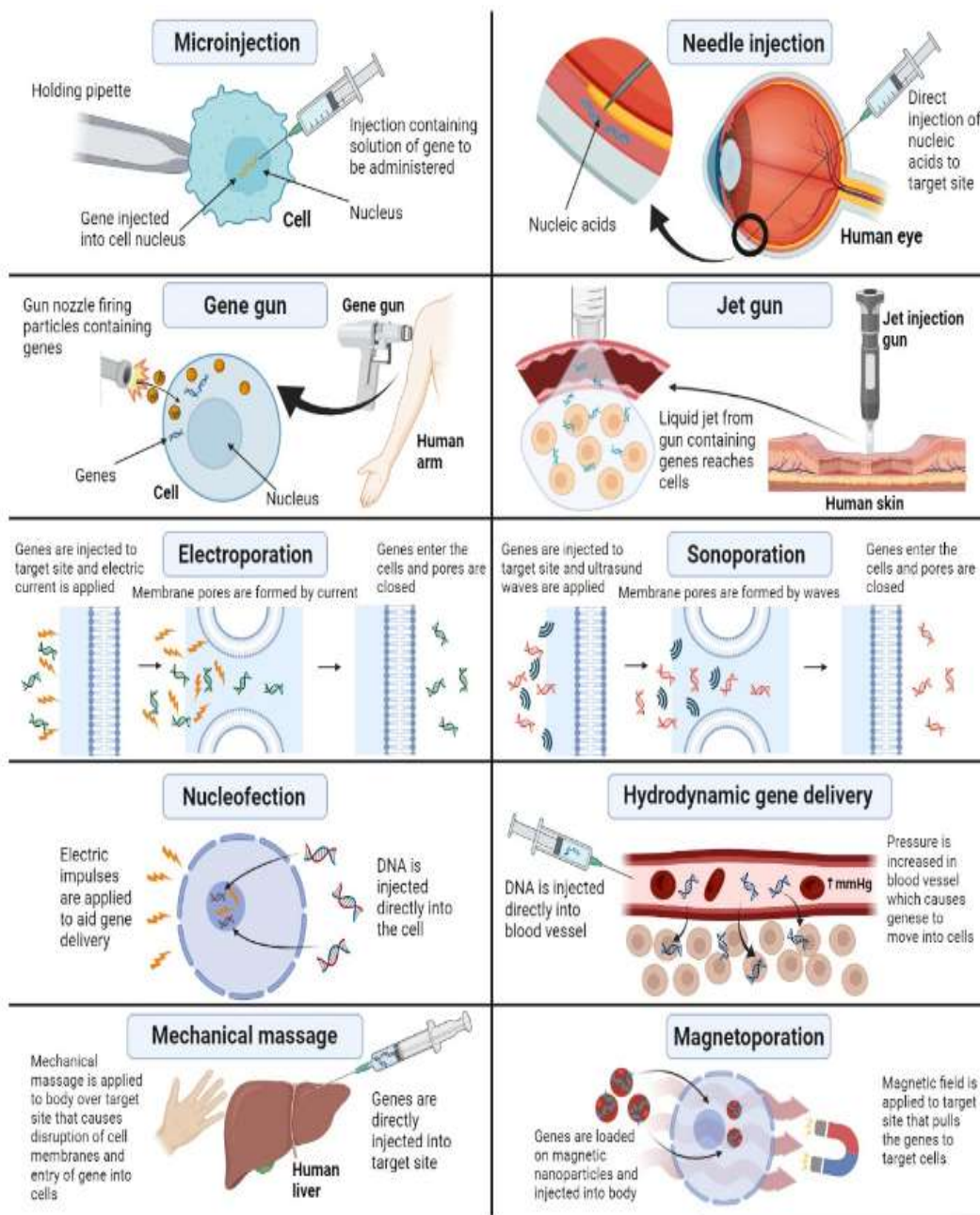
Για την αποφυγή αυτών των κινδύνων έχουν προταθεί διάφορες εναλλακτικές προτάσεις όπως η χρήση φορέων που φέρουν την ελάχιστη ιϊκή πληροφορία για να επιτύχουν επαρκή διαμόλυνση (minimal vectors) (Cornetta et al., 2022), ιϊκοί φορείς στους οποίους έχει γίνει απαλοιφή 299 bp από την 3' LTR και έτσι αποκλείεται η

λειτουργικότητα του ιϊκού υποκινητή και ενισχυτή, ενώ είναι αναγκαίος ένας εσωτερικός υποκινητής για την έκφραση του διαγονιδίου (self-inactivating vectors). Άλλες εναλλακτικές είναι να εισαχθούν στη θεραπευτική κασέτα ιστοειδικοί ή κυτταροειδικοί υποκινητές/ενισχυτές ή να γίνει ενσωμάτωση των ιϊκών φορέων σε ειδική θέση στο γονιδίωμα (site-specific integration) (Cornetta et al., 2022).

Οι μη ιϊκοί φορείς περιλαμβάνουν γυμνό DNA, πλασμίδια, νανοσωμάτια, τρανσποζόνια, εξωσώματα και τεχνητά ανθρώπινα χρωμοσώματα (Roma-rodrigues et al., 2020). Οι μέθοδοι μεταφοράς διακρίνονται σε φυσικές και χημικές. Οι φυσικές περιλαμβάνουν την ένεση με βελόνα (needle and jet injection), hydrodynamic gene transfer, gene gun bombardment, electroporation, sonoporation, magnetoporation. Οι χημικές μέθοδοι χρησιμοποιούν τα νανοσωματίδια, που διακρίνονται σε ανόργανα και οργανικά. Τα ανόργανα νανοσωματίδια περιλαμβάνουν: μεταλλικά (οξείδια χρυσού και σιδήρου), από ασήμι, η προερχόμενα από άνθρακα. Τα οργανικά περιλαμβάνουν τα λιποσώματα και τα πολυμερή. Τα πολυμερή νανοσωματίδια μπορεί να αποτελούνται από chitosan, dextran, dendrimer, polylysine, polyethylysine, polyethyleinimine, PEI (polyethylene). Τέλος βιολογικά νανοσωματίδια θεωρούνται τα εξωσώματα, που εκκρίνονται από τα ίδια τα κύτταρα (Roma-rodrigues et al., 2020).

Γ.2 Μέθοδοι μεταφοράς διαγονιδίων χωρίς τη μεσολάβηση ιών

Οι μέθοδοι αυτοί διακρίνονται σε φυσικές και χημικές. Οι φυσικές μέθοδοι συνοψίζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. Φυσικές μέθοδοι μεταφοράς διαγονιδίων χωρίς τη μεσολάβηση ιών . (Butt et al., 2022)

Μικροένεση -microinjection

Ανακαλύφθηκε από τον Barber και περιλαμβάνει τη χρήση μικρής σύριγγας 0,5-5μm που γεμίζει με το διάλυμα από γενετικό υλικό, το οποίο ενίεται κάτω από μικροσκοπικό έλεγχο σε ένα και μόνο κύτταρο. Είναι οικονομικός , αναπαραγωγίμος σχετικά αποτελεσματικός τρόπος μεταφοράς σχετικά μεγάλου γενετικού υλικού , μη τοξικός

αλλά συνήθως περιορίζεται σε μεγάλου όγκου κύτταρα , όπως τα καρκινικά γιατί η είσοδος μεγάλου όγκου γενετικού υλικού μπορεί να αποδιοργανώσει την κυτταρική μεμβράνη και το ενδοκυττάριο περιβάλλον. Επιπλέον απαιτεί λεπτούς χειρισμούς και εμφανίζει περιορισμένη έκφραση και μικρή επιμονή αυτής (Butt et al., 2022)

Απλή ένεση

Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Wolf και συν με ενδομυϊκή ένεση γυμνού DNA σε μυϊκά κύτταρα ποντικών . Είναι εξαιρετικά απλή μέθοδος και είναι ιδιαίτερα επιτυχής σε ιστούς στόχους, όπως τα κύτταρα του ματιού, του εγκεφάλου και του αίματος. Εκτός από γυμνό DNA μπορεί να εισάγει και διάφορους τύπους RNA, όπως si RNA Είναι μη τοξική, αλλά έχει το μειονέκτημα ότι δεν επιτυγχάνει ισχυρή έκφραση ιδίως σε ενδοφλέβια χορήγηση γυμνού γενετικού υλικού. Αυτό αντιμετωπίζεται με την ανάπτυξη νέων τεχνικών, όπως η υδροδυναμική γονιδιακή μεταφορά (Butt et al., 2022).

Jet gun -πιστόλι

Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται από το 1947 για τη μεταφορά θεραπευτικού ή γενετικού υλικού σε κύτταρα-στόχο. Απαιτείται υψηλή πίεση για την είσοδο και διασπορά του γενετικού υλικού και μπορεί να προκαλέσει ιστική βλάβη, η οποία είναι ανεκτή εφόσον επιτυγχάνεται η μεταφορά και έκφραση του γονιδίου. Η διαδικασία αυτή έχει αποδειχθεί επιτυχής σε πολλούς ιστούς όπως το δέρμα, ο μαστικός αδένας , ο μυϊκός ιστός και ο λιπώδης ιστός . Στην αντικαρκινική θεραπεία έχει βρει εφαρμογή στη θεραπεία αυτοκτονίας και στα γενετικά εμβόλια. Ανεπιθύμητες επιπλοκές είναι λίγες όπως αιμορραγία στο σημείο της ένεσης, υπερθερμία , οίδημα και τοπική φλεγμονή (Butt et al., 2022) .

Γονιδιακό όπλο gene gun

Ονομάζεται και βαλιστική μεταφορά γονιδίου και βαλιστική DNA ένεση . Χρησιμοποιείται για τη μεταφορά γενετικού υλικού σε κύτταρα-στόχους, όπως βλεννογόνων, δέρματος, καρκινικά ή ιστών, που εκτίθενται χειρουργικά. Βαριά μέταλλα όπως χρυσός περιβάλλονται από γενετικό υλικό και στη συνέχεια συμπίεζονται ώστε να περάσουν κυτταρικές μεμβράνες και να εισέλθουν στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα . Η μέθοδος αυτή αν και ασφαλής και άνετη έχει το μειονέκτημα ότι μόνο λίγα μιλιλίτρα γενετικού υλικού μεταφέρονται και έτσι είναι αποτελεσματική κυρίως όταν απαιτείται εντοπισμένη ένεση. Η έκφραση του γονιδίου είναι συνήθως παροδική αλλά οι ερευνητές έχουν αναπτύξει τεχνικές αποτελεσματικής μεταφοράς, μείωσης της βλάβης των ιστών, και μείωσης του χρόνου που απαιτείται

για τη διαδικασία (Butt et al., 2022).

Ηλεκτροδιάτρηση -Electroporation

Χρησιμοποιείται για τη μεταφορά γονιδίων τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* κυρίως για υλικά, που δεν διαπερνούν κυτταρικές μεμβράνες. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα στα κύτταρα -στόχους και δημιουργούνται πρόσκαιροι πόροι, ώστε το αρνητικά φορτισμένο DNA και άλλα γενετικά υλικά να διαπερνούν τους πόρους και να μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Η διάρκεια και η ισχύς των ηλεκτρικών παλμών, που εφαρμόζονται, ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία ηλεκτροδίων για παράδειγμα μικροσύρριγγες και επιθέματα. Η μέθοδος εφαρμόζεται κυρίως για όγκους του δέρματος και του ήπατος. Ωστόσο περιορίζεται σε τοπική θεραπεία και προκαλεί κυτταρική τοξικότητα και καταστροφή (Butt et al., 2022).

Πυρηνοδιάτρηση -nucleofection.

Αποτελεί μορφή ηλεκτροδιάτρησης, η οποία χρησιμοποιεί μια συσκευή τον Nucleofector. Αυτός εφαρμόζει ηλεκτρικό παλμό και προκαλεί πόρους στη κυτταρική μεμβράνη και μέσω των οποίων μεταφέρει το γενετικό υλικό απευθείας στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Δεν απαιτεί πολύ χρόνο και χρειάζεται σχετικά μικρό αριθμό κυττάρων για τη μεταφορά του γονιδίου. Ωστόσο σε κλινικές δοκιμές παρουσίασε υψηλή θνητότητα και είναι ανάγκη να ερευνηθεί η μείωση της τοξικότητας της (Butt et al., 2022).

Υπερηχοδιάτρηση -Sonoporation

Μοιάζει με την ηλεκτροδιάτρηση αλλά χρησιμοποιεί υπερήχους για τη δημιουργία πόρων στην κυτταρική μεμβράνη και τη μεταφορά του γενετικού υλικού στο κυτταρόπλασμα. Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι είναι μη επεμβατική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο σε τοπική όσο και σε πιο εν τω βάθει θεραπεία (Butt et al., 2022).

Υδροδυναμική γονιδιακή μεταφορά

Έχει παρατηρηθεί ότι μετά από ένεση διαλύματος DNA ίσο με 8% του βάρους του σώματος με πολύ γρήγορο ρυθμό στη φλέβα της ουράς των ποντικών πετυχαίνει την έκφραση του διαγονιδίου σε ήπαρ, πνεύμονες, καρδιά και νεφρούς. Η πίεση που ασκείται με την ένεση δημιουργεί πόρους στις κυτταρικές μεμβράνες και επιτρέπει το γενετικό υλικό να εισέλθει ενδοκυτταρικά. Η μέθοδος έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε τρωκτικά αλλά στον άνθρωπο τα αποτελέσματα είναι περιορισμένα. Επιπλέον η

υψηλή πίεση που ασκείται στα ηπατοκύτταρα μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία των ηπατικών ενζύμων και καρδιακή και ηπατική συμφόρηση, όταν μεγάλοι όγκοι γενετικού υλικού ενίονται. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν καθετήρες για να μεταφέρουν γονίδια σε μεγάλα ζώα, όπως γουρούνια, αλλά στους ανθρώπους απαιτείται ακόμη πολύ έρευνα (Butt et al., 2022).

Μαγνητοδιάτρηση -magnetoporation

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ένα μαγνητικό πεδίο, που οδηγεί το γενετικό υλικό μέσω μεμβρανών στο κυτταρόπλασμα. Το μαγνητικό πεδίο επιδρά πάνω σε φορείς, που βασίζονται σε νουκλεϊνικά οξέα συνδεδεμένα με μαγνητικά νανοσωματίδια. Οι φορείς αυτοί σχεδιάζονται ώστε να αποτελούνται από πολυμερή ή λιπίδια και μαγνητικά νανοσωματίδια. Συνήθως χρησιμοποιούνται οξείδια σιδήρου, που προσδίδουν μαγνητικές ιδιότητες στα νανοσωματίδια. Για τη μεταφορά του διαγονιδίου στα κύτταρα-στόχο χρησιμοποιείται ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο.

Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου σε σχέση με την ηλεκτροδιάτρηση είναι ότι δεν απαιτούνται ηλεκτρόδια σε επαφή με τα κύτταρα -στόχο, που την κάνει λιγότερο επεμβατική και καλά ανεκτή. Είναι λιγότερο ακριβή, χρονοβόρα και μπορεί να διεισδύσει σε εν τω βάθει ιστούς και ανατομικές περιοχές, που δεν φθάνει η ηλεκτροδιάτρηση. Μεταφορά γονιδίων έχει επιτευχθεί σε καρδιακού ιστούς, καρκινικά κύτταρα, μελάνωμα και σε πνευμονικές μεταστάσεις (Butt et al., 2022).

Μηχανικό μασάζ -mechanical massage

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε μόνο σε μικρά ζώα, όπως ποντίκια και όχι στον άνθρωπο. Συνίσταται στη εφαρμογή μηχανικής πίεσης στο σημείο της ένεσης γυμνού DNA σε ηπατοκύτταρα ποντικών. Η πίεση προκαλεί βλάβη στις μεμβράνες και έτσι το γενετικό υλικό μπορεί να εισέλθει ενδοκυτταρικά. Η διαδικασία αυτή χορήγησης παράγοντα αύξησης ηπατοκυττάρων είχε θεραπευτικά αποτελέσματα σε τελική ηπατική ανεπάρκεια από ενδοτοξίνες (Butt et al., 2022).

Γ.3 Νανοσωματίδια.

Οι ιικοί φορείς παρουσιάζουν ορισμένους περιορισμούς όπως εισχωρητική μεταλλαξιγένεση, ανοσογονικότητα, μειωμένη εκλεκτικότητα και ικανότητα μεταφοράς γεγονός το οποίο οδήγησε στην ανάπτυξη εναλλακτικών συστημάτων μεταφοράς, τα νανοσωματίδια. Τα νανοσωματίδια χρησιμοποιούν την παθοφυσιολογία

του καρκινικού ιστού, που χαρακτηρίζεται από φτωχή λεμφική αγγείωση και πλούσια νεοαγγείωση, που επιτρέπει στα νανοσωματίδια να διεισδύσουν στο εσωτερικό του όγκου με παθητική διάχυση. Η κατασκευή των νανοδομών αυτών με βιοσυμβατά διαφορετικά μακρομόρια, όπως PEG και στοχεύουσες οντότητες π.χ. αντισώματα προάγει την εκλεκτική δράση τους στα καρκινικά κύτταρα μειώνοντας την τοξικότητα τους (Roma-rodrigues et al., 2020) Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται τα νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται σαν φορείς, τα πλεονεκτήματά τους και τα μειονεκτήματά τους

Πίνακας 2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των διαφόρων νανοσωματιδίων. (Roma-rodrigues et al., 2020)

Composition	Advantages	Disadvantages	Ref
Inorganic Nanoparticles			
Metallic (Gold, iron)	Multiple forms (spherical, nanorods, triangles) Biocompatibility Tunable size Straightforward functionalization	More information about uptake, biocompatibility and low cytotoxicity are required for clinical translation	[1]
Silica	The structure could add high amounts of drugs and genes Tunable pore size	More information about cytotoxicity, biodistribution and biocompatibility are required for clinical translation	
Carbon-derived	Large surface area High loading capacity Vast numbers of possibilities for surface modification	Few in vivo studies developed	[1]
Organic nanoparticles			
Lipid-base (Liposomes)	Low toxicity Biodegradable Can transport hydrophobic and hydrophilic molecules	Moderate loading capacity Could crystallize after prolonged storage conditions	[1]
Polymeric	Biodegradable properties Good tissue penetration Ease manipulation	Non-degradable polymers tend to accumulate in tissues Promote allergic reactions In vivo metabolism and elimination routes are not elucidated	
Biological nanoparticles *			
Exosomes	Reduced immune response Protection of circulating genetic material Possibility of cell targeting	Limited transfection efficiency	

Ανόργανα νανοσωματίδια.

Χρησιμοποιούνται ευρέως ως φορείς φαρμάκων, πρωτεϊνών και γονιδίων εξαιτίας της καλής ανοχής στα βιολογικά συστήματα, του χαμηλού κόστους και της ευκολίας στην κατασκευή τους.

Μεταλλικά νανοσωματίδια

Εξαιτίας των πλεονεκτημάτων, που παρουσιάζει στην αντιμετώπιση της φλεγμονής,

της λοίμωξης και της φυματίωσης ο χρυσός χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην κατασκευή νανοσωματιδίων (AuNPs) Αυτά κατασκευάζονται εύκολα με διακριτά πρωτόκολλα (το πιο συνηθισμένο η αναγωγή του HAuCl_4) σε διαφορετικά μεγέθη και σχέδια. Τα AuNPs μπορούν να περιέχουν νέα φάρμακα και συστατικά, γεγονός που αυξάνει την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων και τη μείωση του όγκου. Ο Coelho και συν ανέπτυξαν ένα νανοςύστημα μεταφοράς φαρμάκων βασισμένο σε pegylated AuNPs, που φορτώνεται με doxorubicin και varlitinib έναντι καρκίνου του παγκρέατος. Ο Peng και συν ανέπτυξαν ένα σύστημα για τη συνδυασμένη μεταφορά γονιδίων και αντιμικροβιακών παραγόντων σε AuNPs προς μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (Roma-rodrigues et al., 2020).

Τα AuNPs είναι ιδανικά για τη μεταφορά νουκλεϊνικών οξέων γιατί χάρη σε στερεοχημική παρεμπόδιση τα νουκλεϊνικά οξέα προστατεύονται από τις νουκλεάσες. Χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη γονιδιακή θεραπεία χάρη στη χαμηλή τοξικότητα τους, τον αυξημένο χρόνο ημίσειας ζωής, την αποτελεσματική και επιλεκτική γονιδιακή αποσιώπηση και τη δυνατότητα να περιέχουν μεγάλα φορτία. Άλλα ανόργανα νανοσωματίδια, που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή θεραπεία είναι τα νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου -iron oxide nanoparticles –(IONS) και τα υπερμαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίων του σιδήρου (SPIONS). Και στις δυο περιπτώσεις τα νανοσωματίδια ανακατανέμονται στον οργανισμό μετά από εφαρμογή μαγνητικού πεδίου. Και αυτά εμφανίζουν χαμηλή τοξικότητα, ευκολία στην τροποποίηση, χαμηλό κόστος και αποτελεσματική βιοαποδόμηση. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι παρασκευής τους.

Νανοσωματίδια σιλικόνης

Παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, όπως η μεγάλη επιφάνεια εξαιτίας της δημιουργίας καναλιών και η ικανότητα φόρτωσης τόσο νουκλεϊνικών οξέων όσο και φαρμάκων. Ο Bhakta και συν κατασκεύασαν νανοσωματίδια, που περιέβαλαν DNA και στη συνέχεια διεμόλυναν in vitro κυτταρικές σειρές, όπως COS-7 και 293T με επιτυχία. Ωστόσο ο Muragadose και συν έδειξε ότι τα νανοσωματίδια σιλικόνης εμφανίζουν τοξικότητα και προφλεγμονώδη δράση με ενεργοποίηση των μακροφάγων, γεγονός που μειώνει τις πιθανότητες χρήσης τους σαν φορείς γενετικού υλικού (Roma-rodrigues et al., 2020).

Νανοσωματίδια που προέρχονται από άνθρακα.

Τα νανοσωματίδια αυτά εξαιτίας της μεγάλης τους επιφάνειας μπορούν να μεταφέρουν

μεγάλα ποσά γενετικού υλικού.

Μια άλλη ομάδα νανοσωματιδίων είναι αυτά που κατασκευάζονται από γραφίτη και στα οποία για τη σύνθεση τους χρησιμοποιείται PEI ή PEG με σκοπό να μειωθεί η τοξικότητα τους

Οργανικά νανοσωματίδια.

Νανοσωματίδια βασιζόμενα σε λιπίδια

Τα νανοσωματίδια από λιπίδια αποτελούνται από πολλά συστατικά όπως φωσφολιπίδια, χοληστερόλη, ιονισμένα λιπίδια και ένα PEGylated λιπίδιο. Στην αγορά κυκλοφορούν περίπου 50 νανοφαρμακευτικά προϊόντα με τα λιπιδικά νανοσωματίδια να είναι τα πιο διαδεδομένα ως φορείς φαρμάκων. Υπάρχουν δυο κατηγορίες τα λιποσωματίδια και τα λιπιδικά νανοσωματίδια (Dogbey et al., 2023b).

Τα λιποσωματίδια μπορούν να μεταφέρουν φάρμακα και γενετικό υλικό στην υδροφοβική ή υδροφιλική περιοχή τους ανάλογα με τις ιδιότητες των μακρομορίων που μεταφέρουν. Τελευταία στην παρασκευή των λιποσωματιδίων προσκολλάται φολικό οξύ στα φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και πεπτίδια πριν το τελικό σχηματισμό τους. Η πιο κοινή χρήση τους είναι να μεταφέρουν DNA μέσα στα κύτταρα. Για να αυξηθεί η διαμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιούνται και μηχανικές μέθοδοι όπως οι υπέρηχοι (Roma-rodrigues et al., 2020).

Λιπιδικά νανοσωματίδια -Lipid nanoparticles

Το Onpatro ήταν το πρώτο λιπιδικό νανοσωματίδιο, που περιείχε si RNA και εγκρίθηκε κλινικά για τη θεραπεία της κληρονομικής μέσω transthyretin μεσολαβούμενης αμυλοείδωσης. Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα λιπιδικά νανοσωματίδια αποτελούνται από 3β(1-(N1,N1-dimethylaminoethane)carbomoylcholesterol) (DC-CHOL) ή dimirystyloxypropyl 3 dimethyl hydroxyethyl ammonium DMRIE ή dioleoyl phosphatidylethanolamine DOPE. Επίσης έχουν αναπτυχθεί κατιονικά λιπιδικά νανοσωματίδια όπως το DODAP (1,2 dioleoyl 3 dimethyl ammonium propane) τα οποία μπορούν να μεταφέρουν μεγάλα φορτία αρνητικά φορτισμένων νουκλεϊνικών οξέων. Άλλα κατιονικά λιπιδικά νανοσωματίδια όπως DOTMA ((N-[1-(2,3-dioleoyloxy) propyl]-N,N,N-trimethylammonium methylsulfate) και DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane) δείχνουν μεγαλύτερη σταθερότητα αλλά και δυσκολία στην απελευθέρωση του γενετικού υλικού.

Συμπαγή λιπιδικά νανοσωματίδια -solid lipid nanoparticles.SLNs

Είναι κρυσταλλικές δομές με ένα λιπιδικό πυρήνα και αμφιφυλικό περίβλημα. Αυτά

που βασίζονται σε τριγλυκερίδια μοιάζουν με τα αιμοπετάλια στο σχήμα ενώ τα μονοστεατικά έχουν σχήμα σφαιρικό. Στην παρασκευή τους συμμετέχουν υδρογωνοποιημένα λιπίδια όπως Lubritab™, Dynasan™ P60, Sterotex™ HM, ή Lipo™ σταθεροποιημένα από γαλακτωματοποιητές όπως Pluronic F 68 και F 127.

Πολυμερή νανοσωματίδια

Έχουν χρησιμοποιηθεί ως συστήματα μεταφοράς χάρη στη δυνατότητα χημικής τροποποίησης τους. Τα κατιονικά πολυμερή αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με τα νουκλεϊνικά οξέα και σχηματίζουν polyplexes. Για να δράσουν ως συστήματα μεταφοράς πρέπει να πληρούν ορισμένα κριτήρια, όπως η ικανότητα συμπίκνωσης του φορτίου των νουκλεϊνικών οξέων σε σωματίδια κατάλληλης διάστασης για να μπορούν να εισαχθούν στα κύτταρα των ιστών-στόχων. Επιπλέον θα πρέπει να προστατεύουν τα νουκλεϊνικά οξέα από βλαπτικά συστατικά του οργανισμού, να διευκολύνουν την ενδοσωμική τους διαφυγή και τη μεταφορά τους στα κύτταρα - στόχο. Τέλος θα πρέπει να είναι βιοαποδομήσιμα, μη τοξικά, μη ανοσογονικά. Καθώς ένα μόνο πολυμερές δεν μπορεί να πληροί όλα αυτά τα κριτήρια προστίθενται επιπλέον συστατικά κατά την παρασκευή των polyplexes (Kanvinde et al., 2022).

Η σύνδεση των νουκλεϊνικών οξέων στο πολυμερές εξαρτάται από τη χημική του δομή δηλαδή 1) το φορτίο των ομάδων, 2) τον τύπο της φορτισμένης ομάδας (πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή, τεταρτοταγή) 3) το βαθμό διακλαδώσεων στο πολυμερές. Η συγκέντρωση, η ιοντική ισχύς και η διαδικασία σχηματισμού των Polyplex επηρεάζει τη συγγένεια των πολυμερών με τα νουκλεϊνικά οξέα. Για τα διάφορα νουκλεϊνικά οξέα επιλέγονται κάθε φορά διαφορετικά πολυμερή γιατί τα οξέα διαφέρουν στο μοριακό βάρος, τις ομάδες φορτίων και τη θέση δράσης (Kanvinde et al., 2022).

Τα κατιονικά πολυμερή έχουν θετικά φορτία και αλληλοεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα νουκλεϊνικά οξέα σχηματίζοντας σύμπλοκα, τα οποία έχουν μικρότερο μέγεθος και λιγότερη αποδόμηση από τα άλλα πολυμερή. Άλλα πολυμερή είναι βιοπολυμερή, που συντίθενται από κελουλόζη, φύκια ή άμυλο. Αυτά τα πολυμερή έχουν καλές μηχανικές ιδιότητες, χαμηλή τοξικότητα, εξαιρετική βιοδιαθεσιμότητα και βιοαποδόμηση. Ωστόσο είναι λιγότερο αποτελεσματικά από άλλα συστήματα μεταφοράς (Roma-rodrigues et al., 2020). Τα επόμενης γενιάς πολυμερή έχουν δομή διακλάδωσης σε μια προσπάθεια να περιλάβουν μεγαλύτερα φορτία νουκλεϊνικών οξέων και με μεγαλύτερη ικανότητα διαμόλυνσης. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα PAMAM και PEI νανοσωματίδια.

Φορείς βασισμένοι σε PAMAM -polyamidoamine particles.

Τα PAMAM δένδρομερή είναι δομές από επαναλαμβανόμενες μονάδες αμινών και αμιδίων, που επαναλαμβάνονται και εμφανίζουν διακλαδώσεις. Χρησιμοποιούνται σαν φορείς νουκλεϊνικών οξέων χάρη στην ικανότητα τροποποίησης της δομής τους, στην εμφάνιση ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με νουκλεϊνικά οξέα, στην υδρόφιλη φύση τους, στη βιοδιαθεσιμότητα τους, στην ομοιομορφία των μακρομορίων τους και στη στενή κατανομή του βάρους τους. Έχουν παραχθεί πολλές γενιές PAMAM δένδρομερών. Οι πιο πρόσφατες γενιές παρουσιάζουν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα μεταφοράς γονιδίων αλλά και τοξικότητα. Οι στρατηγικές δημιουργίας PAMAM την τελευταία δεκαετία έχουν ως εξής:

- 1) χωρίς καμία αλλαγή στην επιφάνεια
- 2) αλλαγή στην επιφάνεια με PEG, αντισώματα κλπ.
- 3) σε συμπλοκα με άλλα λιποσωματίδια ή νανοσωματίδια
- 4) με υπερμακρομοριακά νανοσωματίδια, που αυτοσυναρμολογούνται (Kanvinde et al., 2022).

Φορείς βασισμένοι σε πολυαιθλενιμίνη -polyethylenimine PEI

Το 1997 ο Baker και συν χρησιμοποίησαν PEI με σκοπό να συμπυκνώσουν πλασμιδιακό DNA με απλό και φθινό τρόπο. Οι φορείς από PEI μπορεί να είναι με διακλαδώσεις (branched) bPEIs ή να είναι γραμμικοί (linear) και να μεταφέρουν DNA, RNA και ολιγονουκλεοτίδια ONs. Τα bPEIs μεγάλου μοριακού βάρους ήταν πιο σταθερά και προκαλούσαν μεγαλύτερη διαμόλυνση. Αλλά δύσκολα περνούσαν τις κυτταρικές μεμβράνες γεγονός που ξεπεράστηκε με χρήση μικρού μοριακού βάρους bPEIs και αύξησης της συγκέντρωσης του πολυμερούς (Kanvinde et al., 2022). Τα PEI/DNA polyplexes είναι πιο σταθερά από τα PEI/si RNA polyplexes. Ο πιθανός λόγος είναι ότι οι αλληλεπιδράσεις PEI/DNA είναι περισσότερες από ότι αυτές PEI/siRNA.

Φορείς συνθετικών πολυμερών.

Αυτά είναι βιοδιασπώμενα και έτσι λιγότερο τοξικά από άλλα πολυμερή, τα οποία μετά τη χορήγηση τους δεν μπορούν να αποβληθούν από τα κύτταρα. Τα πιο συνηθισμένα είναι PGA, PLGA και PLA. Τα PLGA έχουν πάρει έγκριση από το FDA.

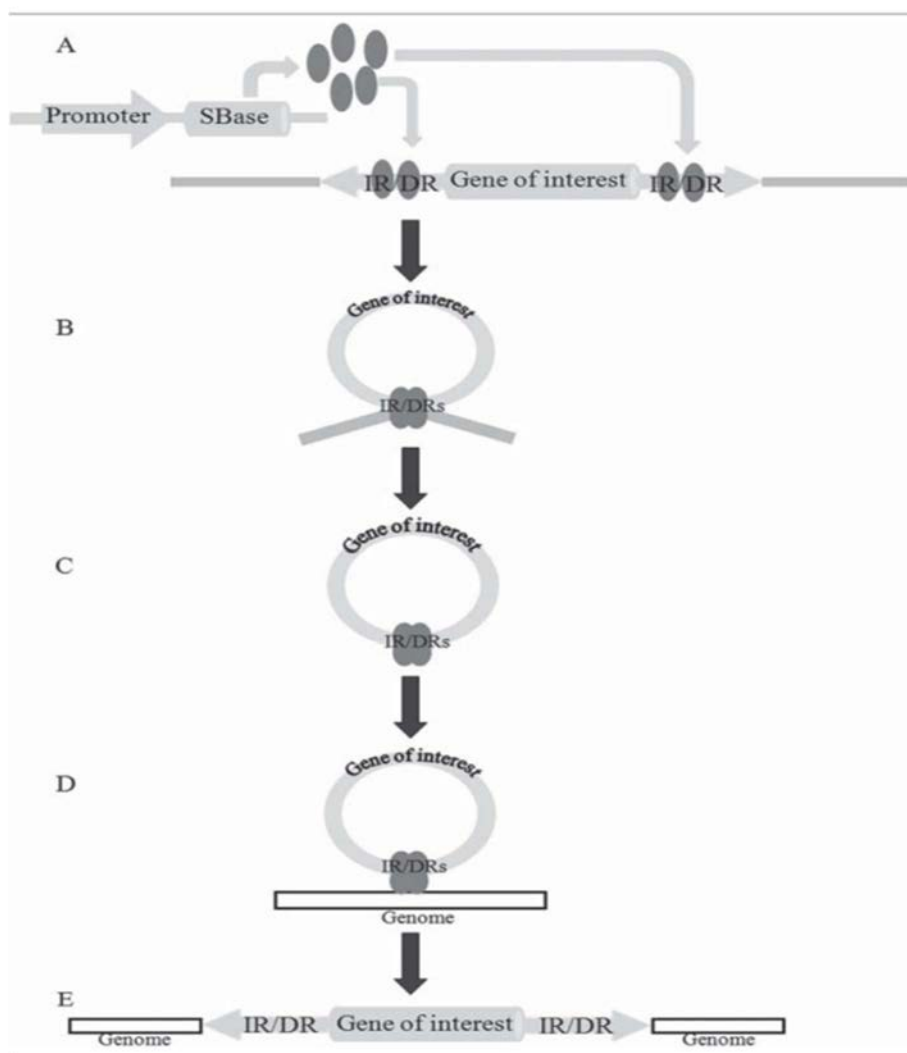
Πολυκατιονικά δραστικά φάρμακα

Αποτελούνται από ένα πολυκατιονικό κορμό στον οποίο προσκολλούνται πολυμερή φαρμάκων, τα οποία περιέχουν πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες και με

αλληλεπιδράσεις φορτίων μπορούν και μεταφέρουν νουκλεϊνικά οξέα.

Γ.4 Τρανσποζόνια

Τα τρανσποζόνια είναι τμήματα DNA, που έχουν την ικανότητα να μετακινούνται εύκολα από μια θέση στην άλλη μέσα στα γονιδιώματα, που τα φιλοξενούν. Ο μηχανισμός δράσης τους εξαρτάται από ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, που κωδικοποιεί ένα ένζυμο την τρανσποζάση και από δύο υψηλά διατηρημένες εξελικτικά αλληλουχίες στα δύο άκρα της τρανσποζάσης. Τα περισσότερα τρανσποζόνια έχουν χαρακτηριστικές ανάστροφες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα δυο άκρα του τρανσποζονίου IRs (inverted repeats)(Εικόνα 3). Η μετακίνηση των τρανσποζονίων επιτυγχάνεται μέσω ενός μονοπατιού κοπής και συρραφής (cut -and-paste), στο οποίο προκαλούνται ρήξεις της διπλής έλικας (double- strand -breaks) και στα δύο άκρα του τρανσποζονίου με σκοπό να απελευθερώσει το τρανποζόνιο από τη θέση δότη-πέψη (excision), γεγονός ,που ακολουθείται από την είσοδο του τρανσποζονίου σε θέση στόχο -ενσωμάτωση (Integration). Η πέψη απαιτεί την κοπή κάθε έλικας DNA και στα δύο άκρα του τρανσποζονίου, ενώ η ενσωμάτωση βασίζεται στο σχηματισμό νέων φωσφοδιεστερικών δεσμών ανάμεσα στα άκρα του τρανσποζονίου και στις αλυσίδες του DNA -στόχου, χωρίς την πρόκληση DSBs Τα περισσότερα τρανσποζόνια προκαλούν διμερή στις θέσεις στόχους κατά το σχηματισμό των δεσμών με το DNA-στόχο.



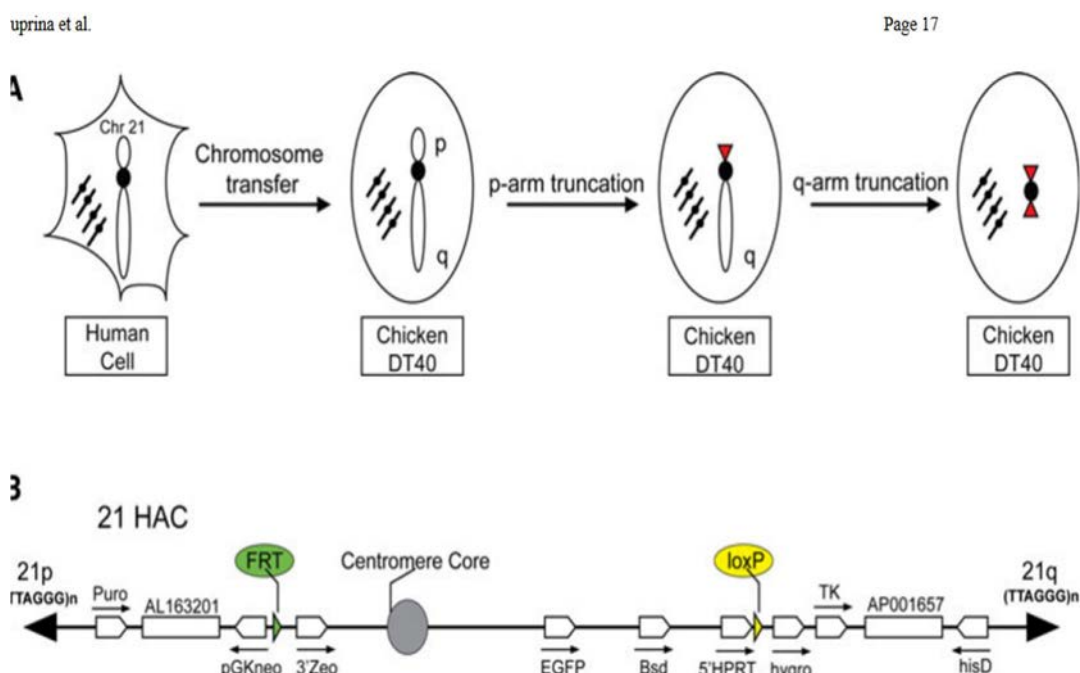
Εικόνα 3 :Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η διαδικασία μεταφοράς του επιθυμητού γονιδίου στο γονιδίωμα του ξενιστή μέσω κοπής και συρραφής. Α) Η τρανσποζάση, της οποίας η έκφραση επάγεται από τον υποκινητή, αναγνωρίζει και συνδέεται στις IR/DR αλληλουχίες του τρανσποζονίου. Β) Σχηματίζεται το σύμπλοκο γονιδίου-τρανποζονίου. Γ) Τα τετραμερή της τρανσποζάσης κόβουν τις αλληλουχίες του δότη ανάμεσα στις θέσεις IR/DR. Δ) Το επιθυμητό γονίδιο ενσωματώνεται ξανά στο γονιδίωμα (Schmitz & Querques, 2024).

Γ.5 Τεχνητά χρωμοσώματα

Τα τεχνητά χρωμοσώματα περιέχουν ένα λειτουργικό κεντρομερίδιο, γεγονός, που τους προσδίδει πλεονεκτήματα ως συστημάτων μεταφοράς γονιδιακής θεραπείας. Πρώτον, μπορεί να διατηρηθούν σταθερά χωρίς να ενσωματωθούν στα χρωμοσώματα του

ξενιστή κυττάρου και αυτό επιτρέπει την μακροχρόνια έκφραση του θεραπευτικού γονιδίου. Δεύτερον, δεν υπάρχει όριο ως προς το μέγεθος του θεραπευτικού γονιδίου και μπορεί να μεταφέρουν ολόκληρους γενετικούς τόπους με τις ρυθμιστικές περιοχές τους. Τρίτον, μπορούν να μεταφέρονται από κύτταρο σε κύτταρο. Τέλος δεν προκαλούν ανοσοαντιδράσεις ή μεταμόρφωση transformation των κυττάρων αφού δεν έχουν ιϊκό γενετικό υλικό (Kouprina et al., 2013).

Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για την παρασκευή των τεχνητών χρωμοσωμάτων, η top-down και η bottom-up. Η top-down προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή τεχνητών χρωμοσωμάτων όπως 21, X, Y και 14 (Kouprina et al., 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρασκευή του 21 χρωμοσώματος όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.

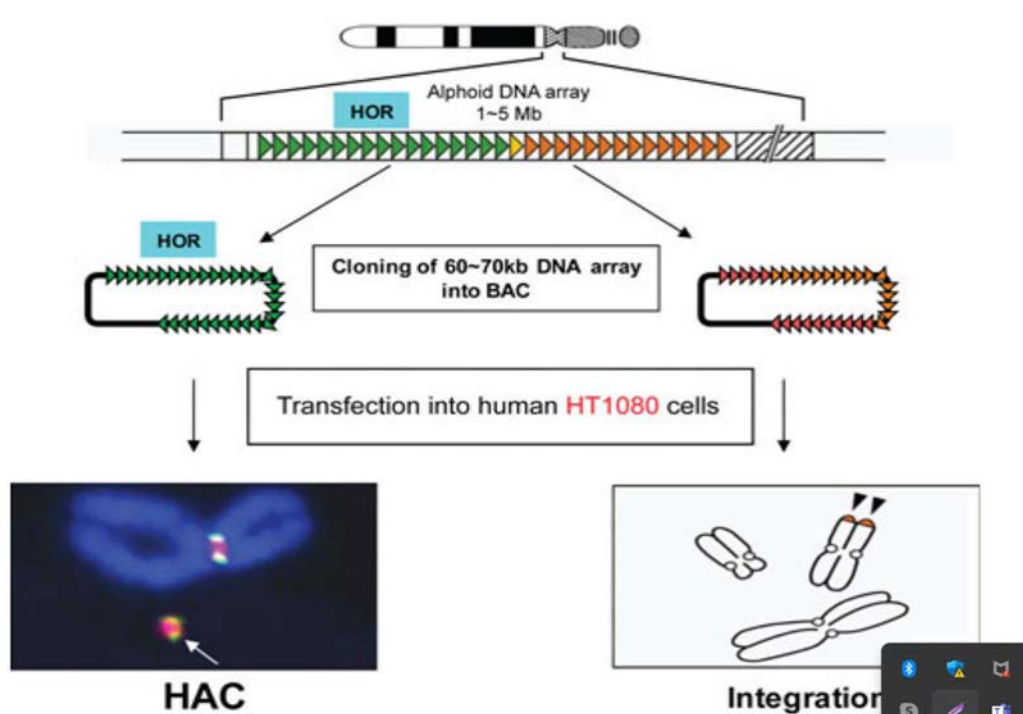


Εικόνα 4 Α. Το χρωμόσωμα 21 μεταφέρεται σε κύτταρα όρνιθας υψηλά ανασυνδυασμένα DT40 από ανθρώπινα κύτταρα. (Kouprina et al., 2013)

Στη συνέχεια αποκόπτονται οι βραχίονες p και q και έτσι προκύπτει το τεχνητό χρωμόσωμα HAC. Κατά την αποκοπή αυτή σχηματίζεται μια θέση φόρτωσης του γονιδίου loxP στο HAC στα κύτταρα DT40. Το HAC μεταφέρεται σε ωοκύτταρα κινέζικων ινδικών χοιριδίων chinese hamster ovary cells (CHO) (hprt-/-) και κατόπιν το επιθυμητό γονίδιο -θεραπευτικό κλωνοποιείται στη θέση loxP του HAC μέσω της μεσολάβησης της Cre-loxP. Έτσι το HAC με το θεραπευτικό γονίδιο μπορεί να μεταφερθεί στα κύτταρα δέκτες μέσω μιας τεχνικής που λέγεται micro-cell-mediated

technique. Β. Χάρτης γραμμικού 21 HAC φορέα. Για την αποκοπή του χρωμοσώματος 21 χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές TEL/Δq his D και TEL/Δp -PGK-puro. Οι περιοχές AL 163201 και AP 001657 παραμένουν περικεντρικά στο HAC. Οι κασέτες 5' HPRT loxP hiG Tk και pgKneo-FRT-3' -Zeo, που περιέχουν τις θέσεις ενσωμάτωσης των γονιδίων loxP και FRT αντίστοιχα περιλαμβάνονται στο HAC με ομόλογο ανασυνδυασμό. Η ενσωμάτωση μέσω Cre-loxP του γονιδίου συνοδεύεται από ανακατασκευή του HPRT γονιδίου, ενώ η ενσωμάτωση μέσω του FLP-FRT του γονιδίου συνοδεύεται από ανακατασκευή του Zeo γονιδίου. Το HAC 21 μαρκάρεται από το γονίδιο EGFP.

Τα HAC παρασκευάζονται επίσης και με την μέθοδο bottom-up. Κατά τη διαδικασία αυτή τα τεχνητά χρωμοσώματα αναπτύχθηκαν με διαμόλυνση κυττάρων ινοσαρκώματος ανθρώπου 1080, είτε με DNA high order repeat (HOR) είτε με συνθετικό α-δορυφορικό alphoid DNA, το οποίο κλωνοποιείται σε κυκλικό βακτηριακό DNA BAC ή σε γραμμικό DNA ζυμομύκητα YAC. Σε όλες τις περιπτώσεις η παρασκευή του HAC ακολουθείται από πολυμερισμό του DNA, που εισάγεται κατά 20-30 φορές. Η τεχνική παρασκευής HAC με τη μέθοδο bottom-up φαίνεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Το κεντρομερίδιο που υπάρχει σε κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από high-order-repeats και diverged alphoid repeats (Kouprina et al., 2013)

Στην αρχή κλωνοποιείται μια συστοιχία από HOR DNA 30-200 Kb σε μορφή BAC .Ακολουθεί διαμόλυνση σε κύτταρα ινoσαρκώματος HT 1080 . Το HAC σχηματίζεται μετά από πολυμερισμό του BAC DNA μέχρι 1-5 Mb. Οι συστοιχίες με υψηλά diverged alphoid repeats ενσωματώνονται τυχαία στα ανθρώπινα χρωμοσώματα και επειδή δεν διαθέτουν CENP-B boxes δεν σχηματίζουν HAC (Kouprina et al., 2013). Τα HACs έχουν τις ακόλουθες εφαρμογές: γονιδιακή και κυτταρική θεραπεία, μελέτες του κινητοχώρου, παραγωγή βιοφαρμακευτικών πεπτιδίων, παραγωγή αντικαρκινικών φαρμάκων, διαγνωστική δοκιμή για CIN σε καρκινικά κύτταρα, έλεγχος για περιβαλλοντικά χημικά μεταλλαξιγόνα, παραγωγή iPS κυττάρων, εφαρμογές στη συνθετική βιολογία (Kouprina et al., 2013).

Η γονιδιακή θεραπεία με HACs διακρίνεται σε *in vivo* και *ex-vivo* .Στην *in-vivo* γυμνά HACs ή μέσα σε μικύλλια ενίονται στον ασθενή . Στην *ex-vivo* υπάρχουν δύο εκδοχές Στη μία λαμβάνονται ινοβλάστες από τον ασθενή, που διαμολύνονται με HAC καλλιεργούνται ,επάγονται σε iPs και διαφοροποιούνται σε ειδικά βλαστοκύτταρα, που μεταμοσχεύονται στον ασθενή . Στην άλλη εκδοχή λαμβάνονται απο τον ασθενή ειδικά βλαστοκύτταρα (HSC, MSC, MAB, mGS κύτταρα), που επιδιορθώνονται με HAC διαφοροποιούνται *in vitro* και μεταμοσχεύονται στον ασθενή (Kouprina et al., 2013).

Γ.6 Γονιδιωματική επιδιόρθωση -genome editing

Ένας άλλος τρόπος γονιδιακής θεραπείας είναι η τροποποίηση του γονιδιώματος - genome- editing.

Αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι στοχευμένες ρήξεις της διπλής έλικας του DNA double-strand breaks επάγουν τους κυτταρικούς επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, δηλαδή τα δύο κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια, τον ομόλογο ανασυνδυασμό HDR και την μη ομολογό σύνδεση των τελικών άκρων NHEJ non-homologous end joining. Τα σηματοδοτικά αυτά μονοπάτια είναι ορατά στην Εικόνα 6.

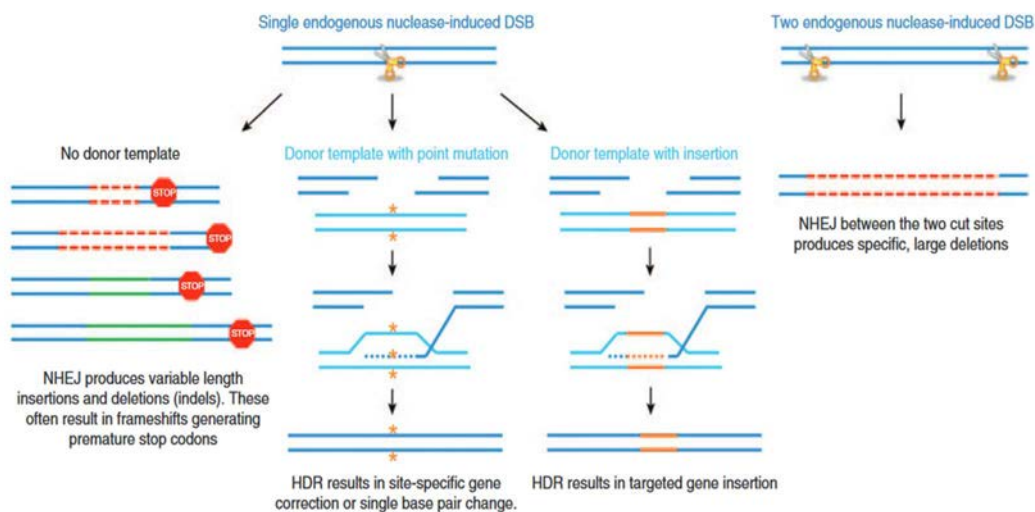


Figure 1 Mechanisms of double-strand break repair.

Εικόνα 6: Μηχανισμοί επιδιόρθωσης της ρήξης διπλής έλικας (Azhagiri et al., 2021a).

Ο μηχανισμός NHEJ οδηγεί σε ποικίλες εισχωρήσεις ή ελλείψεις (indels), οι οποίες προκαλούν την εμφάνιση πρόωρων κωδικονίων λήξης. Ενώ ο μηχανισμός HDR οδηγεί σε επιδιόρθωση γονιδίων σε ειδικές θέσεις ή αλλαγές σε μια μόνο βάση (Azhagiri et al., 2021a). Αυτό συμβαίνει επειδή στον HDR η επιδιόρθωση γίνεται με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων χρησιμοποιώντας τη μια άλυσιο-αδελφή χρωματίδα ή αλυσίδα-δότη, που λειτουργεί σαν πρότυπο-μήτρα, ενώ στο NHEJ γίνεται τυχαία με συγκόλληση των δύο τελικών άκρων, οπότε αυτός είναι επιρρεπής σε λάθη, όπως ελλείψεις ή εισχωρήσεις.

Ο μηχανισμός NHEJ μπορεί να προκαλέσει knock out ενός γονιδίου προκαλώντας μεταλλάξεις του πλαισίου ανάγνωσης. Αυτό συμβαίνει όταν η θέση στόχος της νουκλεάσης εντοπίζεται στην κωδικοποιητική περιοχή του γονιδίου. Αυτός ο μηχανισμός χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία της μυϊκής δυστροφίας DMD, στη θεραπεία της Huntington, του AIDS και άλλων ιογενών και μικροβιακών νοσημάτων (Uddin et al., 2020). Επίσης μπορεί να προκαλέσει την εξάλειψη ενός ολόκληρου γονιδίου στοχεύοντας σε 2 θέσεις και προκαλώντας εξάλειψη μεγέθους πολλών μεγαβάσεων. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία αιμοσφαιρινοπάθειων με την εξάλειψη της περιοχής BCL11A, η οποία είναι ενισχυτής της ερυθροποιητικής σειράς (Finotti & Gambari, 2023). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε στη θεραπεία της

DMD(Findlay & Wehl, 2022).

Ο μηχανισμός HDR είναι ενεργός στις φάσεις G2 και S του κυτταρικού κύκλου και μπορεί να προκαλέσει την επιδιόρθωση ενός γονιδίου. Χρησιμοποιεί την αδελφό χρωματίδα για να διορθώσει το DNA αλλά μπορεί να χρησιμοποιήσει και μια εξωγενή αλληλουχία ως πρότυπο επιδιόρθωσης. Ο συνδυασμός ενός φορέα της κατάλληλης εξωγενούς αλληλουχίας με μια νουκλεάση, που στοχεύει στις κατάλληλες θέσεις DSBs επιτρέπει την τροποποίηση του DNA μέσω της μεσολάβησης του HDR(Azhagiri et al., 2021a). Ως δότες DNA έχουν χρησιμοποιηθεί πλασμίδια αλλά τελευταία και ολιγονουκλεοτίδια με μέγεθος μέχρι 80 βάσεων, που μπορούν να χρησιμεύσουν σαν πρότυπα- μήτρες στον HDR. Όταν η διαμόλυνση των κυττάρων είναι δύσκολη μπορεί να χρησιμεύσουν κατάλληλοι ιικοί φορείς όπως μη-ενσωματούμενοι ιοί λεντιϊοί και αδενοσυσχετιζόμενοι ιοί AAV (Dogbey et al., 2023a).

Ο ομόλογος ανασυνδυασμός HDR, που επάγεται από DSBs, οι οποίες προκαλούνται από νουκλεάσες, που στοχεύουν σε θέσεις, που παρουσιάζουν ομολογία με το διαγονίδιο, που θέλουμε να εισάγουμε επιτρέπει την εισαγωγή του γονιδίου σε συγκεκριμένη θέση (Azhagiri et al., 2021b). Έτσι αποφεύγεται ο κίνδυνος της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης, καθώς το διαγονίδιο εισάγεται σε κατάλληλη θέση-στόχο. Για να επιτύχουμε τη συνεχή έκφραση του διαγονιδίου πρέπει να εισάγουμε ένα άγριο τύπο του γονιδίου (wild type), ο οποίος περιέχει και τον υποκινητή του γονιδίου (Allen et al., 2023). Μπορούμε να επιτύχουμε την εισαγωγή ενός διαγονιδίου μέσω του μηχανισμού NHEJ προκαλώντας συμβατές προεξοχές ανάμεσα στο DNA δότη και δέκτη, έτσι ώστε το DNA του διαγονιδίου να εισαχθεί στη θέση στόχο (Allen et al., 2023).

Πρωταρχικός είναι ο ρόλος των κατάλληλων νουκλεάσεων και στους δυο μηχανισμούς. Υπάρχουν τέσσερις πλατφόρμες, που εισάγουν στοχευμένες DSBs σε θέσεις στόχους: οι νουκλεάσες δακτυλίου του ψευδαργύρου -zinc finger nucleases ZFNs-, οι transcription-activator-like effector (TALE) nucleases, οι μεγανουκλεάσες και το σύστημα CRISPR/Cas.

Γ.6 α Μεγανουκλεάσες

Οι μεγανουκλεάσες αναγνωρίζουν 14-40 ζεύγη βάσεων, περισσότερα από ό,τι τα περιοριστικά ένζυμα και έχουν δυο τύπους I-SceI και I-CreI. Είναι μιτοχονδριακά ένζυμα και ανήκουν στην οικογένεια των LAGLIDADG ενδονουκλεασών. Οι φυσικές

μεγανουκλεάσες δρουν σαν κινητά γενετικά στοιχεία και εισάγουν ιντρόνια σε θέσεις-στόχους αφού προκαλέσουν σπασίματα της διπλής αλυσού του DNA (Zheng et al., 2020). Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι φυσικές μεγανουκλεάσες είναι λίγες θα πρέπει να σχεδιασθούν τεχνητές μεγανουκλεάσες, αλλά αυτή η διαδικασία είναι χρονοβόρα και με υψηλό κόστος, έτσι η χρήση τους στην κλινική πράξη είναι περιορισμένη (Petraitytė et al., 2021)

Ωστόσο το 2021 η εταιρεία Presition Biosciences εφαρμόζοντας την τεχνολογία της ARCUS (βασιζόμενη στη γονιδιωματική επιδιόρθωση με μεγανουκλεάσες) διεξήγαγε μια κλινική δοκιμή για να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια της αλλογενούς χρήσης CART cells για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος και ανθεκτικού non-Hodgkin λεμφώματος (Petraitytė et al., 2021).

Γ.6 β Zinc -finger ενδονουκλεάσες (ZFNs)

Παράγονται από τη σύντηξη της περιοχής, που προκαλεί τη διάσπαση του DNA cleavage domain της περιοριστικής ενδονουκλεάσης FokI με την ειδική για την πρόσδεση στο DNA zinc -finger πρωτεΐνη . ZFN έχει 3 zinc δακτυλίους και κάθε ένας αναγνωρίζει 3 ζεύγη βάσεων στην αλληλουχία του DNA. Η ZFN προκαλεί μια ρήξη της διπλής αλυσού του DNA στο γονιδίωμα και επάγει τον ομόλογο ανασυνδυασμό ή τη μη ομόλογη συνένωση των άκρων. Σε φυσιολογικά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα ο NHEJ επιδιορθώνει το 75% των DSBs και ο HDR το 25% (Belete, 2021).Αν η ZFN δεν είναι ειδική για το στόχο μπορούν να συμβούν σπασίματα εκτός στόχου, γεγονός που προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο.

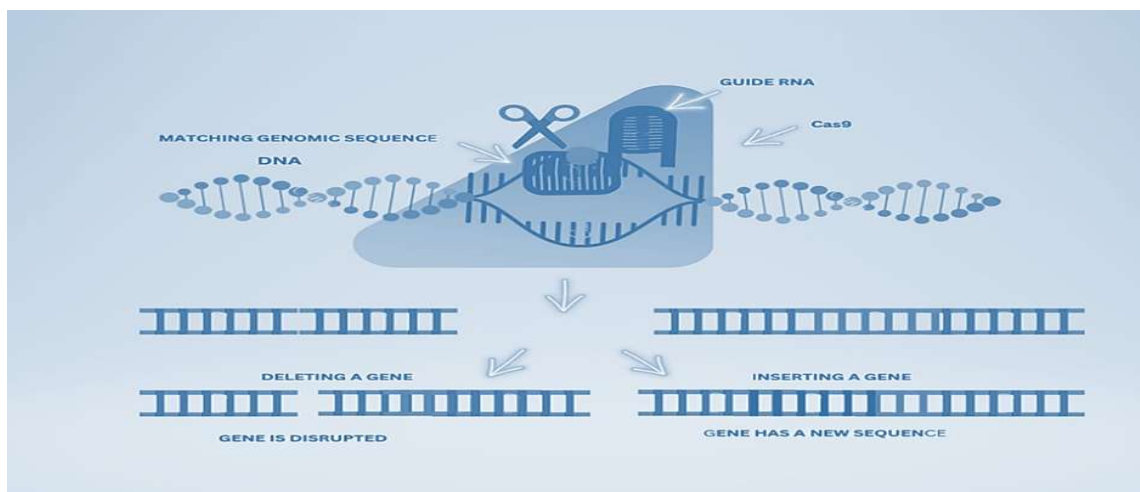
Γ.6 γ TALEN-ενδονουκλεάσες (Transcription Activator-like Effector Nucleases)

Είναι τεχνητές ενδονουκλεάσες, που προκύπτουν από τη συνένωση δύο τμημάτων: μιας ενδονουκλεάσης FokI και μιας περιοχής σύνδεσης στο DNA-στόχο. Η περιοχή πρόσδεσης στο DNA έχει μια επαναλαμβανόμενη μονάδα από 33-35 συντηρημένα αμινοξέα . Στις θέσεις 12 και 13 διαθέτει υπερμεταβλητά αμινοξέα, που καθορίζουν και την ειδική αναγνώριση των νουκλεοτιδίων. Οι TALEN προκαλούν DSBs στις οποίες τα κύτταρα απαντούν με τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς NHJE και HDR

(Belete, 2021).

Γ.6 δ CRISPER-CAS 9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9)

Είναι ένας επίκτητος φυσικός αμυντικός μηχανισμός, καθοδηγούμενος από RNA, στα αρχαιοβακτήρια και στα βακτήρια, έναντι των πλασμιδίων και των βακτηριοφάγων. Περιλαμβάνει ένα οδηγό RNA(22bp) , συμπληρωματικό στην αλληλουχία DNA-στόχο, που μεταφέρει την Caspase 9 στο DNA στόχο , όπου αυτή προκαλεί DSB και το κύτταρο επιδιορθώνει τη βλάβη με NHEJ ή με HDR. Το RNA οδηγός έχει τη μορφή ενός διπλού συμπλόκου , αποτελούμενο από ειδικό για το στόχο CRISPR RNA (cr RNA) και universal trans-activating CRISPR RNA (tracr RNA) . Με την καθοδήγηση του g RNA η Cas 9 προκαλεί DSB ανοδικά 4-5 bp της αλληλουχίας PAM (Protospacer adjacent motif). Η PAM είναι πολύ σημαντική για την αναγνώριση από τη Cas 9 της θέσης πρόσδεσης στο DNA και συγχρόνως προφυλάσσει το σύστημα CRISPR από τη δράση της Cas 9 (Ates et al., 2020). Στην παρακάτω εικόνα 7 φαίνεται ο μηχανισμός δράσης του CRISPR CAS 9

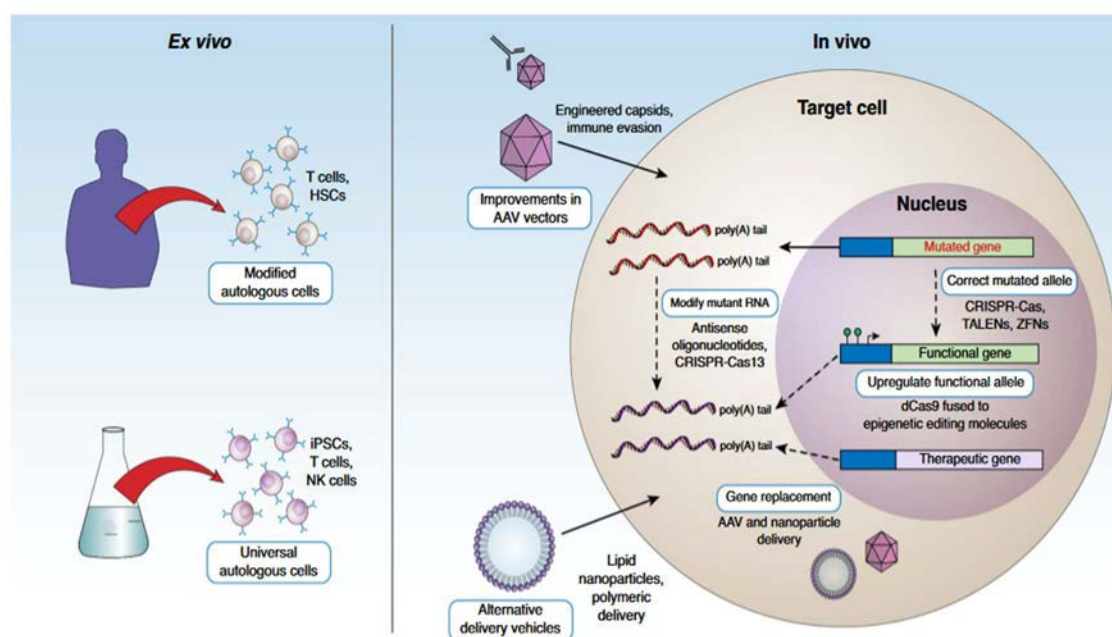


Εικόνα 7. Μηχανισμός δράσης CRISPR/CAS (Rabaan A.A. et al,2023)

Σε σύγκριση με τις άλλες προγραμματιζόμενες ενδονουκλεάσες Μεγανουκλεάσες , TALEN, ZFNs έχει αρκετά πλεονεκτήματα καθώς εμφανίζει υψηλότερη αποτελεσματικότητα , ευκολία στην κατασκευή και δεν απαιτεί πολύ χρόνο για να σχεδιασθεί, η αναγνώριση του στόχου γίνεται με αλληλεπίδραση RNA-DNA και όχι

πρωτεΐνης και DNA και επιπλέον με τη χρήση πολλών RNA -οδηγών έχει τη δυνατότητα πολλαπλής στόχευσης. Τα κύρια μειονεκτήματα αφορούν τα εκτός στόχου αποτελέσματα, που μπορεί να είναι συχνά και την εξάρτηση από την PAM αλληλουχία (Z. Liu et al., 2023)

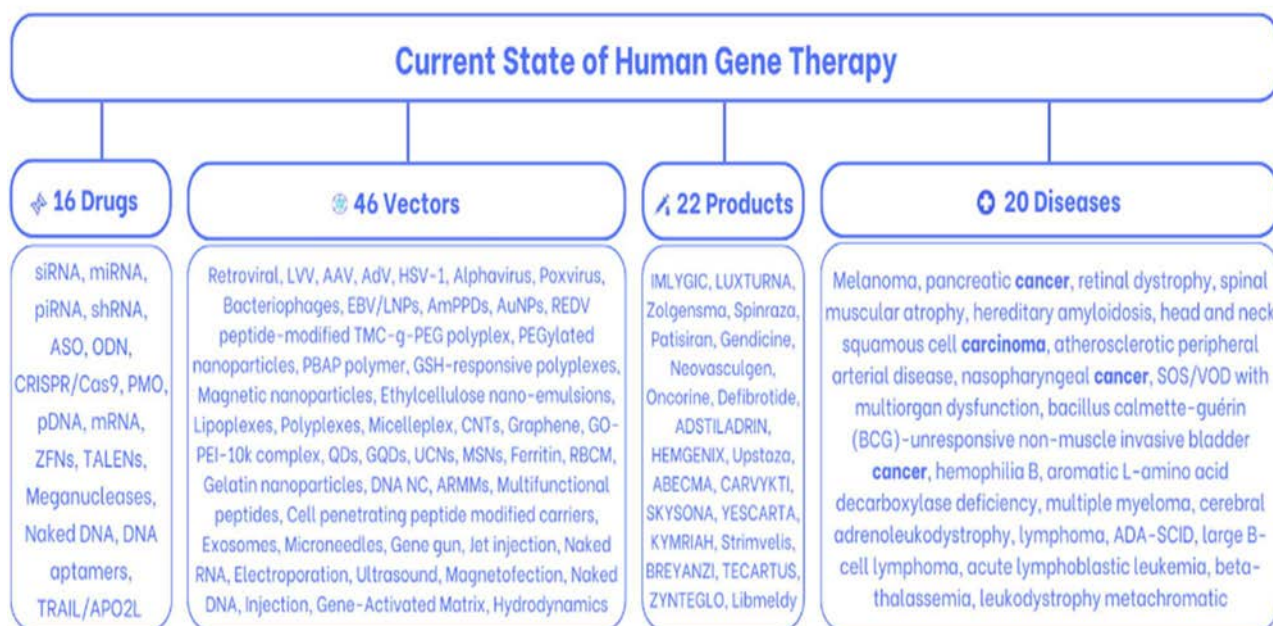
Όπως έχει λεχθεί παραπάνω για την πραγματοποίηση της γονιδιακής θεραπείας απαραίτητα είναι ένα σύστημα μεταφοράς-φορέα και το θεραπευτικό γονίδιο-διαγονίδιο-. Η γονιδιακή θεραπεία διακρίνεται σε *in vivo* και *ex-vivo*. Στην *in vivo* το σύμπλοκο φορέα και διαγονιδίου χορηγείται στον ασθενή απευθείας με ενδοφλέβια ή ενδομυϊκή ένεση ή απευθείας στο όργανο-στόχο. Στην *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία γίνεται απομόνωση αυτόλογων κυττάρων απευθείας από τον ασθενή και τροποποιούνται γενετικά για να προκαλέσουν ένα θεραπευτικό αποτέλεσμα, ενώ αλλογενή κύτταρα μπορεί να παραχθούν και στο εργαστήριο (Bulaklak & Gersbach, 2020).(Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Αριστερά η *ex vivo* γονιδιακή θεραπεία και δεξιά η *in vivo* γονιδιακή θεραπεία (Bulaklak & Gersbach, 2020).

Γ.7 Παρούσα κατάσταση της γονιδιακής θεραπείας.

Η παρούσα κατάσταση της γονιδιακής θεραπείας στον άνθρωπο φαίνεται στην Εικόνα 6 και περιλαμβάνει 16 φάρμακα, 46 φορείς, 22 προϊόντα, που θεραπεύουν 20 νοσήματα (Shchaslynyi et al., 2023).



Εικόνα 9. Η σημερινή κατάσταση της γονιδιακής θεραπείας στον άνθρωπο (Shchaslynyi et al., 2023)

Όλες οι μορφές γονιδιακής θεραπείας έχουν δοκιμασθεί στον καρκίνο και αυτό γιατί ο καρκίνος ξεκινά από μια πρώτη μετάλλαξη και στην συνέχεια χαρακτηρίζεται από συσσώρευση μεταλλάξεων, τάση για διείσδυση και μεταστάσεις, νεοαγγειογένεση και αποφυγή της ανοσοαπόκρισης και καταστροφής (Kontomanolis et al., 2020). Όλες αυτές οι ιδιότητες είναι χαρακτηριστικές των καρκινικών κυττάρων και οφείλονται στο φλεγμονώδες μικροπεριβάλλον του όγκου TME. Πολλές φορές αυτό αποτελεί και την αιτία, που οι μέχρι σήμερα συμβατικές θεραπείες όπως η χειρουργική θεραπεία, η ακτινοθεραπεία και η ανοσοθεραπεία έχουν αποτύχει ή εμφανίζουν αντίσταση στη θεραπεία ή επιπλοκές (Schirmacher, 2019). Όλα τα παραπάνω κάνουν επιτακτική την ανάγκη για μια πιο αποτελεσματική θεραπεία, που θα στοχεύει μόνο στα καρκινικά κύτταρα-στόχο, θα παρακάμπτει την αντίσταση στη θεραπεία και την πιθανότητα εμφάνισης δευτερογενούς καρκίνου (Schirmacher, 2019). Αυτή την εναλλακτική λύση έρχεται να υπηρετήσει η γονιδιακή θεραπεία.

Δ. Στρατηγικές Θεραπείας

Δ.1 Αντικατάσταση ογκοκατασταλτικών γονιδίων

Η αντικατάσταση γονιδίου μπορεί να επιτευχθεί με επιδιόρθωση γενετικών μεταλλάξεων στον άγριο-τύπο του γονιδίου, με διατήρηση της σταθερής και συνεχούς έκφρασης του γονιδίου καθώς με γονιδιακή μεταγωγή. TP53, Rb, PTEN, BRCA1/2 και Check-inhibitors είναι τα κύρια ογκοκατασταλτικά γονίδια (Y. Liu et al., 2015).

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 παίζει βασικό ρόλο στην απόπτωση, στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση του DNA, στη γήρανση ή/και στην αυτοφαγία και για αυτό αποτελέσσε στόχο της αντικαρκινικής γονιδιακής θεραπείας (Roma-rodrigues et al., 2020). Το TP53 είναι το πιο συχνά μεταλλαγμένο γονίδιο σε καρκίνους του ανθρώπου. Περίπου το 80% των μεταλλάξεων είναι δυσερμήνευτες μεταλλάξεις. Αν και ο βασικός μηχανισμός των μεταλλάξεων είναι η απώλεια λειτουργικότητας αρκετές εμφανίζουν επικερδή λειτουργικότητα. (X. Chen et al., 2022). Το γονίδιο TP53 κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, του οποίου τα επίπεδα διατηρούνται χαμηλά μέσω αποδόμησης του από το πρωτεάσωμα, η οποία καθοδηγείται από την E3 ουμπικιτίνη λιγάση MDM2, που είναι ο βασικός αναστολέας της πρωτεΐνης p53. Επιπλέον ο p53 αναστέλλεται και από ένα άλλο παράγοντα MDM4 γνωστό και ως MDMX (Hassin & Oren, 2023).

Οι βασικές θεραπευτικές στρατηγικές στην αντικαρκινική θεραπεία με στόχο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Trp53 περιλαμβάνουν:

α) αναστολείς MDM2 και MDM4 που μπλοκάρουν την ανασταλτική δράση αυτών και επιτρέπουν την ογκοκατασταλτική δράση του p53 με αποτέλεσμα την απόπτωση και την αναστολή της αύξησης των καρκινικών κυττάρων, εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια έναντι του MDMX mRNA

β) συστατικά που επανενεργοποιούν τη μεταλλαγμένη p53

γ) heat-shock πρωτεΐνη 90 (Hsp90) που σταθεροποιεί την p53 και εμποδίζει την αποδόμηση της

δ) γονιδιακές θεραπείες (Brown et al., 2022).

Η πρώτη γονιδιακή θεραπεία που εφαρμόστηκε στην κλινική πράξη για τον καρκίνο είχε σαν στόχο το p53. Το φάρμακο ονομάζεται gendicine και παρασκευάστηκε από την εταιρεία SiBiono Gene Technologies, εγκρίθηκε από τον εθνικό οργανισμό

φαρμάκων της Κίνας και κυκλοφόρησε το 2003 για τη θεραπεία του καρκίνου κεφαλής τραχήλου. Ήταν ένας ανασυνδυασμένος αδενοϊός, που περιείχε το γονίδιο TP53 (Roma-rodrigues et al., 2020). Συγκεκριμένα πρόκειται για ένα εξασθενημένο ανασυνδυασμένο αδενοϊό, που του έχει αφαιρεθεί η περιοχή E1 (ογκοπρωτεΐνη του αδενοϊού) και έχει αντικατασταθεί από μια κασσέτα, που εκφράζει την άγριου τύπου ανθρώπινο TP53 (Gendicine Review - Search Results - PubMed, n.d.). Το rAd-p53 συνδέεται σε ειδικούς υποδοχείς για αδενοϊούς και ιούς coxsackie στην επιφάνεια των κυττάρων του όγκου, εισέρχεται με ενδοκύττωση στο εσωτερικό των κυττάρων και οδηγεί στην υπερέκφραση της p53, που ασκεί ογκοκατασταλτική δράση και μείωση του όγκου. Επιπλέον ενεργοποιεί τα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα εναντίον των κυττάρων του όγκου και τα NK-κύτταρα να ασκήσουν αντικαρκινικές επιδράσεις <<bystander effects>>. Η χορήγηση του γίνεται με απευθείας ένεση στον όγκο ή με ενδοκοιλιακή ή ενδαγγειακή χορήγηση. Το gendicine έχει δοκιμασθεί στην κλινική πράξη για πολλούς τύπους καρκίνου στην Κίνα με καλά αποτελέσματα (Hassin & Oren, 2023) ειδικά σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Οι καρκίνοι στους οποίους έχει κυρίως χρησιμοποιηθεί είναι καρκίνος του ήπατος, των πνευμόνων, των ωοθηκών και του μαστού (Gendicine Review - Search Results - PubMed, n.d.). Άλλες θεραπείες βασισμένες σε αδενοϊούς ως φορείς του γονιδίου TP53 όπως το advexin και το SCH-58500 αν και έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα δεν πέρασαν στην κλινική πράξη (Y. Liu et al., 2015).

Η ανακάλυψη νέων πιο βελτιωμένων ιϊκών φορέων θα επιτρέψει τη χρήση της p53 για περισσότερες μορφές καρκίνου με μεγαλύτερη επιτυχία. Ένας εναλλακτικός τρόπος μεταφοράς της p53 είναι τα νανοσωματίδια, τα οποία προκαλούν λιγότερες ανοσομεσολαβούμενες αντιδράσεις -μικρότερη ανοσογονικότητα- και επιπλέον αυξάνεται ο χρόνος κυκλοφορίας τους στο αίμα. Καθώς χορηγούνται ενδοφλεβίως σε αντίθεση με το gendicine, που χορηγείται συνήθως με ένεση απευθείας στον όγκο δρούν καλύτερα σε μεταστάσεις. Για παράδειγμα ένα κατιονικό λιπόσωμα SGT-53, που αναπτύχθηκε από την εταιρεία SynerGene Therapeutics και μεταφέρει ένα άγριου τύπου γονίδιο TP53 και στρέφεται έναντι των καρκινικών κυττάρων μέσω ενός αντισώματος μοναδικής αλυσού αντιτρανσφερρίνης, ευαισθητοποίησε τα κύτταρα γλοιοβλαστώματος στο temozolomide τόσο in vitro όσο και in vivo και βελτίωσε την επιβίωση σε ένα ζωϊκό μοντέλο γλοιοβλαστώματος. Σε κλινική δοκιμή φάσης I 11 ασθενείς λάβανε αντίστοιχη θεραπεία με SGT-53. Οι ασθενείς αυτοί έπασχαν από

διάφορες μορφές μεταστατικών συμπαγών όγκων. Οι 7 από τους 11 είχαν σταθεροποίηση της νόσου κατά την εκτίμηση μετά από 6 εβδομάδες (Hassin & Oren, 2023).

Μια άλλη εναλλακτική γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνει τη χορήγηση mRNA της p53 μέσω νανοσωματιδίων, η οποία έδειξε καλά αποτελέσματα σε ζωϊκό μοντέλο μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε ποντίκια ιδίως με συγχορήγηση mTOR αναστολέων (Hassin & Oren, 2023).

Ένας σημαντικός προβληματισμός αφορά στη διατήρηση του θεραπευτικού αποτελέσματος της p53, γεγονός που εξαρτάται από την κατάσταση των κυττάρων του όγκου σε σχέση με την έκφραση της p53. Καρκινικά κύτταρα με μηδενική έκφραση της p53 ανταποκρίνονται καλύτερα αλλά αποτελούν συνήθως μια μειονότητα. Τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα έχουν μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου ή δυσερμήνευτες μεταλλάξεις. Έτσι μπορεί να συσσωρευτούν μεταλλαγμένη p53, η οποία να εξουδετερώνει τη δράση της εισαγόμενης αγρίου τύπου p53. Είναι ενδιαφέρον, ότι μια μετανάλυση ασθενών με υποτροπιάζον HNSCC, που έλαβαν γονιδιακή θεραπεία με αδενοϊό -p53 έδειξε ότι όλοι όσοι ανταποκρίθηκαν είχαν μια φτωχή χρώση σε ανοσοϊστοχημεία και καθόλου δυσερμήνευτες μεταλλάξεις (Hassin & Oren, 2023).

Απαιτούνται περισσότερες έρευνες για να αποδείξουν και να επεκτείνουν τη χρησιμότητα της γονιδιακής θεραπείας με αντικατάσταση ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

Δ.2 Αποσιώπηση ογκογονιδίων

Αυτό επιτυγχάνεται με τη στοχευμένη μεταφορά siRNA-αντινοσηματικού συμπληρωματικού RNA στα καρκινικά κύτταρα, όπου το siRNA συνδέεται με την πρωτεΐνη TAR RNA binding protein και το ένζυμο αργοναύτη 2 (ARGO 2) και σχηματίζεται το συμπλόκο RISC (RNA induced silencing complex). Μετά το σχηματισμό του RISC η μια RNA αλυσίδα αποδομείται και απομακρύνεται ενώ η άλλη ζευγαρώνει με το συμπληρωματικό mRNA και επάγει την αποδόμηση του από το ένζυμο ARGO 2 (Antisense Oligonucleotides: A Novel Frontier in Pharmacological Strategy - Search Results - PubMed, n.d.).

Ανάμεσα στο πιο γνωστά ογκογονίδια, που ενέχονται στον καρκίνο του ανθρώπου είναι το myc, ένας μεταγραφικός παράγοντας, που συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές

διεργασίες, siRNA, που καταστέλλει το c-myc γονίδιο είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του όγκου σε μελάνωμα ανθρώπου (Das et al., 2015). Μεταλλάξεις του K-ras ογκογονιδίου είναι συχνές σε καρκίνο του κόλου, αντιονηματικό RNA οδηγεί σε μείωση της αύξησης του όγκου και απόπτωση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε ζώϊκά μοντέλα (Das et al., 2015). Ένα άλλο γονίδιο το οποίο έχει αποσιωπηθεί επιτυχώς είναι το γονίδιο πολυφαρμακευτικής αντίστασης multi drug resistance 1 MDR1.

Τα siRNA έχουν επιλεκτική δράση και δεν αλληλεπιδρούν με το χρωμοσωμικό DNA, έτσι υπάρχει μικρότερος κίνδυνος εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης. Είναι εξαιρετικά ειδικά για τα γονίδια-στόχους, δεν προκαλούν πολυφαρμακευτική αντίσταση και γενικά έχουν χαμηλή τοξικότητα. Όσον αφορά στη χορήγηση τους, μπορούν να χορηγηθούν απευθείας στον όγκο ή συστηματικά με ενδοφλέβια ή ενδαρτηριακή χορήγηση. Σε συστηματική χορήγηση ωστόσο μπορεί να υποστούν αποδόμηση από ένζυμα, ή να αποβληθούν μέσω νεφρικής κάθαρσης ή να φαγοκυτταρωθούν. Για αυτό έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές για ξεπεράσουν αυτά τα εμπόδια. Κύριες προκλήσεις στη siRNA θεραπεία είναι η μείωση των εκτός στόχου αποτελεσμάτων, η αύξηση της εξειδίκευσης στο στόχο, η αποφυγή της καταστροφής στην κυκλοφορία των siRNAs, η βελτίωση της ενδοκυττάριας μεταφοράς και της διαφυγής από το ενδόσωμα (Romero-rodrigues et al., 2020).

Παραδείγματα συστηματικής χορήγησης περιλαμβάνουν τη χορήγηση CALAA-01 (Calando Pharmaceuticals) σε κλινική δοκιμή σε ασθενείς με κακήθες μελάνωμα και ALN-VSPOI (Alnylam Pharmaceuticals) σε ασθενείς με καρκίνο του ήπατος και συμπαγείς όγκους (Kobelt et al., 2022).

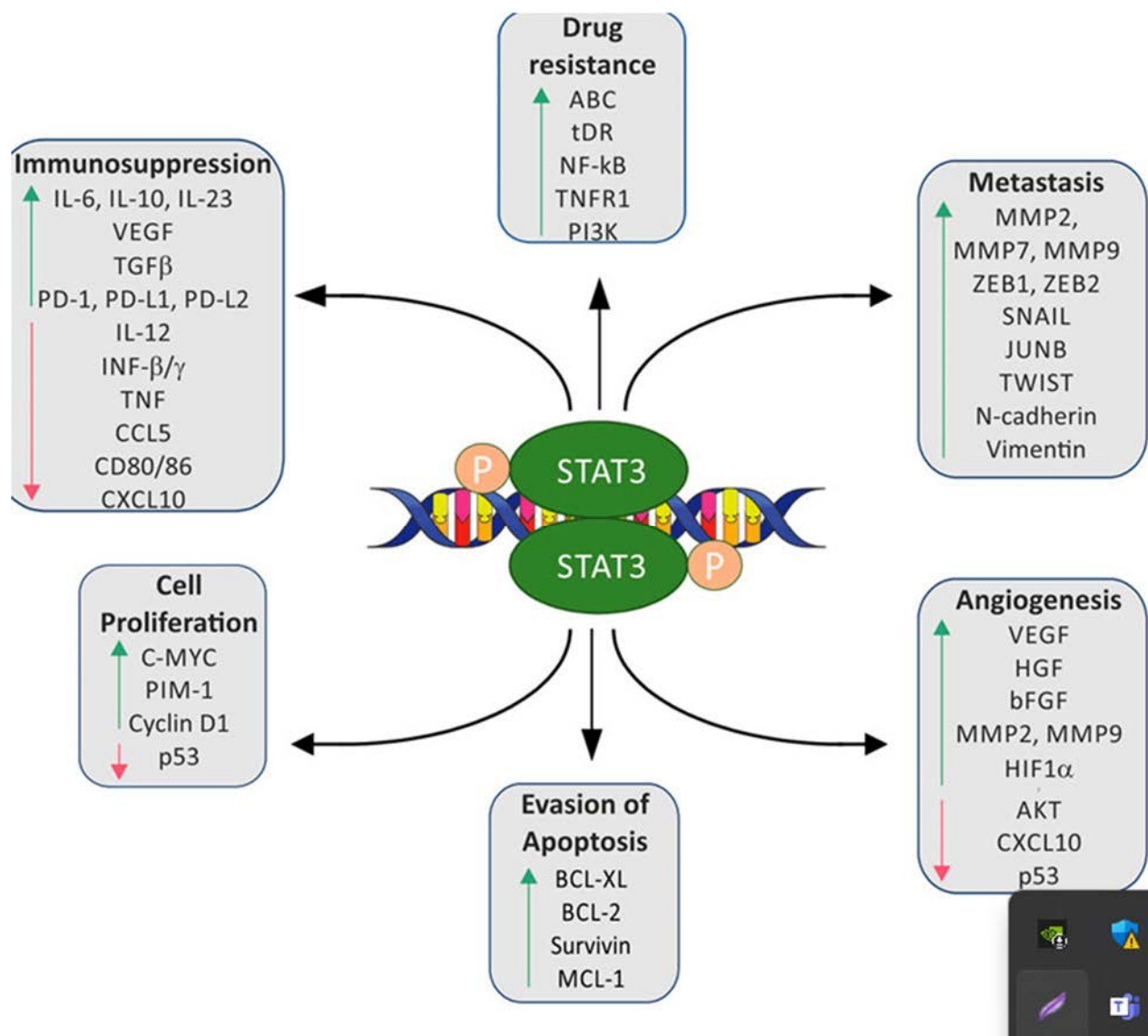
Δ.3 Αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων (transcription factor decoys)

Οι αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων-TDFs είναι δίκλωνα μόρια ολιγονουκλεοτιδίων DNA που ανταγωνίζονται με τους μεταγραφικούς παράγοντες ενός γονιδίου για τη θέση αναγνώρισης στην αλληλουχία του DNA (Molenda et al., 2023). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης του γονιδίου. Στην πράξη για την αντιμετώπιση του καρκίνου έχουν χρησιμοποιηθεί αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων, που στοχεύουν στην έκφραση του NF-kB, με σκοπό την

καταστολή των μεταστάσεων και του παράγοντα STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) για την επαγωγή της απόπτωσης και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε καρκίνους των ωοθηκών, γλοιοβλάστωμα, πνεύμονος και τραχήλου (Roma-rodrigues et al., 2020). Το σηματοδοτικό μονοπάτι NF-kB διεγείρει μια σειρά από μεταγραφικούς παράγοντες από μόνο του ή σε συνεργασία με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια (KRAS, PASI, SRS, STAT-3, HIF-1a, NOTCH, TGF-β). Αυτοί οι παράγοντες οδηγούν σε διάφορα βιολογικά αποτελέσματα όπως αυτοανέωση, ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, μεταστάσεις, αντίσταση στη θεραπεία. Πρόκειται για κυττοκίνες, παράγοντες που σχετίζονται με το φαινότυπο EMT, βλαστικοί παράγοντες και ειδικά micro RNAs (Eskandani et al., 2022). Πρόσφατα οι Zhang και συν πέτυχαν να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας σε λέμφωμα B-κυττάρων αναπτύσσοντας DNA αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων έναντι του NF-KB . Ανέπτυξαν ένα σύμπλοκο DNA αναστολέα μεταγραφικού παράγοντα με μια αλληλουχία CPG DNA τύπου B που στόχευε σε υποδοχέα Toll-like receptor στην επιφάνεια των B κυττάρων του λεμφώματος. Σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος παρατηρήθηκε μεγαλύτερη πρόσληψη του υβριδικού αυτού συμπλόκου. Τέλος, σε ξενομοσχεύματα με ανθρώπινο U2392 και Ly3 λεμφώμα σε ζώικα μοντέλα ένεση αυτού του συμπλόκου είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της NF-KB δραστηριότητας σε όγκους και μείωσε την ανάπτυξη του λεμφώματος ειδικά σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία (Eskandani et al., 2022).

Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 10 ο STAT3 συμμετέχει σε πολλές διεργασίες, που οδηγούν σε καρκινογένεση, όπως ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κυττάρων, φαρμακευτική αντίσταση, αντι-απόπτωση, επαγωγή φαινοτύπου βλαστικών κυττάρων επάγωντας τα ορόσημα της καρκινογένεσης όπως αλλόγιστη αύξηση του όγκου, αγγειογένεση, μετάσταση, διήθηση. Σε in vitro μελέτη σε κυτταρική σειρά γιγαντοκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονος STAT3 decoy -αναστολέας προκάλεσε την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την απενεργοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση και τον κυτταρικό κύκλο όπως MCL-1, CCND-1, Bcl-xl και BRC15 . Οι Njahta και συν χρησιμοποίησαν ένα κυκλικό STAT3 DNA decoy (CS3D) σε κύτταρα μη -μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονος ανέστειλαν το σχηματισμό των αποικιών και προκάλεσαν την απόπτωση. Σε ποντίκια NSCL ζωικό μοντέλο η ενδοφλέβια ένεση CS3D μείωσε την αύξηση του όγκου. Οι

Rhamati και συν χρησιμοποίησαν STAT3 decoys για την αντιμετώπιση καρκίνου του μαστού σε in vitro πειράματα και απέδειξαν ότι προκαλούν μείωση του όγκου ειδικά σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία. Παρόμοια αποτελέσματα είχε η αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών με STAT-3 decoys, των γλοιωμάτων, του ηπατοκυτταρικού καρκίνου και του καρκίνου κεφαλής τραχήλου in vitro σε αντίστοιχες κυτταρικές σειρές (Molenda et al., 2023)



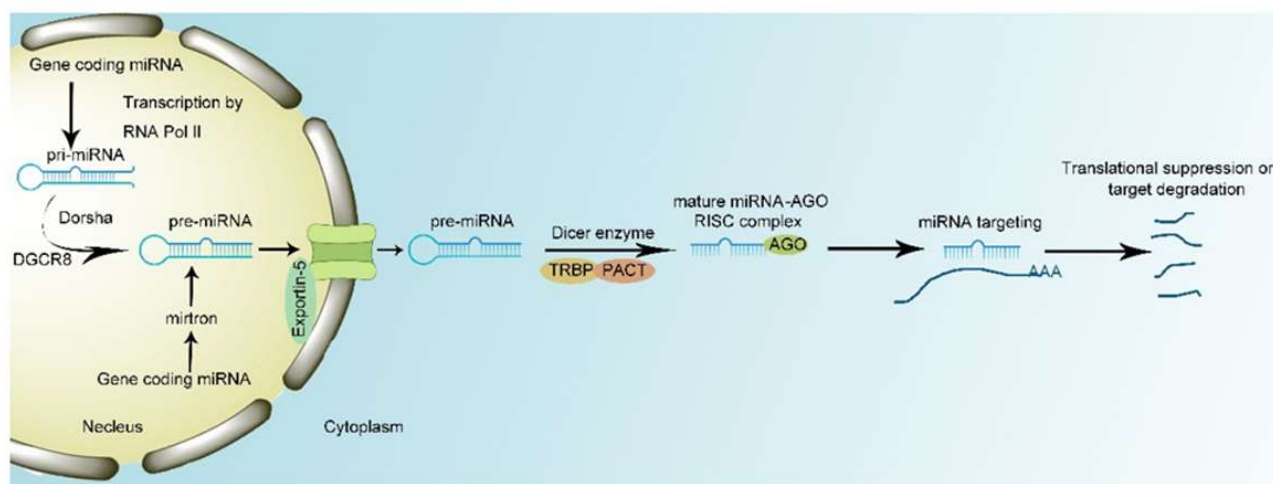
Εικόνα 10. Ο STAT3 συμμετέχει σε πολλές διεργασίες που οδηγούν σε καρκινογένεση, όπως ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός κυττάρων, φαρμακευτική αντίσταση, αντι-απόπτωση, επαγωγή φαινοτύπου βλαστικών κυττάρων επάγωντας τα ορόσημα της καρκινογένεσης όπως αλλόγιστη αύξηση του όγκου, αγγειογένεση, μετάσταση, διήθηση. (Molenda et al., 2023).

Αν και οι αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων έχουν δώσει καλά αποτελέσματα ωστόσο υπάρχουν ορισμένα ζητήματα, που αφορούν την τοξικότητα, αποτελεσματικότητα και ειδικότητα τους, που πρέπει να επιλυθούν . Μέχρι σήμερα φορείς νανοσωματιδίων έχουν σχεδιασθεί οι οποίοι έχουν ενσωματώσει αναστολείς μεταγραφικών παραγόντων και έχουν επιτυχώς χρησιμοποιηθεί στην καταστολή της δράσης του NF-KB μονοπατιού. Ο σχεδιασμός τέτοιων φορέων έχει πολλές προκλήσεις. Για παράδειγμα στην περίπτωση της χορήγησης από το στόμα θα πρέπει να προστατευθεί το DNA από αποδόμηση μέσα στο γαστρεντερικό σύστημα . Τα λιποσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αλλά η χρήση τους περιορίζεται από την υψηλή τοξικότητα τους. Πολυμερή από chitosan χρησιμοποιούνται επιτυχώς για την από του στόματος χορήγηση χάρη στη χαμηλή τοξικότητα τους, σταθερότητα τους και την αλληλεπίδραση με το βλεννογόνο (Eskandani et al., 2022)

Κατά το σχεδιασμό των αναστολέων των μεταγραφικών παραγόντων TFDs απαιτείται η ακριβής αλληλουχία της θέσης σύνδεσης του μεταγραφικού παράγοντα . Αυτό μπορεί να δημιουργήσει ένα πρόβλημα λόγω αναντιστοιχιών με τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων και να απαιτήσει αυστηρές αλλά δαπανηρές τεχνικές όπως η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης και επιπλέον επιβεβαίωση της ακρίβειας της στόχευσής χρησιμοποιώντας γονίδια αναφοράς συνήθως λουσιφεράση και διάφορους αναστολείς decoys. Για να αυξήσουμε το χρόνο ημίσειας ζωής τους στην κυκλοφορία , την αντίσταση τους σε νουκλεάσες του ορού και να μειώσουμε τις αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες, που συνδέονται με DNA θα μπορούσαμε να τους τροποποιήσουμε με πεπτίδια νουκλεϊνικών οξέων ή μακρά νουκλεϊνικά οξέα ή με ενώσεις φωσφόρου (Rad et al., 2015).

Δ.4 Θεραπεία με microRNAs

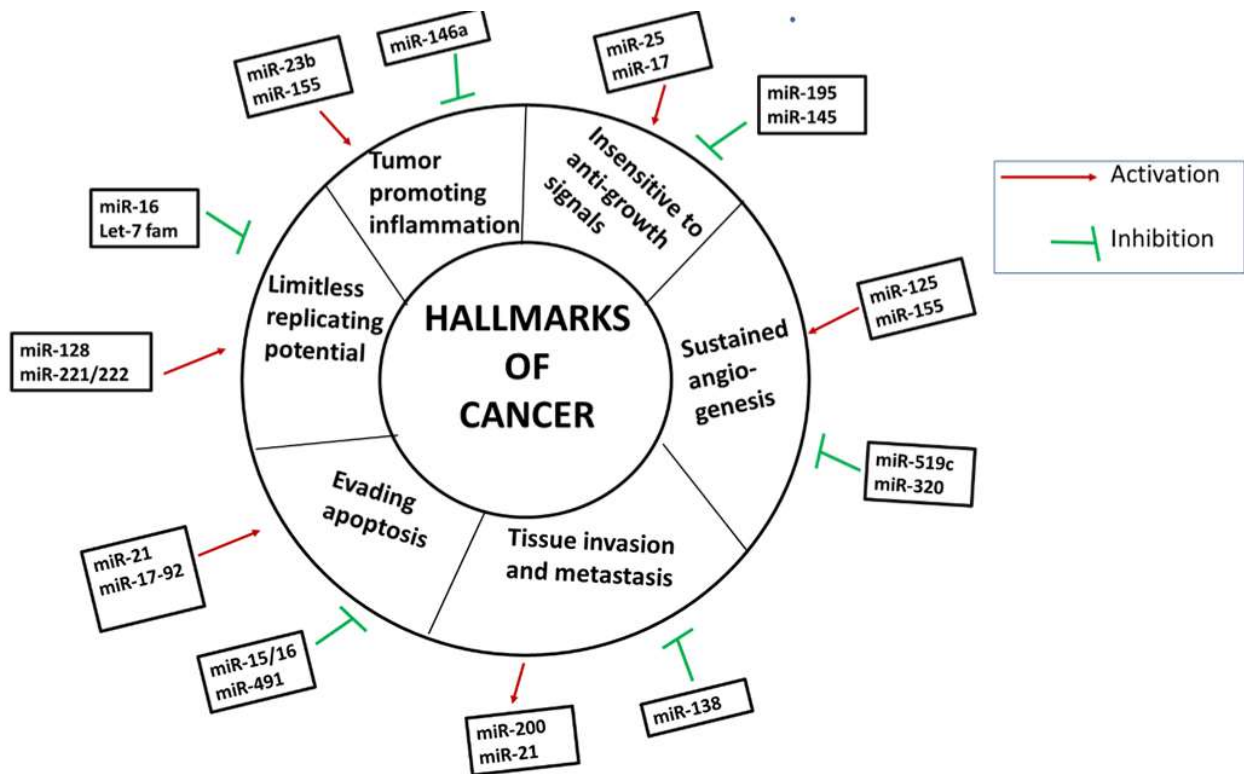
Τα microRNAs είναι ολιγονουκλεοτίδια RNA μικρά μη κωδικοποιητικά μεγέθους περίπου 22 βάσεων, τα οποία ανακαλύφθηκαν το 1993 στο *Caenorhabditis elegans* και η κύρια λειτουργία τους είναι η αποσιώπηση γονιδίων η οποία επιτυγχάνεται με αποδόμηση του mRNA ή καταστολή της μετάφρασης (Menon et al., 2022). Στην παρακάτω εικόνα 11 συνοψίζονται η βιογένεση και ο τρόπος δράσης των micro RNAs.



Εικόνα 11: Βιογένεση και μηχανισμός δράσης microRNAs (Shi et al., 2021).

Αρχικά δημιουργείται το pri-miRNA μέσω της μεταγραφής του από την αλληλουχία του γονιδιώματος με τη δράση της πολυμεράσης II. Στη συνέχεια η DROSHA και ο πρωτεϊνικός της συμπαράγοντας συνδέονται με το pri-miRNA με αποτέλεσμα την αποκοπή της κατασκευής αγκύλης loop structure και τη δημιουργία του pre-miRNA precursor RNA. Κατόπιν η Exportin-5 μεταφέρει το pre-miRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Ακολουθεί η ωρίμανση του miRNA και ο σχηματισμός του συμπλοκου RISC -RNA induced silencing complex- με τη δράση του συμπλόκου Dicer, που αποτελείται από TAR RNA binding protein (TRBP) και την πρωτεΐνη ενεργοποιητή της πρωτεϊνικής κινάσης, που επάγεται από την ιντερφερόνη (PACT). Το ώριμο RISC συνδέεται συμπληρωματικά με το mRNA στόχο και προκαλεί είτε αποδόμηση σε περίπτωση πλήρους συμπληρωματικότητας είτε καταστολή της μετάφρασης σε περίπτωση ατελούς συμπληρωματικότητας (Shi et al., 2021).

Τα microRNAs μπορούν να δράσουν καταστέλλοντας ογκοκατασταλτικά γονίδια και οδηγώντας έτσι σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων, αγγειογένεση, μετάσταση κλπ. Είναι γνωστά ως onco-miRNAs. Ακόμη μπορούν να δράσουν σαν ογκοκατασταλτικά γονίδια γνωστά ως tumor suppressor miRNAs (He et al., 2020). Στην παρακάτω εικόνα 12 φαίνεται η δράση διαφόρων micro RNAs σε διάφορα ορόσημα του καρκίνου



Εικόνα 12: Ορόσημα του καρκίνου που δρουν τα microRNAs (Menon et al., 2022).

Ένα microRNA μπορεί να δράσει σε ένα τύπο καρκίνου ή πολλά μαζί να αλληλεπιδράσουν είτε ενεργοποιητικά είτε κατασταλτικά (Menon et al., 2022).

Στη διάγνωση και στην πρόγνωση του καρκίνου τα microRNAs μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βιοδείκτες (Shi et al., 2021).

Στη θεραπεία του καρκίνου υπάρχουν πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα με τη χρήση των miRNAs Δύο είναι οι βασικές στρατηγικές :

- 1) Αναστολή των ογκογεννητικών miRNAs -oncomiRNAs
- 2) Αποκατάσταση της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών miRNAs καταστέλλοντας τα ογκογονίδια που στοχεύουν.

Στην πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιούνται:

A) Ολιγονουκλεοτίδια anti-miRNAs (AMOs), τα οποία σχεδιάζονται να είναι συμπληρωματικά στα ώριμα microRNAs και να δημιουργούν ένα σύμπλοκο με αυτό, το οποίο αποδομείται από την RNase -H. Έτσι το micro-RNA δεν αποσιωπά το γονίδιο-στόχο του, το οποίο είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο και το οποίο εκφράζεται κανονικά. Σε μια μελέτη στο *Celegans* ένα αντι let-7 microRNA ολιγονουκλεοτίδιο προκάλεσε απώλεια λειτουργίας του let-7 (Menon et al., 2022).

B) Τροποποιημένα AMOs: Ένα τροποποιημένο AMO είναι το Locked Nucleic Acid, το οποίο παράγεται με την εισαγωγή μιας μεθυλομάδας ανάμεσα στο 2-O άτομο και το 4-C άτομο και έτσι η ριβόζη μπλοκάρεται σε μια C3 ή C2 ενδοδιαμόρφωση. Η δομή αυτή αυξάνει τη διαλυτότητα και τη μεταβολική σταθερότητα *in vivo*. LNA anti-mir21 χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία σε κυτταρικές σειρές γλοιοβλαστώματος προκαλώντας απόπτωση και αναστολή της αύξησης του όγκου καθώς επίσης και ευαισθητοποίηση στον επαγόμενο κυτταρικό θάνατο από ακτινοθεραπεία (Menon et al., 2022).

Ένα άλλο παράδειγμα τροποποιημένου AMO είναι το Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer (PMO). Αποτελείται από μια βασική στήλη δακτυλίων από μορφολινο, που συνδεόνται από μονάδες phosphorodiamidate. Πρόσφατα δυο φάρμακα το Eteplirsen και το Golodirsen, που βασίζονται στη τεχνική PMO εγκρίθηκαν από το FDA για τη θεραπεία της μυϊκής δυστροφίας. Σε καρκίνο του μαστού και του προστάτη έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς (Menon et al., 2022). Peptide Nucleic acids αποτελούν επίσης μορφή τροποποιημένου AMO. Οι Lee και συν ανέπτυξαν μια φωτοδυναμική μέθοδο PNA έναντι του mir-21 σχεδιάστηκε έτσι ώστε να σχηματίσει σύμπλοκο με μια φωτοευαίσθητη χλωρίνη ε6. Τα αυξημένα επίπεδά του mir-21 στα καρκινικά κύτταρα τα καθιστούν στόχο του PNA, που συνδέεται σε αυτά και ακολούθως ελευθερώνεται ο φωτοευαίσθητοποιητικός παράγοντας και έτσι καταστρέφονται από την ακτινοθεραπεία (Menon et al., 2022). Σε κυτταρικές σειρές λεμφώματος χρησιμοποιώντας συνδυασμό PNAs και PMO έναντι mir21 και mir 155 επιτεύχθηκε knockdown των micro RNAs και μείωση της αύξησης των κυττάρων. (Menon et al., 2022).

Γ) microRNA sponges ή decoys

Είναι αναστολείς ενδογενών microRNA με πολλά σημεία πρόσδεσης σε αυτά εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ mRNA και microRNA. Μπορούν να σχεδιασθούν σε επταμερή δομή και έτσι να στοχεύουν σε μια ολόκληρη οικογένεια microRNAs. Οι Ma και συν χρησιμοποίησαν micro-RNA sponges έναντι του mir -9 σε κύτταρα καρκίνου του μαστού και πέτυχαν τη μείωση των μεταστάσεων ενεργοποιώντας το CDH1. (Menon et al., 2022).

Δ) Μικρά μακρομόρια αναστολείς

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν : azobenzenze – αναστέλλει τη βιόσυνθεση των microRNAs, enoxacin- επάγει την παραγωγή ογκοκατασταλτικών microRNAs

συνδεόμενο με την πρωτεΐνη TAR RNA binding protein 2 (TRBP), polylysine – εμποδίζει τη δράση της dicer , tryptaflavine-μπλοκάρει τη φόρτωση του μικρού RNA στο σύμπλοκο Argonaute 2 και παράγωγα φλουοροκινολόνης που αναστέλλουν το mir 21 .(Menon et al., 2022).

E) Οι Xia και συν το 2005 ανέπτυξαν μια τεχνική με την οποία κατασκεύασαν μια αλληλουχία τελείως συμπληρωματική με τη θέση σύνδεσης του microRNA στο mRNA . Αυτό το πέτυχαν τροποποιώντας τη θέση στόχο 5' UTR στο mRNA των HCN-2, HCN-4 για τα mir -1 και mir -133, γεγονός που αύξησε την έκφραση των HCN-2/HCN-4(Menon et al., 2022).

Όσον αφορά τη στρατηγική αποκατάστασης της έκφρασης ογκοκατασταλτικών microRNAs χρησιμοποιούνται μακρομόρια, που μιμούνται τη δράση των microRNAs και ονομάζονται microRNA mimics . Πρόκειται για μικρά χημικά τροποποιημένα δίκλινα RNA μακρομόρια, που μιμούνται τα ενδογενή ώριμα micro RNAs . Οι Aurora και συν έδειξαν ότι σε ορθοτοπικό μοντέλο καρκίνου του πνεύμονος σε ποντίκια η ενδορρινική χορήγηση του let-7 μείωσε την αύξηση του όγκου in vivo. Αντικατάσταση του mir-34 σε μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος είχε καλά αποτελέσματα. Στο εμπόριο κυκλοφορούν micro RNA mimics όπως pre-mirTM microRNA precursors (Ambion) και miRIDIANTTM microRNA mimics (Thermoscientific Dharmacon).(Menon et al., 2022).

Δ.5 Γονιδιωματική επιδιόρθωση -genome editing

Η γονιδιωματική επιδιόρθωση προσφέρει τη δυνατότητα να διορθώσουμε με ακρίβεια σημειακές μεταλλάξεις, να εισάγουμε ένα φυσιολογικό γονίδιο και να κάνουμε απαλοιφή ενός γονιδίου. Χρησιμοποιεί συνήθως τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης DNA μετά από σπάσιμο της διπλής έλικας του DNA, δηλαδή τον ομόλογο ανασυνδυασμό HDR και τη μη ομόλογη σύνδεση των άκρων NHEJ. Για να κόψει τη διπλή έλικα του DNA χρησιμοποιεί προγραμματισμένες ενδονουκλεάσες όπως: μεγανουκλεάσες, zinc-finger νουκλεάσες , TALEN νουκλεάσες και το σύστημα crispr-cas.(Belete, 2021).

Δ.5 α Zinc -finger ενδονουκλεάσες (ZFNs)

Στην κλινική πράξη οι ZFNs έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη θεραπεία του AIDS καθώς απενεργοποιούν τον συνυποδοχέα *ccr5*, ο οποίος είναι απαραίτητος για να μολύνει ο HIV τα T -λεμφοκύτταρα. SB -913, SB-318, ZFN-303 και ZFN-758 έχουν ενταχθεί σε κλινικές μελέτες για τη θεραπεία νεοπλασμάτων σχετιζόμενων με λοίμωξη από ιό των θηλωμάτων -human papilloma virus. Στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου οι ZFNs θα μπορούσαν να αναστείλουν την έκφραση ενδογενών επιφανειακών υποδοχέων και να ενεργοποιήσουν την έκφραση εξωγενών απαλείφοντας τα γονίδια των α και β αλυσών των ενδογενών υποδοχέων των T κυττάρων πετυχαίνοντας έτσι την καλύτερη στόχευση των καρκινικών κυττάρων από τα T κύτταρα. Οι ZFNs μπορούν να στοχεύσουν στον ιό της λευχαιμίας των T κυττάρων τύπου I να προκαλέσουν DSB στα κύτταρα και να μειώσουν την έκφραση του ιού στα T-κύτταρα ή να καταστρέψουν τα κύτταρα που είναι θετικά για τον προϊό . Σε κλινικές δοκιμές έχουν χρησιμοποιηθεί οι ZFN-603 και ZFN-758 σε νεοπλάσματα σχετιζόμενα με τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων (Clinicaltrials.gov NCT02800369). Επίσης σε υποτροπιάζον κακώθης γλοιοβλάστωμα έχουν χρησιμοποιηθεί T κύτταρα γενετικά τροποποιημένα με ZFNs (GRm13Z40-2 CTLs) (Clinicaltrials.govNCT01082926) (N. Zheng et al., 2020).

Δ.5 β TALEN-ενδονουκλεάσες (Transcription Activator-like Effector Nucleases)

Οι TALEN έχουν χρησιμοποιηθεί για να τροποποιήσουν το εξόνιο του HPRT σε κύτταρα ανθρώπινου μυελώματος, να στοχεύσουν στο γονίδιο E7 σε SIHA κύτταρα για καρκίνο του τραχήλου της μήτρας και για να προκαλέσουν μεταθέσεις σε ανθρώπινα κύτταρα t(11;22)(q24;q12) και t(2;5)(p23;q35). Σε κλινικές μελέτες χρησιμοποιούνται T27,T512 (Clinicaltrials.govNCT03226470) και TALEN-HPV16 E6/E7 ή TALEN-HPV18 E6/E7 για τη θεραπεία του ενδοεπιθηλιακού καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Σε φάση I κλινικής δοκιμής για αιματολογικές κακοήθειες χρησιμοποιούνται τα UCART22 (Clinicaltrials.gov.NCT04150497) ,UCART123 (Clinicaltrials.govNCT03190278) και UCARTCS1A

(Clinicaltrials.gov.NCT04142619) (Zheng et al., 2020).

Τόσο οι TALEN όσο και οι ZFNs μπορούν με κατάλληλη επεξεργασία στο εργαστήριο να μετασχηματισθούν για να προκαλέσουν DSBs σε συγκεκριμένους στόχους. Η διαδικασία αυτή είναι χρονοβόρα και απαιτεί πολύ δουλειά αλλά και πάλι δεν μπορεί να περιορίσει τα εκτός στόχου αποτελέσματα, γεγονός που αυξάνει τη τοξικότητα αυτών των ενδονουκλεασών. Επιπλέον το μέγεθος της επεξεργασμένης πρωτεΐνης μπορεί να δυσκολέψει τη μεταφορά της σε ζωντανά κύτταρα (Petratyté et al., 2021).

Δ.5 γ CRISPER-CAS 9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9)

Στη θεραπεία του καρκίνου το σύστημα CRISPR CAS9 έχει βρει πολλές εφαρμογές. Γενικά στην έρευνα του καρκίνου χρησιμοποιείται στη διαγνωστική, στη δημιουργία ζωικών μοντέλων, στη στοχευμένη ανοσοθεραπεία, στην ανάπτυξη φαρμάκων έναντι του καρκίνου, στην επιγενετική επιδιόρθωση των καρκινικών κυττάρων και στην καρκινογένεση μέσω ιών (Bhat et al., 2022).

Ειδικότερα σε ποντίκια με μυελοβλάστωμα και γλοίωμα εγκεφάλου ανθρώπου, τα οποία ήταν είτε γενετικά τροποποιημένα είτε *in vivo* ζωικά μοντέλα είτε αλλομοσχεύματα από κυτταρικές σειρές (CDXs) είτε αλλομοσχεύματα από ασθενείς (PDXs) έγινε knock out των γονιδίων Nf1, Pten, Trp53, που είναι υπεύθυνα για γλοιώματα και Ptch1, που είναι υπεύθυνο για μυελοβλάστωμα (Rabaan et al., 2023) με τη χρήση του CRISPR CAS9.

Σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα τα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53 και Pten είτε ξεχωριστά είτε μαζί στοχεύθηκαν με CRISPR-CAS9 με επιτυχία (Rabaan et al., 2023). Σε μεταστατικό καρκίνωμα του νεφρού, στο οποίο το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Von Hippel Lindau υφίσταται απαλοιφή knock out, το CRISPR CAS9 έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς (Rabaan et al., 2023). Σε καρκίνο της ουροδόχου κύστεως στην παθογένεια παίζει σημαντικό ρόλο το lncRNA PANDAR. Το CRISPR CAS9 πέτυχε την απαλοιφή knock out του lnc-RNA σε καρκίνους της ουροδόχου κύστεως (Rabaan et al., 2023).

Το CRISPR CAS9 μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για να τροποποιήσει τα ScFv (ποικίλες βαριές και ελαφριές αλυσίδες αντισωμάτων) πάνω στα CART κύτταρα και να αναγνωρίζουν ειδικά αντιγόνα στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, αυξάνοντας τη δράση των CAR- T κυττάρων. Σε πολλαπλό μύελωμα έχει γίνει κλινική

δοκιμή με τη χρήση βελτιωμένου πλήρως εξανθρωποποιημένου ScFv CT053. Ανάλογες μελέτες έγιναν σε B λέμφωμα (Rodrigo et al., 2023).

Το CRISPR CAS9 μπορεί να προκαλέσει Knock out των μακρομορίων των σημείων ελέγχου σε CART κύτταρα και να ελέγξει την καρκινογένεση . PD1 -programmed cell death protein 1-, Transforming growth factor β (TGF- β) και cytotoxic T lymphocyte protein 4 (CTLA4) είναι σημαντικά σημεία ελέγχου στην καρκινογένεση. Μια πρώτη κλινική δοκιμή με CART κύτταρα τροποποιημένα μέσω CRISPR CAS9 να έχουν υποστεί knock out της PD1 έγινε σε καρκίνο του πνεύμονος. Με τη χρήση του CRISPR CAS9 μπορεί να γίνει knock out του γονιδίου TGF- β R2 σε CART κύτταρα και να μειώσει την μετατροπή των T ρυθμιστικών κυττάρων εμποδίζοντας έτσι την εξάντληση των CART κυττάρων σε συμπαγείς όγκους. Το FDA έχει εγκρίνει θεραπεία με CRISPR CAS9 με Knock out TCR α και β αλυσίδες ειδικά για το αντιγόνο NY-ESO-1 σε υποτροπιάζοντες καρκίνους (Rodrigo et al., 2023).

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 συχνά εμφανίζει μεταλλάξεις σε καρκίνους του ανθρώπου. Με τη χρήση του CRISPR μπορούμε να επαναφέρουμε το p53 στη φυσιολογική του κατάσταση και δράση.(Rodrigo et al., 2023)

Τα επίπεδα του B cell maturation Antigen (BCMA) αυξάνουν σε πολλαπλούν μυέλωμα και για αυτό έχει αποτελέσει στόχο σε θεραπεία με CART κύτταρα τροποποιημένα με CRISPR (Rodrigo et al., 2023).

Το CD19 υπερεκφράζεται σε κακοήθειες των B κυττάρων .Γονιδιωματική επεξεργασία με το CRISPR για CART (TRAC/B2M) και (TRAC/B2M/PD-1) έδειξε καλύτερη αντικαρκινική δράση από ό,τι μόνο με τη χρήση των CART κυττάρων .Σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα ανθεκτική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία η χρήση CART τροποποιημένων από CRISPR να στοχεύουν CD19/CD22 έδειξε ασφάλεια και δυνατότητα καλού χειρισμού. Αυτόλογη αντι-CD19 CART cell KTE -X19 θεραπεία σε B Non-hodgkin λέμφωμα έδειξε ύφεση εξαφανίζοντας από την κυκλοφορία τα καρκινικά κύτταρα, που εκφράζουν CD19 και επομένως αποφεύγεται η εξάντληση των αντι-CD19 CART κυττάρων (Rodrigo et al., 2023).

Οι κλινικές δοκιμές που γίνονται με τη χρήση του CRISPR σε καρκίνο είναι 20. Η πρώτη αφορούσε σε ασθενείς με ασθενείς με NSCLC στους οποίους χορηγήθηκαν T κύτταρα τροποποιημένα με CRISPR ώστε να έχουν knock-out του PD-1 . Τα αποτελέσματα έδειξαν ασφάλεια, ανεκτικότητα και λίγα ήταν εκτός στόχου. Το ποσοστό μετατροπής ήταν 6%. Μια δεύτερη μελέτη στις ΗΠΑ έγινε σε ασθενείς με

προχωρημένο μυέλωμα και μεταστατικό οστεοσάρκωμα (NCT03399448). Έγινε τροποποίηση με CRISPR τριών γονιδίων : δυο που κωδικοποιούν τους υποδοχείς T κυττάρων TCR α (TRAC) και TCR β (TRBC) και του γονιδίου, που κωδικοποιεί το σημείο ελέγχου ανοσίας PD-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν επιτυχία, ανεκτικότητα και ασφάλεια.

Τελευταία, γίνονται προσπάθειες για να χρησιμοποιηθούν NKκύτταρα γενετικά τροποποιημένα με CRISPR στη θεραπεία διαφόρων καρκίνων . Τα κύτταρα αυτά σε σύγκριση με τα T κύτταρα παρουσιάζουν πιο μεγάλη ανοσοκατασταλτική απάντηση απέναντι στα καρκινικά κύτταρα (Bhat et al., 2022).

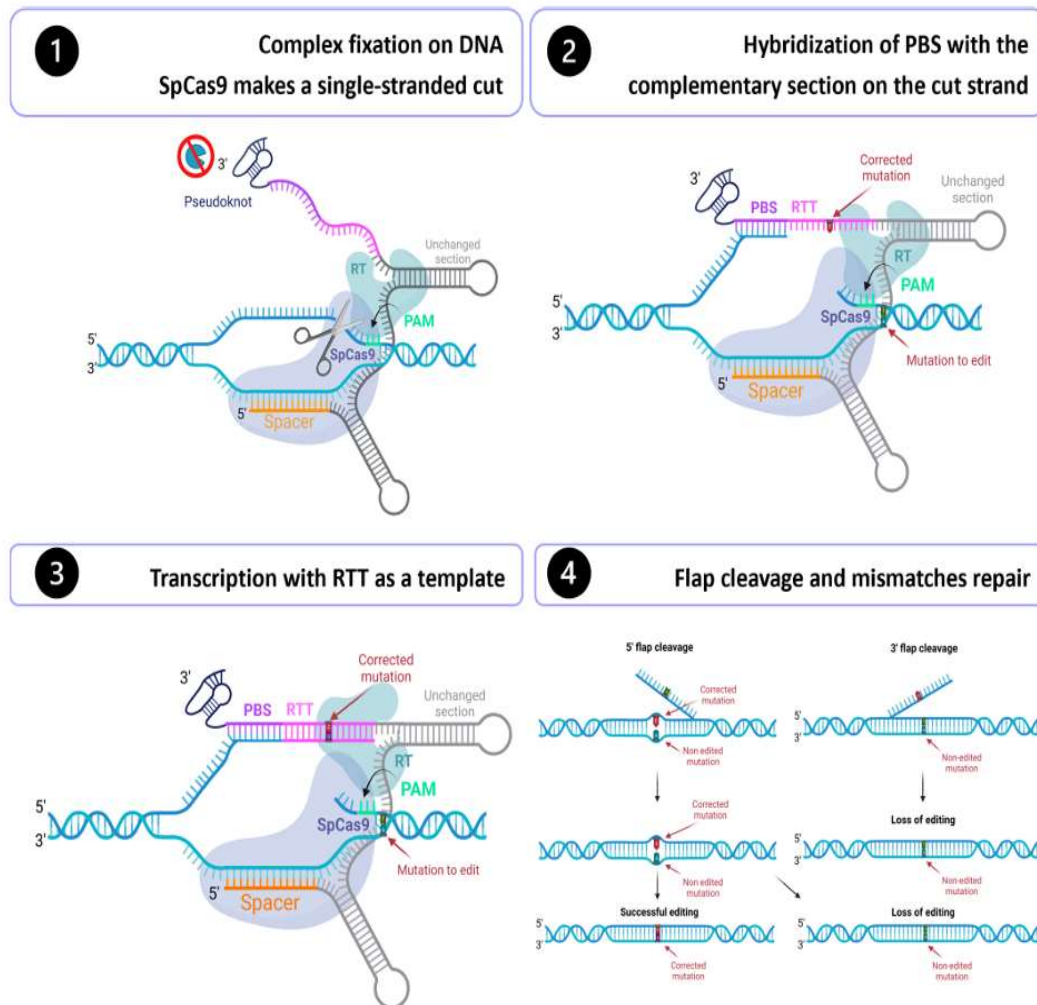
Οι περισσότερες εφαρμογές του CRISPR αφορούν σε αιματολογικές κακοήθειες και καρκίνο του πνεύμονος. Η απευθείας in vivo τροποποίηση μέσα στο σώμα θα ανοίξει νέες οδούς θεραπειών πολλών νοσημάτων (Bhat et al., 2022).

Για να επιτύχουμε την παραγωγή πιο στοχευμένων και βελτιωμένων RNA οδηγών έχουν αναπτυχθεί ειδικοί αλγόριθμοι που με τη χρήση της τεχνητής νοημοσύνης σχεδιάζουν πολύ πιο ειδικούς RNA οδηγούς. Έτσι τα εκτός στόχου αποτελέσματα είναι ακόμη λιγότερα (Rabaan et al., 2023).

Το μέλλον της CRISPR τεχνολογίας διαγράφεται λαμπρό και αφορά σε πολλούς τομείς όπως η θεραπεία γενετικών νόσων , ιογενών λοιμώξεων , του καρκίνου, η απόρριψη μοσχευμάτων και άλλες εφαρμογές.

Δ.5 δ Prime editing

Ανακαλύφθηκε τον Οκτώβριο του 2019 από την ομάδα του David Lu. Έχει τη δυνατότητα να εισάγει, αφαιρεί ή να αντικαθιστά αλληλουχίες DNA με μεγάλη ακρίβεια. Στην παρακάτω εικόνα 13 φαίνεται ο μηχανισμός δράσης του.



Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης του prime-editing (Godbout & Tremblay, 2023).

Το prime editing αποτελείται από ένα pegRNA –οδηγό, μια Cas 9, που κόβει τη μια μόνο αλυσίδα DNA και μια αντίστροφη μεταγραφάση RT. Το peg RNA διαθέτει μια περιοχή σύνδεσης στο DNA, μια περιοχή που μεταγράφεται από την RT (RTT) και μια περιοχή που συνδέεται με την Cas 9 και την RT. Αρχικά το peg RNA συνδέεται με το DNA στόχο. Η Cas 9 αναγνωρίζει μια PAM και κόβει 3 νουκλεοτίδια ανοδικά στη μια μόνο αλυσίδα του DNA. Στη συνέχεια η περιοχή σύνδεσης του primer (primer binding site PBS) υβριδίζεται με τη συμπληρωματική της στην κομμένη αλυσίδα. Έπειτα η RT μεταγράφει την περιοχή της επιθυμητής αλυσίδας (RTT) στην κομμένη αλυσίδα. Στο σημείο αυτό μια από τις δύο αλυσίδες έχει ένα διπλασιασμένο τμήμα και το κύτταρο θα πρέπει να απομακρύνει το ένα από τα δύο τμήματα για να επαναφέρει τη μορφή της διπλής αλυσίδας του DNA. Αυτή η αναντιστοιχία θα επιδιορθωθεί με ένα 5' flap ή ένα 3' flap. Αν συμβεί ένα 3' flap η επιδιόρθωση θα παραμείνει ενώ αν συμβεί ένα 5' flap θα χαθεί (Godbout & Tremblay, 2023).

Καθώς η αλληλουχία TRT χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο η επιθυμητή αλλαγή πρέπει να εισαχθεί σε αυτή. Έτσι μπορούν να συμβούν εισχωρήσεις, απαλοιφές και αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων και να θεραπευθούν γενετικά νοσήματα και ο καρκίνος. Σήμερα υπάρχουν πολλές εκδοχές prime editing, οι πιο δημοφιλείς είναι οι PE2 και PE3. Η PE3 έχει ένα επιπλέον RNA οδηγό, που προκαλεί μια εγκοπή στην αλυσίδα, που δεν κόβεται αρχικά από την Cas 9. Αυτό ωθεί το κύτταρο να χρησιμοποιήσει την επιδιορθωμένη αλυσίδα σαν εκμαγείο για να αντικαταστήσει την μη-επιδιορθωμένη αλυσίδα. Αυτό αυξάνει τις πιθανότητες να διατηρηθεί η επιδιόρθωση στο βήμα αυτό (Godbout & Tremblay, 2023).

Μεταλλάξεις στα γονίδια KRAS, P53 και APC έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν καρκίνο. Η επιδιόρθωση τους με prime editing έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνών. Με τις μεταλλάξεις του KRAS ασχολήθηκε η ομάδα του Jang και συν. Οι ερευνητές αυτοί σχεδίασαν ένα μοναδικό peg RNA, το οποίο μπορεί να διορθώσει 12 μεταλλάξεις του KRAS που αποτελούν το 94% των γνωστών KRAS μεταλλάξεων. Δημιούργησαν μια βιβλιοθήκη από κυτταρικές σειρές HEK293T/17, που περιείχε τις 12 μεταλλάξεις. Ελέγχθηκαν διαφορετικά peg RNA, που είχαν διαφορετικά PBS και RTT μήκη. Βρέθηκε ότι ένας peg RNA, που είχε PBS από 13 νουκλεοτίδια και RTT από 16 νουκλεοτίδια ήταν ο καλύτερος. Επίσης βρήκαν ότι ο PE3 συγκριτικά με τον PE2 ήταν πιο αποτελεσματικός. Επίσης έλεγξαν εκδοχές τροποποιημένων peg RNA (e pegRNA) : το μοτίβο tmpknot RNA και το μοτίβο tenopreQ1 RNA. Τα e-peg RNAs ήταν πιο αποτελεσματικά από τα κλασσικά γιατί προστατεύουν τις αλληλουχίες RTT και PBS του peg RNA από τις κυτταρικές εξωνουκλέασες (Godbout & Tremblay, 2023).

Οι ερευνητές παρήγαγαν κυτταρικές σειρές HEK293/T17 με prime editing οι οποίες είχαν ειδικές μεταλλάξεις στα αμινοξέα 12 και 13. Στη συνέχεια διόρθωσαν αυτές τις μεταλλάξεις και βρήκαν ότι για τις μεταλλάξεις G12D και G13D ο συνδυασμός PE3 και epegRNA που περιέχει το μοτίβο tenopreQ1 ήταν ο καλύτερος προκαλώντας επιδιόρθωση 25% και 32% αντίστοιχα. Για τις μεταλλάξεις G12V και G13C ο συνδυασμός PE3 και epegRNA, που περιείχε το μοτίβο tmpknot προκάλεσε επιδιόρθωση 24% και 32% αντίστοιχα και ήταν ο καλύτερος. Στη συνέχεια χρησιμοποίησαν το prime editing σε σειρές καρκίνου του παγκρέατος CFPAC-1 και ASPC-1. Με το PE3 και pegRNA με μοτίβο tenoprQ1 είχαν ποσοστά επιδιόρθωσης πολύ χαμηλά μόλις 2,7% στην ASPC-1. Χρησιμοποιώντας PE5max τα ποσοστά

αυξήθηκαν σε 11,4% σε κύτταρα CFPAC-1 και 18,7% σε κύτταρα ASPC-1 (Godbout & Tremblay, 2023).

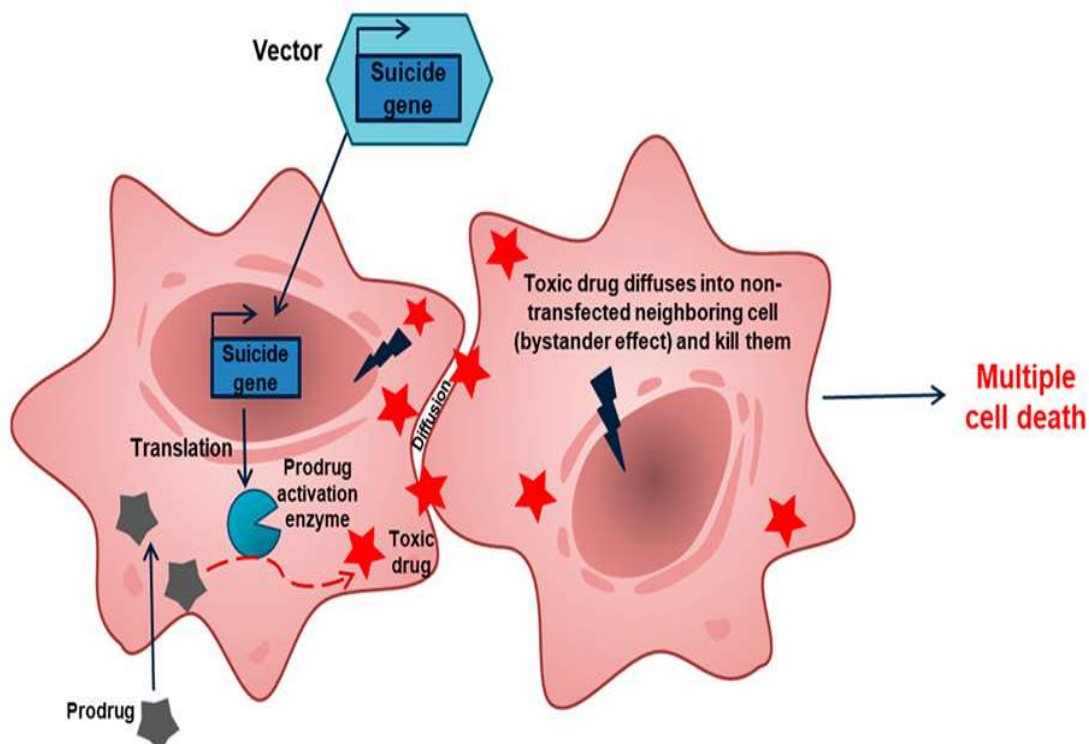
Οι Abuhamad και συν. επιχείρησαν να διορθώσουν με PE3 τη μετάλλαξη c580 C>T, pL194F του P53 σε σειρές T47D λοβιακού καρκίνου του μαστού. Τα αποτελέσματα επιδιόρθωσης ήταν πολύ χαμηλά 0,04% . Το ίδιο χαμηλά 0,2% ήταν τα αποτελέσματα επιδιόρθωσης σε κυτταρικές σειρές HEK293T. . Οι Anzalone και συν πέτυχαν υψηλό ποσοστό επιδιόρθωσης 32% σε κύτταρα HEK293T χρησιμοποιώντας το ίδιο pegRNA . Πιθανόν ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου των Abuhamad και συν είχε κάποια μειονεκτήματα (Godbout & Tremblay, 2023).

Το prime editing χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη δημιουργία οργανοειδών -μοντέλων καρκίνου με την εισαγωγή των κατάλληλων μεταλλάξεων σε αυτά (Sen et al., 2023).

Σε σύγκριση με το CRISPR το prime editing επιτρέπει την απευθείας διόρθωση του DNA χωρίς να επάγει τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης NHEJ και HDR και επομένως τα εκτός στόχου αποτελέσματα είναι πολύ λίγα . Ωστόσο ανεπιθύμητες μεταλλάξεις μπορούν να συμβούν με τη χρήση του PE3 ,γεγονός που σημαίνει ότι υπάρχει αρκετός χώρος για βελτιώσεις του συστήματος prime editing (Sen et al., 2023).

Δ.6 Θεραπεία αυτοκτονίας (suicide gene therapy).

Η γονιδιακή θεραπεία στον καρκίνο με γονίδια αυτοκτονίας έχει δυο εναλλακτικές: τη μεταφορά ενός γονιδίου, που κωδικοποιεί μια τοξίνη και το οποίο μεταφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και τα σκοτώνει, ή τη μεταφορά γονιδίων, που κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία μετατρέπουν προφάρμακα σε δραστικά που παράγουν τοξικούς για τα καρκινικά κύτταρα μεταβολίτες (Ardini et al., 2022). Στην εικόνα 14 φαίνεται ο μηχανισμός δράσης της θεραπείας αυτοκτονίας .



Εικόνα 14 : Μηχανισμός δράσης θεραπείας αυτοκτονίας (Alekseenko et al., 2021).

Τα πιο κοινά ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η θυμιδική κινάση του απλού ερπητοϊού (TK;HSV-TK) , η δεαμινάση της κυτοσίνης (CD) της *Escherichia Coli* ή του ζυμομήκυτα και η σχετιζόμενη με *Escherichia Coli* νιτρορεδοουκτάση (NTR)και τα οποία καθιστούν τα κύτταρα ευαίσθητα στη δράση των φαρμάκων αντίστοιχα ganciclovir (GCV), 5-fluoracil (5FC) και CB1954. (Sheikh et al., 2021) Στον πίνακα φαίνονται τα κύρια συστήματα γονιδιακής θεραπείας αυτοκτονίας.

Πίνακας 3 Κύρια συστήματα γονιδιακής θεραπείας αυτοκτονίας -πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (Sheikh et al., 2021).

Table 1. Selected prodrug-activated gene therapy (PAGT) and alternative "suicide gene" systems, activating/prodrugs used and potential advantages and disadvantages.						
Category	Prodrug(s) (route of administration)	Active metabolite	Time to peak serum concentration of prodrug (estimated)	Duration of prodrug administration	Advantages	Disadvantages
Prodrug-activated systems						
Herpes simplex thymidine kinase (HSV-TK)	Ganciclovir (iv) Valganciclovir (po) Valaciclovir (po) Aciclovir (po/iv)	Ganciclovir triphosphate (GCV-3P)	1.5-3 hours (po) Immediate (iv)	7-21 days	-Widely used in clinical trials; -Effective; -Safe	-Immunogenicity; -Alternative splice sites; -Toxicity of prodrug (e.g. bone marrow suppression); -Only effective for proliferating cells; -Prolonged prodrug schedule (2-3 weeks); -Need for treating CMV infection with GCV can lead to premature destruction of cells
Cytosine deaminase (CD)	5-Fluorocytosine (5-FC) (po/iv)	5-Fluorouracil	1-2 hours	7-21 days	-Used in clinical trials; -Safe; -Some efficacy	-Immunogenicity; -Toxicity of prodrug (mainly hematologic); -Prolonged prodrug schedule (2-3 weeks)
Nitroreductase	CB1954 (iv/ip)	5-(aziridin-1-yl)-4-N-acetoxy-2-nitrobenzamide	3-4 hours	One time treatment, repeated 3-weekly for up to 6 cycles	-Safe; -One-time prodrug treatment fast; -Re-treatment with prodrug possible	-Limited clinical trial experience; -Toxicity of prodrug (lymphopenia, transaminitis)
Cytochrome P450 (CYP450)	Oxazaphosphorines (e.g. cyclophosphamide, ifosfamide) (iv)	4-hydroxy derivative of oxazaphosphorine	24 hours	14 days every 28 days, repeated up to 7 cycles	-Less immunogenic; -Well tolerated	-Limited clinical trial experience; -Metabolism through endogenous P450 system causing systemic toxicity
Purine Nucleoside Phosphorylase/	6-Methylpurine Deoxyriboside or Fludarabine (iv/po)	2-deoxyribose-1-phosphate	0-24 hours	3 days	-Potent bystander effect; -Well tolerated	-Limited clinical trial experience
Carboxypeptidase G2	Nitrogen Mustard (e.g. ZD2767P) (iv)	DNA alkylating agent	minutes	3 bolus injections on one day	-Causes apoptosis in dividing and non-dividing cells; -Well tolerated	-Limited clinical trial experience -Immunogenicity -Limited clinical effect
Therapeutic monoclonal antibody-mediated						
CD20 tEGFR	N/A	anti-CD20 antibody (e.g. rituximab) anti-tEGFR antibody (e.g. cetuximab)	hours hours	2-8 hours iv 60-120 mins (iv)	-Rapid onset; -Extensive experience with several antibodies (e.g. rituximab, cetuximab) for other clinical indications; -Non-immunogenic	-Limited clinical data
Dimerization-inducing						
iCasp9	N/A	AP1903	minutes (iv)	minutes	-Rapid onset; -Non-immunogenic	-Limited clinical data

i.p., intraperitoneally; N/A, not applicable; p.o., per os (orally).

Η δράση του φαρμάκου ή της τοξίνης επεκτείνεται εκτός από τα προσβεβλημένα καρκινικά κύτταρα και στα γειτονικά . Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται ως bystander effect και αφορά τόσο σε γειτονικά κύτταρα όσο και σε πιο μακρινά. Στα γειτονικά κύτταρα οι πιθανοί μηχανισμοί για το φαινόμενο αυτό είναι η παθητική διάχυση του ενεργοποιημένου φαρμάκου, η μεταφορά μέσω αποπτωτικών σωματιδίων που παράγονται από τα νεκρά κύτταρα και η μεταφορά μέσω κενών συνδέσεων(gap junctions). Ενώ σε μακρινά σημεία η μείωση του όγκου οφείλεται στην ενεργοποίηση ανοσοποιητικών κυττάρων, όπως T και NK κύτταρα (Sheikh et al., 2021).

Ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται ο κυτταρικός θάνατος είναι η απόπτωση. Ωστόσο

τελευταία έχει αποδειχθεί ότι ένας επιπλέον μηχανισμός είναι η επαγωγή της ανοσίας έναντι του όγκου. Έτσι εξηγείται και η δράση έναντι των μεταστάσεων Τα κύτταρα που εκφράζουν τα αντιγόνα του ενζύμου ή της τοξίνης επάγουν την ενεργοποίηση του συστήματος ανοσίας (Alekseenko et al., 2021).

Σε κλινικές δοκιμές φάσης III έχουν φθάσει τρία φάρμακα θεραπείας αυτοκτονίας: Cerepro (αναπτύχθηκε από Ark Therapeutics group ,Kuopio,Finland), Toca 511 (αναπτύχθηκε από Tocagen ,San Diego, CA,USA) και ProstAtak (αναπτύχθηκε από Candel Therapeutics Inc, Needham,MA,USA)

Το Cerepro χρησιμοποιεί ένα αδενοϊό ως φορέα του γονιδίου της θυμιδινικής κινάσης του απλού ερπητοϊού για τη θεραπεία ασθενών με υψηλού βαθμού γλοιωμάτα και απέκτησε την κατάσταση ορφανού φαρμάκου το 2002. Το Toca 511 είναι ένας μη-λυτικός ρετροϊός που μεταφέρει το γονίδιο κυτοσίνης δεαμινάσης του ζυμομύκητα και χρησιμοποιήθηκε για τη θεραπεία γλοιωμάτων. Το Prost-Atak δοκιμάζεται σε κλινική μελέτη φάσης II στον καρκίνο του προστάτη σε συνδυασμό με valacyclovir από το στόμα (Alekseenko et al., 2021).

Η γονιδιακή θεραπεία αυτοκτονίας έχει ορισμένους περιορισμούς . Το gancyclovir χορηγείται σε ασθενείς με λοίμωξη από CMV ιδίως σε ανοσοκατασταλμένους μετά από μεταμόσχευση. Συνεπώς η χορήγηση του ως προφαρμάκου θα οδηγούσε στη ανεπιθύμητη καταστροφή των τροποποιημένων κυττάρων και την εξάλειψη τους πριν τελέσουν την προσδοκώμενη λειτουργία τους. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται το Foscarnet σε τέτοιους ασθενείς (Sheikh et al., 2021).

Ένας άλλος περιορισμός είναι η δοσολογία του προφαρμάκου καθώς οι ασθενείς αυτοί έχουν υποστεί βαριές χημειοθεραπείες και ο μυελός των οστών τους είναι επιβαρυνμένος, οπότε είναι συχνές οι αιματολογικές ανεπιθύμητες ενέργειες (Sheikh et al., 2021).

Η χορήγηση από το στόμα του προφαρμάκου έχει πλεονεκτήματα αλλά δυσκολεύει την παρακολούθηση της συμμόρφωσης του ασθενούς.

Ο σχεδιασμός του συστήματος μεταφοράς έχει μεγάλη σημασία. Πρώτον επίτοποι του ιού που κωδικοποιούνται από το γονίδιο της TK είναι ανοσογονικοί και μπορούν να προκαλέσουν την καταστροφή των τροποποιημένων κυττάρων. Δεύτερον, εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου TK μπορεί να οδηγήσει σε μη-λειτουργικό ένζυμο άρα και σε μη απόκριση στο προφάρμακο. Τέλος η στρατηγική αυτής της θεραπείας εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο και απαιτεί διαιρούμενα κύτταρα. Τα μετα-μιτωτικά κύτταρα ή

αυτά που δεν διαιρούνται και έχουν το γονίδιο, που ενεργοποιεί το προφάρμακο χάνονται (Sheikh et al., 2021).

Ο συνδυασμός της χρήσης ενός εκκινήτη (promoter), που είναι ενεργός στο μικροπεριβάλλον του όγκου όπως ο STAT3/nuclear factor κ B (NF-κB) προάγει την έκφραση της HSV-TK και δρούσε θεραπευτικά μετά από χορήγηση ganciclovir (Sheikh et al., 2021).

Πετροίσι ως μεταφορείς έχουν το πλεονέκτημα ότι ενσωματώνονται στο γονιδίωμα των καρκινικών κυττάρων και είναι λιγότερο ανοσογονικοί. Έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία ως φορείς της Ycd που ενεργοποιεί το προφάρμακο TOCA 511 -FC σε υποτροπιάζοντα γλοιώματα του εγκεφάλου.

Σε καρκίνο του προστάτη έχει δοκιμασθεί ο συνδυασμός TK και CD γονιδίων που μεταφέρονται από ένα αδενοϊό με αρκετή επιτυχία (Sheikh et al., 2021).

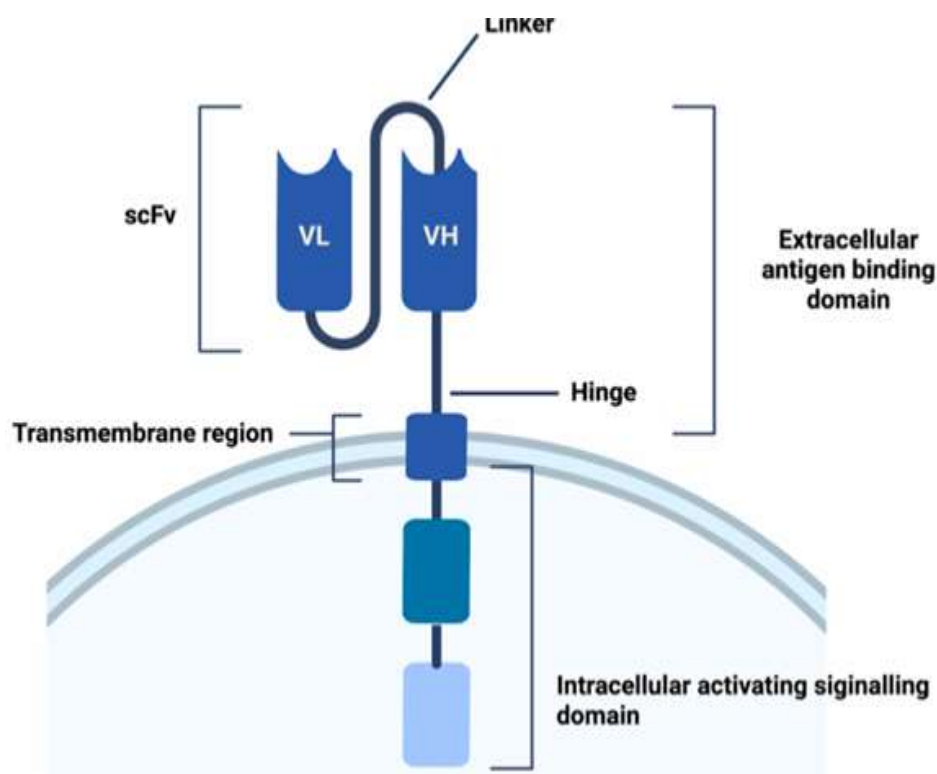
Ένας τρόπος να αυξήσουμε τη δραστικότητα της θεραπείας αυτοκτονίας είναι ο συνδυασμός του γονιδίου αυτοκτονίας με ένα γονίδιο, που κωδικοποιεί μια κυτοκίνη. Όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των μακροφάγων και πολυμορφοκυττάρων (GM-CSF), ο οποίος αποδείχθηκε σε προκλινικές μελέτες ότι διαθέτει ισχυρή αντικαρκινογόνο δράση. Ερευνητές συνδύασαν τον GM-CSF με την IL-2 και την HSV-TK σε αδενοϊό και πέτυχαν πολύ καλά αποτελέσματα (Alekseenko et al., 2021). Άλλοι ερευνητές χρησιμοποίησαν ως φορέα της HSV-TK ένα πεπτίδιο συνπολυμερές PEG-PEP-TAT και πέτυχαν αύξηση τη επιβίωσης, μείωση της αύξησης του όγκου και των μεταστάσεων σε ζωικό μοντέλο.

Στην παρακάτω εικόνα 15 περιγράφεται ο ιδανικός σχεδιασμός της θεραπείας αυτοκτονίας

ακτινοθεραπεία αυξάνει τα θεραπευτικά αποτελέσματα. Από τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων απελευθερώνονται αντιγόνα σχετιζόμενα με όγκους , μπορούν να ενεργοποιήσουν τα δενδριτικά κύτταρα και να επάγουν την επίκτητη αντικαρκινική ανοσία. Η παράλληλη έκφραση των GM-CSF και *danger signal* με το *suicide-enzyme gene* προάγουν ακόμη περισσότερο την ανοσιακή αντίδραση . Σαν αποτέλεσμα ενεργοποιούνται τα T κύτταρα , στρατολογούνται τα δενδριτικά κύτταρα στην περιοχή του όγκου και ωριμάζουν ενώ επιπλέον καταπολεμούνται και οι απομακρυσμένες μεταστάσεις. (Alekseenko et al., 2021)

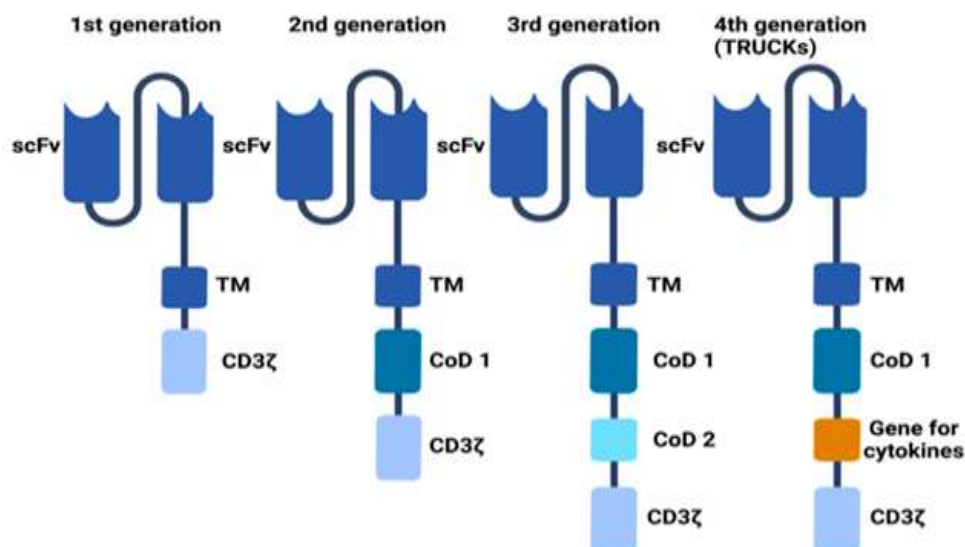
Δ.7 CAR -T κύτταρα.

Τα CAR-T κύτταρα είναι γενετικά τροποποιημένα κύτταρα τα οποία δρουν κυτταροτοξικά σε αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους χάρη σε ειδικούς χημειοκίτους υποδοχείς που εκφράζουν. Οι χημειοκίτοι αυτοί υποδοχείς είναι συνθετικοί υποδοχείς, που στοχεύουν σε λεμφοκύτταρα έναντι κυττάρων, που εκφράζουν ένα ειδικό αντιγόνο. Συνδυάζουν τις ιδιότητες ενός μονοκλωνικού αντισώματος, που αναγνωρίζει το καρκινικό αντιγόνο και αυτές του υποδοχέα TCR, που είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση και τη σηματοδότηση. Η σύνδεση των CAR στην επιφάνεια των κυττάρων είναι ανεξάρτητη από τον υποδοχέα MHC (Smole, 2022). Στην εικόνα 16 φαίνεται ένας car υποδοχέας.

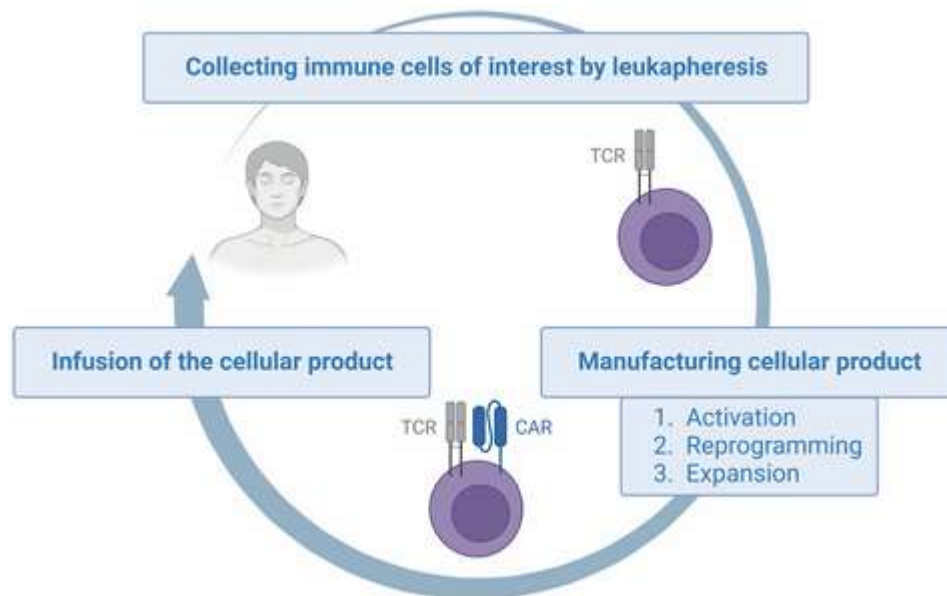


Εικόνα 16: Ο car υποδοχέας αποτελείται από ένα εξωκυττάριο τμήμα το οποίο συνδέεται με τα αντιγόνα στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και σηματοδοτεί τα T λεμφοκύτταρα. Το διαμεμβρανικό τμήμα προέρχεται από φυσικές πρωτεΐνες, όπως CD3ζ, CD4, CD8a ή CD28. Το τμήμα αυτό μαζί με το hinge διεγείρουν την παραγωγή κυτοκινών και τον θάνατο που επάγεται από αυτή την ενεργοποίηση. Το ενδοκυτταρικό τμήμα σηματοδοτεί και ενεργοποιεί την κυτταροτοξική δράση των CAR κυττάρων (Sadowski et al., 2022a).

Με βάση τη δομή τους οι CAR υποδοχείς μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις γενιές. Εικόνα 17



Εικόνα 17: Γενιές car υποδοχέων. Οι πρώτης γενιάς χαρακτηρίζονται από την παρουσία του ενδοκυττάριου *cd3ζ*, οι δεύτερης γενιάς περιλαμβάνουν ένα επιπλέον *cd01* κυρίως *CD28*. Οι τρίτης γενιάς περιέχουν δυο επιπλέον τομείς π.χ. *cd28*, *ICOS*, *41BB*, ή *OX40*. Οι τέταρτης γενιάς είναι δεύτερης γενιάς που επιπλέον περιέχουν ένα γονίδιο υπεύθυνο για την παραγωγή κυτοκινών στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Sadowski et al., 2022a). Η παραγωγή των αυτόλογων CAR-T κυττάρων έχει ως εξής: Τα T λεμφοκύτταρα αφαιρούνται από τον ασθενή με λευκαφαίρεση και στη συνέχεια ενεργοποιούνται και επεξεργάζονται γενετικά *ex vivo* ώστε να μετατραπούν σε CAR κύτταρα, που αναγνωρίζουν και εξουδετερώνουν καρκινικά κύτταρα. Αυτό επιτυγχάνεται με την εισαγωγή σε αυτά ειδικής γενετικής κασέτας μέσω ιϊκής τους μεταγωγής (*transduction*). Ακολουθεί η αύξηση του αριθμού τους *ex vivo*. Τέλος γίνεται έγχυση τους πίσω στον ασθενή (Smole, 2022). Εικόνα 18.



Εικόνα 18: Τρόπος παρασκευής και χορήγησης CART κυττάρων (Smole, 2022).

Κατά το σχεδιασμό των CART κυττάρων θα πρέπει να γίνει επιλογή του πληθυσμού των T κυττάρων, που θα χρησιμοποιηθούν. Τα T ώριμα κύτταρα διαφοροποιούνται σε naïve (TN), βλαστικά κύτταρα μνήμης (stem cell memory) (TSM) κεντρικής μνήμης (central memory) (TCM) τελεστές μνήμης (effector memory) (TEM) , τελεστές (effector) (TE) και εξαντλημένα κύτταρα(exhausted cells) (TEXH). Επίσης κατηγοριοποιούνται σε CD8⁺ T κύτταρα, CD4⁺ T βοηθητικά (helper)κύτταρα και CD4⁺ ρυθμιστικά κύτταρα Tregs. Τα βοηθητικά κύτταρα διακρίνονται σε Th1, Th2, Th17 και follicular helper κύτταρα. Συνήθως επιλέγεται ένα μίγμα CD4⁺ και CD8⁺ T κυττάρων και μάλιστα σε συγκεκριμένη αναλογία .(Ayala Ceja et al., 2024) . Τα T κύτταρα διαφοροποιούνται σε TE, που παράγουν κυτοκίνες και είναι κυτταροτοξικά αλλά είναι βραχύβια σε αντίθεση με τα μνημονικά, που ζουν πολύ. Για αυτό τα CAR κύτταρα εμπλουτίζονται με naïve και μνημονικά κύτταρα τα οποία αφαιρούνται με λευκαφαίρεση με επιλογή για CD62L⁺ κύτταρα (Ayala Ceja et al., 2024)

Για την ενεργοποίηση και την αύξηση του αριθμού των T κυττάρων χρησιμοποιούνται οι σηματοδοτήσεις από CD3 και CD28 και ένα μίγμα κυτοκινών, που περιλαμβάνει IL-2,IL-7 ή/και IL-15. Ωστόσο οι τεχνολογίες νέας γενιάς το βήμα αυτό της ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού των T κυττάρων συχνά το παραλείπουν (Ayala Ceja et al., 2024).

Τα προϊόντα που έχουν εγκριθεί από το FDA για θεραπεία με CAR T κύτταρα χρησιμοποιούν ρετροϊούς και λεντιϊούς ως φορείς των διαγονιδίων, οι οποίοι καθώς

ενσωματώνονται στο γονιδίωμα προκαλούν σταθερή έκφραση των T κυττάρων, που παραμένει μέχρι και 10 χρόνια μετά την έγχυση τους. Έχουν το μειονέκτημα της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης αν και μέχρι σήμερα δεν έχει περιγραφεί καμία περίπτωση ογκογόνου μεταμόρφωσης των car T κυττάρων. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι η δυνητική αντιγραφή τους για αυτό το FDA επιβάλλει τον έλεγχο της ικανότητας αντιγραφής των ρετροϊών και λεντιϊών πριν τη χρήση τους (Ayala Ceja et al., 2024). Μη ιϊκοί φορείς των διαγονιδίων έχουν επίσης δοκιμασθεί. Το σύστημα CRISPR/cas9 προκαλεί μια θραύση της διπλής έλικας του DNA καθοδηγούμενο από gRNA και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο DNA του διαγονιδίου μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού εισάγει το διαγονίδιο στην επιθυμητή θέση. Έχει αποδειχθεί ότι με τη χρήση ενός αδενοσυσχετιζόμενου ιϊκού φορέα σαν εκμαγείο, που κατευθύνει τον ομόλογο ανασυνδυασμό μπορούν να εισαχθούν διαγονίδια, που κωδικοποιούν για την ενδογενή TCR α αλυσίδα στο TRAC locus. Εκτός από τη διευκόλυνση στην ενσωμάτωση σε ειδική θέση του διαγονιδίου το crisprcas έχει δοκιμασθεί με ενσωμάτωση ιού για knock out ανεπιθύμητων ενδογενών γονιδίων μαζί με μη ειδική ενσωμάτωση του γονιδίου, που κωδικοποιεί για ένα υποδοχέα του στόχου-καρκίνου. Η πρώτη FDA εγκεκριμένη κλινική δοκιμή που συνδυάζει crispr cas 9 και car κύτταρα εφαρμόζεε ένα knock out του PD-1 και του ενδογενούς TCR μέσω crispr /cas 9 ενώ μέσω ενός λεντιϊού ενσωμάτωνε ένα διαγονίδιο, που στόχευε στο αντιγόνο NY-ESO-1. Το κύριο μειονέκτημα του crispr/cas9 είναι ότι μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες βλάβες του γενετικού υλικού (Ayala Ceja et al., 2024).

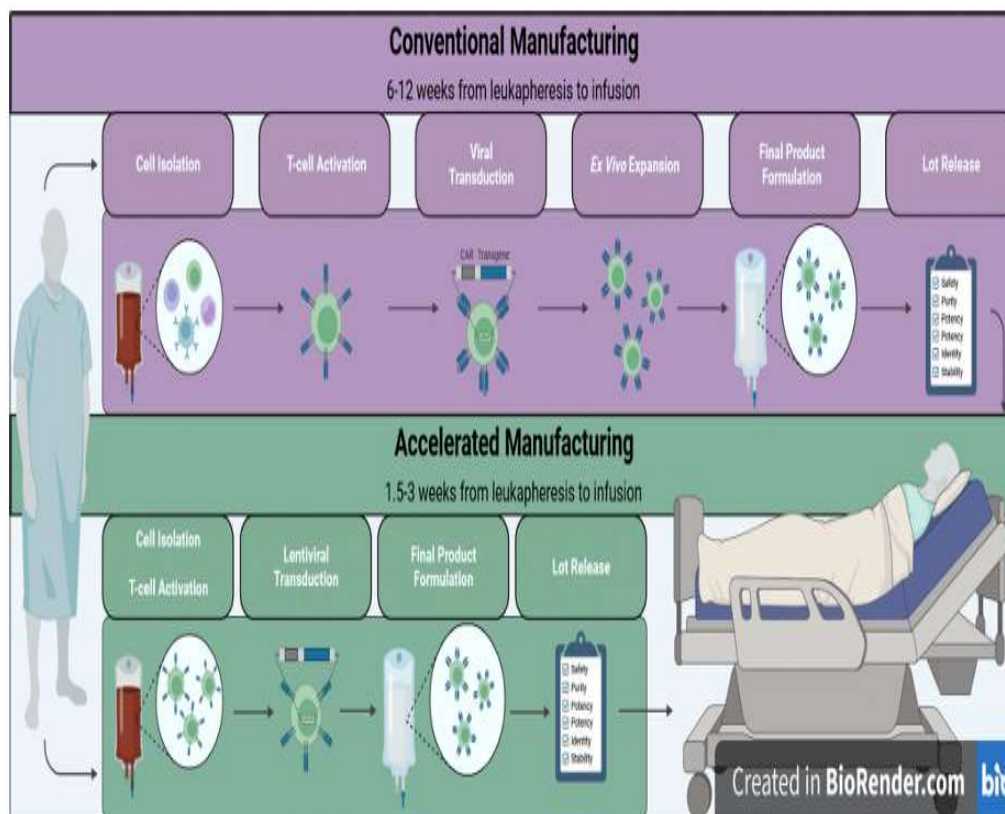
Τα τραπεζοζόνια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την ενσωμάτωση των διαγονιδίων. Ωστόσο υπάρχει ο κίνδυνος της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης, όπως φάνηκε σε δυο ασθενείς που έλαβαν αλλογενή CD19 car t κύτταρα μέσω piggyBac συστήματος τραπεζοζονίων σε μια κλινική δοκιμή φάσης I και ανέπτυξαν λέμφωμα (Ayala Ceja et al., 2024).

Για να αποφύγουμε τον κίνδυνο της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε mRNA, που εισάγεται στα T κύτταρα με ηλεκτροδιάτρηση, αλλά η έκφραση του διαρκεί περίπου μια εβδομάδα (Ayala Ceja et al., 2024).

Μετά την ενσωμάτωση του διαγονιδίου στα car T κύτταρα θα πρέπει να αυξηθεί ο αριθμός τους έτσι ώστε να είναι επαρκής σαν δόση χορήγησης στον ασθενή. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη IL-2, IL7 και IL-15. Εκτός από την αύξηση του αριθμού των κυττάρων στόχος είναι και η εξαφάνιση των μη-T κυττάρων.

Φαρμακευτικά συμπληρώματα χρησιμοποιούνται για να αναπτυχθούν επιθυμητοί φαινότυποι Τ κυττάρων. Για παράδειγμα ο αναστολέας της κινάσης της τυροσίνης dasatinib χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή Car T κυττάρων με σκοπό να αναστείλει την τονική σηματοδότηση (π.χ. τη σηματοδότηση του υποδοχέα σε απουσία ενεργοποίησης από αντιγόνο) και επομένως εμποδίζει την πρόωμη εξάντληση των CAR-T κυττάρων και διατηρεί τη λειτουργικότητά τους. Η στρατηγική αυτή εφαρμόστηκε σε μια κλινική δοκιμή για ασθενείς με διάχυτα μέσης γραμμής γλοιώματα με μετάλλαξη H3K27M στην οποία παρασκευάστηκαν GD2 CAR κύτταρα, που στόχευαν σε αντίστοιχα καρκινικά (Ayala Ceja et al., 2024).

Οι συμβατικές μέθοδοι παρασκευής CAR-T κυττάρων έχουν μικρή απόδοση με αποτέλεσμα μικρός αριθμός ασθενών να μπορεί να έχει πρόσβαση σε αυτές τις θεραπείες που σώζουν ζωές. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνικές υψηλής απόδοσης και επιταχυνόμενης παρασκευής. Στην εικόνα 19 φαίνονται σχηματικά οι δυο μέθοδοι παρασκευής car T κυττάρων.



Εικόνα 19: Μέθοδοι παρασκευής CAR-T κυττάρων. Η παραγωγή των αυτόλογων CAR-T κυττάρων περιλαμβάνει την απομόνωση των κυττάρων, την ενεργοποίηση Τ κυττάρων, την ενσωμάτωση του διαγονιδίου (mRNA), τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την

τελική διαμόρφωση. Στα περισσότερα προϊόντα γίνεται κρυοσυντήρηση και απόψυξη πριν την έγχυση στον ασθενή. Η διάρκεια των τυπικών διαδικασιών *ex vivo* παρασκευής CAR T κυττάρων είναι 1-2 εβδομάδες. Οι νεότερες επιταχυνόμενες διαδικασίες βραχύνουν αυτό το χρόνο σε 24-72 ώρες. Ωστόσο, ο χρόνος από φλέβα σε φλέβα μπορεί να είναι μεγαλύτερος εξαιτίας του χρόνου που απαιτείται για τη μεταφορά, τον έλεγχο απελευθέρωσης του προϊόντος και κλινικών παραμέτρων του ασθενούς. (Ayala Ceja et al., 2024).

Η αυτοματοποίηση των διαδικασιών θα μπορούσε να μειώσει το κόστος, τα ανθρώπινα λάθη και την πιθανότητα επιμολύνσεων. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να υποστηρίξουν την ιδέα της χορήγησης φρέσκου μη-κρυοσυντηρημένου προϊόντος σε ασθενείς. Έχει δοκιμασθεί με επιτυχία σε κλινική δοκιμή φάσης I σε ασθενείς με non-Hodgkin λέμφωμα, όπου έγιναν σύγκριση χορήγησης φρέσκων και κρυοσυντηρημένων CAR-T κυττάρων CD19/CD20 και έδειξε ότι τα φρέσκα είχαν μεγαλύτερη επιβίωση (Ayala Ceja et al., 2024).

Σε προκλινικές μελέτες έχει δοκιμασθεί επίσης η *in vivo* τροποποίηση των CAR-T κυττάρων αντί για την *ex vivo* τροποποίηση και πολλαπλασιασμό (Ayala Ceja et al., 2024).

Τα CAR-T κύτταρα δρουν με πολλούς μηχανισμούς, όπως ο σχηματισμός της ανοσολογικής σύναψης, η εξωκύττωση και απόπτωση μέσω υποδοχέων Fas προσδέτων (ligands) ή TRAIL, τα κυτολυτικά κοκκία (granules) και η παραγωγή κυτοκινών. Η διάμετρος της ανοσολογικής σύναψης είναι μικρότερη και επιτρέπει την γρηγορότερη απόσπαση των CAR T κυττάρων. Η λύση των καρκινικών κυττάρων από τα CAR T κύτταρα γίνεται από την περφορίνη και το granzyme. Η αποκοκκίωση είναι σημαντική για τη λυτική δράση των CAR T κυττάρων. Η περφορίνη που απελευθερώνεται δημιουργεί πόρους στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας μια οδό για τα granzymes. Τελικώς επάγεται η caspase ανεξάρτητη απόπτωση και εξαρτώμενη από caspase απόπτωση (Sadowski et al., 2022b).

Στον πίνακα φαίνονται τα εγκεκριμένα από το FDA φάρμακα με τη χρήση των CAR-T κυττάρων.

Πίνακας 4. Εγκεκριμένα σκευάσματα CART κυττάρων από το FDA(Sadowski et al., 2022b).

Generic Name	Brand Name	Target Antigen	Targeted Disease	Patient Population
Tisagenlecleucel	Kymriah	CD19	B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Children and young adults with refractory or relapsed B-cell ALL
			B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
Axicabtagene ciloleucel	Yescarta	CD19	B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
			Follicular lymphoma	Adults with relapsed or refractory follicular lymphoma
Brexucabtagene autoleucel	Tecartus	CD19	B-cell acute lymphoblastic leukemia (ALL)	Adults with refractory or relapsed B-cell ALL
			Mantle cell lymphoma (MCL)	Adults with refractory or relapsed MCL
Lisocabtagene maraleucel	Breyanzi	CD19	B-cell non-Hodgkin lymphoma (NHL)	Adults with relapsed or refractory B-cell NHL
Ciltabtagene autoleucel	Carvykti	BCMA	Multiple myeloma	Adults with relapsed or refractory multiple myeloma
Idecabtagene vicleucel	Abecma	BCMA	Multiple myeloma	Adults with relapsed or refractory multiple myeloma

Η χρήση των CAR-T κυττάρων έχει όμως και ορισμένους περιορισμούς. Ένας βασικός περιορισμός είναι η εξάντληση των CAR-T κυττάρων και η γήρανση, που οδηγούν σε δυσλειτουργία τους. Οι κυριότερες επιπλοκές είναι το σύνδρομο απελευθέρωσης κυτοκινών, η νευροτοξικότητα και η νόσος μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (graft versus host disease). Η έκκριση κυτοκινών οδηγεί σε ποικίλα συμπτώματα όπως υψηλό πυρετό, υποξία, υπόταση, ταχυκαρδία, καρδιακή δυσλειτουργία και οργανική ανεπάρκεια. Γίνονται προσπάθειες να τις περιορίσουν με βελτίωση των τεχνικών παρασκευής τους και αποθήκευσης τους (Sadowski et al., 2022b).

Τα CAR-T κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν αρχικά με επιτυχία σε αιματολογικές κακοήθειες αλλά τελευταία η χρήση τους απλώνεται και σε συμπαγείς όγκους όπως του

μαστού, του πνεύμονος , του εντέρου , του παγκρέατος , του προστάτη , σε γλοιώματα εγκεφάλου και σε άλλους όγκους (Rotte et al., 2022).

Γενικά οι κλινικές δοκιμές που τρέχουν με CAR-T κύτταρα είναι πολλές και αφορούν σε πολλές μορφές καρκίνου.

Δ.8 CAR- N κύτταρα

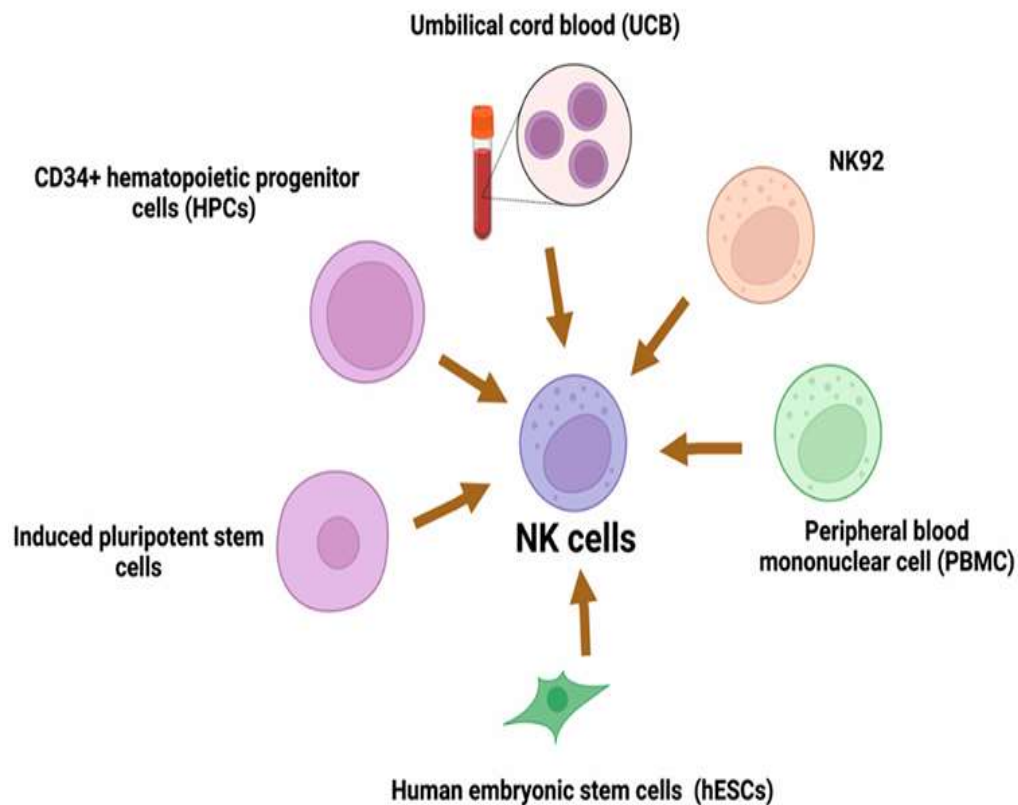
Η χορήγηση των NK-κυττάρων αποτελεί ελκυστική θεραπεία εξαιτίας της ασφάλειας της και της συμβατότητας σε αλλογενή μεταμόσχευση . Αν και τα NK-κύτταρα δεν χρειάζονται MHC για να δράσουν χρειάζονται κυτοκίνες για να ενεργοποιηθούν , να διατηρηθούν και να επικοινωνήσουν με άλλα T κύτταρα και δενδριτικά κύτταρα. Οι κυτοκίνες αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα των NK-κυττάρων (π.χ. ιντερφερόνη-α και tumor necrosis factor TNF) συμβάλλουν στη διατήρηση τους (IL-2,IL-15 ,IL-18) και μπορούν να δράσουν σε συνδυασμό (IL-21 και IL-15). Τα NK -κύτταρα μπορούν να τροποποιηθούν γενετικά ώστε να εκφράσουν χημειοκίτους υποδοχείς αντιγόνων ή να επεξεργασθούν με CRISPR/CAS για απαλοιφή γονιδίων-κλειδιών, που προκαλούν λειτουργική καταστολή (Sadowski et al., 2022b)

Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την απελευθέρωση granzymes και perforins που προκαλούν πόρους στην κυτταρική μεμβράνη και επάγουν την απόπτωση (Wu & Matosevic, 2022).

Κατά την CAR-NK θεραπεία σε πρώτη φάση δίνεται χημειοθεραπεία για τρεις μέρες και μετά από 2 μέρες ο ασθενής λαμβάνει μια μοναδική δόση CAR-NK κυττάρων. Τα CARNK-κύτταρα είναι ευαίσθητα σε ψύξη απόψυξη , γεγονός που περιορίζει την αντικαρκινική τους δράση και την επιβίωση τους. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου πολλές ανοσοκατασταλτικές κυτοκίνες μειώνουν την αποτελεσματικότητα των NK-κυττάρων . Από την άλλη IL-2,IL12 και IL-15 είναι σημαντικές για τη σωστή λειτουργία των NK κυττάρων τόσο στην επίκτητη όσο και στη φυσική ανοσοθεραπεία (Wu & Matosevic, 2022).

Σε αντίθεση με τα CART κύτταρα τα CARNK κύτταρα είναι πιο ασφαλή , προκαλούν μικρότερη νευροτοξικότητα και λιγότερο συχνά προκαλούν σύνδρομο απελευθέρωσης κυτοκινών και νόσο μοσχεύματος έναντι ξενιστή (Wu & Matosevic, 2022).

Οι κύριες πηγές των CARNK κυττάρων φαίνονται στην εικόνα 20



Εικόνα 20: Πηγές CAR-NK κυττάρων (Sadowski et al., 2022b).

Τα NK92 κύτταρα προέρχονται από ασθενείς με non-Hodgkin λέμφωμα και για αυτό απαιτείται ακτινοβολία πριν έγχυση σε ασθενή για την αποφυγή νεοπλασματικής εκτροπής Ένα από τα μειονεκτήματα των NK κυττάρων είναι η μικρής διάρκειας παραμονή στην περιφερική κυκλοφορία μετά από έγχυση . Τα μη τροποποιημένα NK κύτταρα ανιχνεύονται μέχρι και μια εβδομάδα μετά την έγχυση ενώ τα NK92 διαρκούν μόνο 48 ώρες. Για την επίλυση του προβλήματος έχουν δοκιμασθεί και άλλες κυτταρικές σειρές(π.χ.NKL,KHYG-1,YTS ή NKG) (Sadowski et al., 2022b) .

Δ.9 Κυτοκίνες

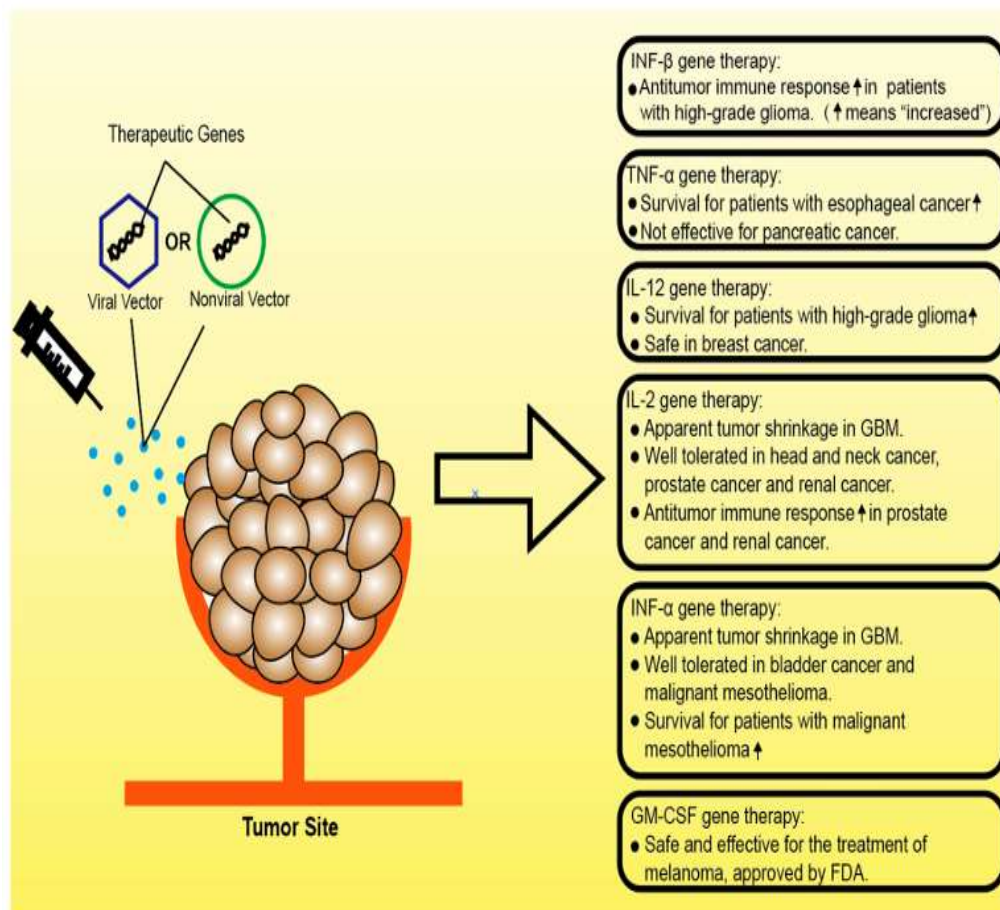
Οι κυτοκίνες εκκρίνονται από τα ανοσοκύτταρα και δρουν σαν τροποποιητές της ανοσιακής απάντησης και της φλεγμονής. Έχει αποδειχθεί ότι αυξημένα επίπεδα τους μπορεί να σχετίζονται με αναστολή της καρκινογένεσης (Lan et al., 2021). Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) σχετίζεται με τη λειτουργία της οικογένειας των πρωτεϊνών STAT για να προάγει την καρκινογένεση και επιπλέον αναστέλλει την απόπτωση και βοηθά στην απελευθέρωση ROS και RNS. Ωστόσο, η στόχευση της IL-6 δεν έχει ακόμη μπει

στην αντικαρκινική θεραπεία (Lan et al., 2021). Αντίθετα, οι IL-2 και IL-12 έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες και έχουν δοκιμασθεί με επιτυχία σε καρκίνο του πνεύμονα. Ο tumor necrosis factor α (TNF α) και ο tumor transforming growth factor β επάγουν την απόπτωση την καταστολή της αγγειογένεσης, των μεταστάσεων και της EMT. Οι χυμοκίνες καταστέλλουν την ανάπτυξη του καρκίνου με παρόμοιους μηχανισμούς. Το γονίδιο c-c motif chemokine ligand 21(CCL-21) εισάχθηκε σε δενδριτικά κύτταρα μέσω αδενοϊού και χρησιμοποιήθηκε σαν αντικαρκινικό εμβόλιο σε μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνευμονος (κλινική δοκιμή φάσης I NCT01574222) (Lan et al., 2021). Οι ιντερφερόνες έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες καθώς επάγουν την απόπτωση και πετυχαίνουν τη μείωση της αύξησης του όγκου μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα STAT 3 (Lan et al., 2021). Η ιντερφερόνη α έχει εγκριθεί από το FDA για τη θεραπεία του καρκίνου και της ηπατίτιδας (Intron, referon) (Lan et al., 2021). Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται μια σύνοψη των πιο σημαντικών κυτοκινών στην αντικαρκινική θεραπεία.

Πίνακας 5 .Κυτοκίνες που χρησιμοποιούνται στην αντικαρκινική θεραπεία - μηχανισμός δράσης (Dholakia et al., 2022).

Agents	Mechanism or action
IL-2 (interleukin-2)	CD8+ T cell, NK cell activation T cell differentiation
IFN- α (interferon alpha)	Increased tumor HLA expression
IL-12 (interleukin-12)	Th1 cell differentiation, enhanced activity of NK and CD8+ cytotoxic T cells, anti-angiogenesis
G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor)	Stimulates bone marrow granulocyte production and release
GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)	Stimulates diverse hematologic cells including dendritic cells
IL-10 (interleukin-10)	Enhances B cell survival and activity, enhances CD8+ cytotoxic T cell function
IL-8 (interleukin-8)	Neutrophil chemotaxis
IL-15 (interleukin-15)	Maintenance of memory T cells, NK cell development
IL-21 (interleukin-21)	Enhances CD8+ T cell function
TGF- β (transforming growth factor beta)	Stops cell proliferation and promotes apoptosis

Στη γονιδιακή θεραπεία με γονίδια κυτοκινών εκμεταλλευόμαστε την αντικαρκινική δράση που επάγουν , όπως φαίνεται στην εικόνα 21



Εικόνα 21. Κυτοκίνες που χρησιμοποιούνται στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου. (Lan *et al.*, 2021)

Οι κλινικές δοκιμές με γονιδιακές θεραπείες με κυτοκίνες φαίνονται στον πίνακα

Πίνακας 6.Κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας με κυτοκίνες. (Lan et al., 2021)

Table 1. Important previous or ongoing clinical trials with inflammatory cytokine gene therapies.

	Cytokine Genes	Transfer Vector	Cancer Applications	Phase	Key Publication or clinicaltrials.gov No.
TNF	TNF- α	Adenovirus	Prostate cancer	II	NCT01048151
	TNF- α	Adenovirus	Pancreatic cancer	III	NCT00051467
	TNF- α	Adenovirus	Esophagus cancer	II	NCT00051480
	TNF- α	Adenovirus	Head and neck cancer	I/II	NCT00496535
	TNF- α	Adenovirus	Rectal cancer	II	NCT00137878
	TNF- α	Adenovirus	Melanoma	II	NCT00261404
	TNF- α and IL-2	Adenovirus	Melanoma	I	NCT04217473
IL	IL-12	Adenovirus	Glioma	I	NCT02026271 [36]
	IL-12	Adenovirus	Breast cancer	II	NCT04095689
	IL-2	Plasmid	Head and neck cancer	I	[73]
	IL-2	Adenovirus	Prostate cancer	I	[74]
	IL-2	Plasmid	Prostate cancer	I	[75]
	IL-2	Cationic lipid	Renal cancer	I/II	[76]
IFN	IFN- α 2b	Adenovirus	Bladder cancer	II	[77] NCT01687244
	IFN- α 2b	Adenovirus	Mesothelioma	I	[78] NCT01119664
	IFN- β	Adenovirus	Glioma	I	[79]
	IFN- β	Adenovirus	Pleural malignancies	I	NCT00299962
GM-CSF	GM-CSF	Vaccinia virus	Melanoma	Not reported	[80]
	GM-CSF	Oncolytic virus	Head and neck cancer; breast cancer; melanoma; gastrointestinal cancer	I	[81]
	GM-CSF	Oncolytic virus	Melanoma	II	[82]
	GM-CSF	Oncolytic virus	Melanoma	III	[83]

Δυο είναι τα βασικά μειονεκτήματα της γονιδιακής θεραπείας με κυτοκίνες. Πρώτον η γρήγορη αποδόμηση μέσα στον οργανισμό, που απαιτεί συνεχή χορήγηση σε μεγάλες δόσεις και δεύτερον η πολύ-οργανική συστηματική τοξικότητα που μπορούν να προκαλέσουν. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί νέα συστήματα μεταφοράς των γονιδίων, που κατευθύνουν το γονίδιο στο στόχο και μειώνουν τις παρενέργειες και τη ανάγκη για μεγάλες δόσεις (Dholakia et al., 2022). Αυτές συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα .

Πίνακας 7. Συστήματα μεταφοράς γονιδίων κυτοκινών ,μηχανισμός δράσης, πλεονεκτήματα και προκλήσεις από την κλινική χρήση τους (Dholakia et al., 2022).

Delivery system	Mechanism of action	Advantages	Challenges to clinical use
Pegylated cytokines	Polyethylene glycol (PEG) bonding of cytokines	Increases half-life in circulation, prolonging dosage intervals	Pegylation may change cytokine conformation, prohibitively increasing size and movement
Plasmid nanoparticles	Plasmid administration encoding target cytokine	Facilitates synthesis of cytokine instead of potentially systemic administration	Plasmid development and effective delivery that provokes response
Immuno-cytokine drug conjugates	Antibody-driven targeting to tumor-specific markers	Allows specific targeting to the tumor microenvironment	Requires tumor-specific markers
Nonviral nanoparticles	Facilitate delivery of therapeutics	Stabilize cytokines <i>in vivo</i> , less immunogenic, limited toxicity	Limited human trials
Viral systems	Immune-driven response to tumor infection and changes in TME	Preferential infection of malignant cells	Identifying appropriate targets within TME
AcTazines (Activity-on-Target Cytokines)	Modified cytokine attached to delivery system targeting cell-specific markers	Limited systemic impact, localized payload delivery	Requires tumor-specific antigens or cell-specific markers

Η pegylation είναι η σύνδεση πρωτεϊνών με πολυμερή πολυαιθυλενικής γλυκόλης, γεγονός που μειώνει την αποδόμηση της και αυξάνει τα επίπεδα της κυτοκίνης στην κυκλοφορία. Με την αλλαγή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης μπορεί να αλλάξει η δραστηριότητα της και η βιοδιαθεσιμότητα της (Dholakia et al., 2022) .

Η δημιουργία συμπλόκων με αντισώματα ή αναστολείς σημείων ελέγχου δοκιμάζεται σε κλινικές μελέτες με επιτυχία. Αν και στοχεύει ειδικά στο μικροπεριβάλλον του όγκου απαιτεί ειδικούς καρκινικούς δείκτες (Dholakia et al., 2022).

Πλασμιδιακά νανοσωματίδια, που κωδικοποιούν κυτοκίνες διευκολύνουν τη δημιουργία των κυτοκινών αντί για τη συστηματική τους χορήγηση, αλλά απαιτούν τεχνικές δυσκολίες στην παρασκευή των πλασμιδίων (Dholakia et al., 2022)

Τα μη ιϊκά νανοσωματίδια είναι λιγότερο τοξικά, ανοσογονικά και σταθεροποιούν τις κυτοκίνες *in vivo* (Dholakia et al., 2022).

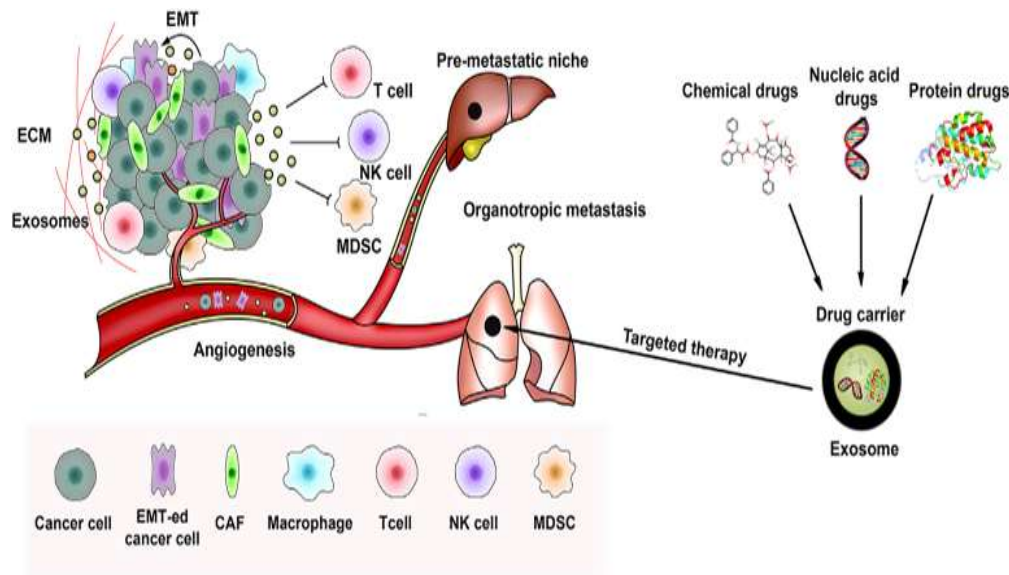
Οι ιϊκοί φορείς έχουν το πλεονέκτημα ότι μολύνουν εκλεκτικά τα κακοήθη κύτταρα.

Τα συστήματα AcTazines (Activity on target cytokines) απαιτούν ειδικά καρκινικά αντιγόνα ή καρκινικούς δείκτες με τους οποίους συνδέεται η κυτοκίνη και έτσι περιορίζεται η συστηματική της δράση (Dholakia et al., 2022).

Δ.10.Θεραπεία που στοχεύει σε εξωσώματα που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα.

Τα εξωσώματα είναι κυστίδια διαμέτρου περίπου 100 nm, που περιβάλλονται από διπλοειδική λιπιδική μεμβράνη και βρίσκονται σε όλα τα υγρά του οργανισμού. Ρυθμίζουν την ενδοκυτταρική επικοινωνία τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και κατά την εξέλιξη διαφόρων νοσημάτων (J. Liu et al., 2021).

Περιέχουν DNA, RNA ,πρωτεΐνες και λιπίδια συνήθως ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου από τον οποίο προέρχονται. Σήμερα υπάρχουν τρεις βάσεις δεδομένων με τα περιεχόμενα των εξωσωμάτων, η Vesiclepedia (<http://microvesicles.org/index.html>) ,η Exocarta (<http://exocarta.prg/index.html>) και η EVpedia (<http://evpedia.info>) Τα εξωσώματα που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην πρόκληση μεταστάσεων αλληλεπιδρώντας με καρκινικά κύτταρα , επιθηλιακά κύτταρα και ανοσοκύτταρα. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη στοχευμένη θεραπεία σαν φορείς μικρών μακρομοριακών φαρμάκων , νουκλεϊνικών οξέων και πρωτεϊνών .Στην εικόνα 22 φαίνεται σχηματικά ο ρόλος τους στις μεταστάσεις και στη στοχευμένη θεραπεία.



Εικόνα 22.Τα εξωσώματα προάγουν τη μετατροπή από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο ,τον επανασχεδιασμό της εξωκυττάριας ουσίας και την αγγειογένεση. Βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να αποφύγουν την ανοσοεπιτήρηση και να σχηματίσουν προμεταστατικές εστίες αποικίζοντας μακρινά όργανα. Θεραπευτικά μπορούν να φορτωθούν με πρωτεΐνες μακρομόρια ή νουκλεϊνικά οξέα στα πλαίσια της στοχευμένης

θεραπείας (*targeted therapy*) (J. Liu et al., 2021) .

Στον πίνακα 8 φαίνονται τα φάρμακα που μπορούν να φορτωθούν στα εξωσώματα .

Πίνακας 8 Φάρμακα που φορτώνονται σε εξωσώματα (J. Liu et al., 2021).

Table 2 Drug-loaded exosomes in cancer therapy.		
Drug type	Drug loading method	Therapy
Small molecule chemical drugs	Drugs-exosomes co-cultivating	Paclitaxel-loaded exosomes target to pancreatic cancer
	Drugs-cells co-cultivating	Doxorubicin-loaded exosomes target to breast cancer
Proteins	Expression of target protein after transfection	CD-UPRT-loaded exosomes target to schwannomas
Nucleic acids	Saponin-assisted	
	Electroporation	RAD51 siRNA-loaded exosomes target to cervical
	Liposome transfection	cancer miR-122-loaded exosomes target to HCC

Το Paclitaxel προστέθηκε σε καλλιέργεια μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων που προέρχονται από το μυελό των οστών MSCs , τα κύτταρα αυτά πήραν το φάρμακο και απελευθέρωσαν εξωσώματα, που το περιείχαν. Τα εξωσώματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία σε καρκίνο του παγκρέατος. Εξωσώματα που μετέφεραν δοξορουβικίνη και προέρχονταν από ανώριμα δένδριτικά κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για θεραπεία καρκίνου του μαστού. Εξωσώματα που μετέφεραν συνδυασμό 5-fluoracil με cytosine deaminase -uracil phosphatidyltransferase (CD-UPRT) mRNA/πρωτεΐνη ανέστειλαν την ανάπτυξη σβανωμάτων σε ποντίκια (J. Liu et al., 2021).

Τα εξωσώματα χρησιμοποιήθηκαν επίσης ως φορείς si RNAs , τα οποία αποδομούνται ευκολά στην κυκλοφορία ενώ μέσα στα εξωσώματα παραμένουν προστατευμένα. Μια μελέτη έδειξε ότι εξωσώματα από κυτταρική σειρά HeLa μετέφερε RAD51 si RNA σε κύτταρα καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, που προκάλεσαν το θάνατο τους . Σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο εξωσώματα από MSCs μετέφεραν το ογκοκατασταλτικό miR-122, που επάγει την αυτοφαγία και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και έτσι το θάνατο των καρκινικών κυττάρων.(J. Liu et al., 2021) Οι Kamerkar και συν δοκίμασαν σε κλινική δοκιμή φάσης I εξωσώματα που εκκρίνονταν από μεσεγχυματικά κύτταρα fibroblast-like ,τα οποία περιείχαν si RNA ή sh RNA έναντι του μεταλλαγμένου KRAS G12D σε καρκίνο του παγκρέατος.(NCT03608631) (J. Liu et al., 2021) .

Εκτός από φορείς φαρμάκων τα εξωσώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία του καρκίνου και με άλλους τρόπους, όπως δείχνει ο πίνακας 9

Πίνακας 9 Θεραπευτικές εφαρμογές των εξωσωμάτων (H. Chen et al., 2021)

Table 3 Therapeutic implications <i>via</i> targeting TEXs.	
Mechanism	Case
Inhibition of TEXs release	Targeting Rab27a Targeting Munc13-4 Targeting nSMase2
Removal of circulating TEXs	Aethlon Hemopurifier® Anti-CD9/anti-CD63 antibodies
Blocking interaction of TEXs with recipient cells	Targeting fibronectin/heparan interaction Targeting HSP70/TLR2 interaction Targeting exosome endocytosis
Harnessing TEXs as therapeutic carriers to treat cancer and its metastasis	TEXs delivery with nucleic acids (<i>e.g.</i> , siRNA against RAD51 and RAD52) TEXs delivery with chemotherapeutics (<i>e.g.</i> , doxorubicin, MTX, cisplatin and paclitaxel) TEXs delivery with nanoparticles (<i>e.g.</i> , iron oxide nanoparticles) TEXs to boost immune response

Ένας τρόπος είναι η αναστολή της απελευθέρωσης των εξωσωμάτων των καρκινικών κυτταρων TEXs στοχεύοντας σε knock down γονιδίων, που είναι απαραίτητα για τη βιογένεση και λειτουργία των εξωσωμάτων, όπως Rab27a , Munc13-4 και aSMase2 . Ένας άλλος τρόπος είναι η απομάκρυνση των TEXs από την κυκλοφορία με τη χρήση των αντισωμάτων αντί-CD9/και αντί-CD63. Τέλος, ένας άλλος τρόπος είναι το μπλοκάρισμα της αλληλεπίδρασης των TEXs με τα κύτταρα δέκτες. Τα TEXs συνδέονται με Toll-like υποδοχείς στα κύτταρα του μυελού. Ο Gobbo και συν έδειξε ότι με τη χρήση πεπτιδίου aptamer AS, που συνδέεται με heat shock πρωτεΐνη 70(HSP70)και στοχεύει σε εξωσώματα μειώνεται η αύξηση του όγκου σε ποντίκια. Η αναστολή της ενδοκύττωσης των εξωσωμάτων εφαρμόζεται επίσης στην αντικαρκινική θεραπευτική (H. Chen et al., 2021).

Ε. Συστήματα μεταφοράς γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο

E.1 Γικοί φορείς .

DNA ιοί

Αδενοϊοί

Η πλειοψηφία των ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε θεραπεία με αδενοϊούς ως φορείς τους έλαβαν με σκοπό την αντικατάσταση ενός ελαττωματικού γονιδίου P53. Σε ασθενείς με NSCLC στους οποίους έγινε ένεση μέσα στον όγκο με αδενοϊούς σε δόση 107-108 μονάδες , το γένωμα του ιού ανιχνεύονταν μέχρι και 90 μέρες μετά. Ενδοκυτταρική εμφύτευση Αδενοϊού P53 με ένα παράγοντα, που επάγει τη μεταγωγή (transduction) είναι ασφαλής και αποτελεσματική σε καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Απευθείας ενδοβρογχική ένεση AdP53 σε NSCLC είναι ασφαλής αλλά χρειάζεται περαιτέρω έρευνα. Γενικά οι αδενοϊοί χρησιμοποιούνται ως φορείς σε καρκίνους του ήπατος, των ωοθηκών και το πρώτο γονιδιακό φάρμακο το Gendicine για τον καρκίνο της κεφαλής και τραχήλου είχε αδενοϊό ως φορέα (Zotting Gayatri Subhash et al, 2022). Οι αδενοϊοί ως φορείς διαγονιδίων χρησιμοποιούνται στο 50% των κλινικών μελετών παγκοσμίως . Η ένεση HAdv που κωδικοποιεί γονίδια ιντερλευκίνης -12 πέτυχε τη μείωση του όγκου και την επιβίωση των ασθενών σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο αλλά όχι σε άλλους όγκους του γαστρεντερικού στην ίδια δόση . Οι αδενοϊοί δοκιμάζονται σε πολλές κλινικές δοκιμές αλλά τα αποτελέσματα είναι φτωχά κυρίως λόγω της ανοσογονικότητας των ιών , που επάγει την παραγωγή αντισωμάτων και την ενεργοποίηση της κυτταρικής ανοσίας με αποτέλεσμα την ανεπαρκή μεταφορά του διαγονιδίου στα κύτταρα-στόχο(Dogbey et al., 2023). Τα CAR-T κύτταρα με τη χρήση ενός αδενοϊού που παράγει μια κυτοκίνη , ένα αναστολέα σημείων ελέγχου ή ένα μακρομόριο ειδικό για T κύτταρα, που στοχεύουν στον όγκο αυξάνουν την ισχύ και τη διάρκεια τους. Η έκφραση της p FAST από ένα αδενοϊό μπορεί να προκαλέσει ένα ευρύ σχηματισμό ιϊκών συγκυτίων, να μειώσει την ανάπτυξη του όγκου και να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα του ιού ως μεταφορέα στην αντικαρκινική θεραπεία.

Αδενοσυσχετιζόμενοι ιοί

Η ιδιότητα τους να διαμολύνουν μη διαιρούμενα κύτταρα και η μικρή ανοσοντίδραση που προκαλούν τα έκανε χρήσιμα για κλινικές δοκιμές θεραπείας πολλών νοσημάτων όπως κυστική ίνωση , θαλασσαιμία , Parkinson ,καρκίνος. Πρόσφατα σε προκλινικές δοκιμές r AAV9 σαν φορέας γονιδίου αυτοκτονίας και ganciclovir είχε κυτταροτοξικά αποτελέσματα σε καρκίνους της ουροδόχου κύστεως . Το μικρό μέγεθος διαγονιδίου, που μπορεί να φιλοξενήσει 4,7 kb είναι ένας περιορισμός καθώς και η χαμηλή παραγωγικότητα και η εξάρτηση από βοηθητικούς ιούς για να δράσει (Dogbey et al., 2023b).

Αδενοσυσχετιζόμενος ιός AAV2-shE6E7 που κωδικοποιεί ένα sh RNA ,το οποίο στοχεύει στις πρωτείνες E6 και E7 του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) έχει αποδειχθεί ότι εξαφανίζει τα καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας τόσο in vivo όσο και in vitro. AAVs ως υβρίδια με φάγους μεταφέρουν διαγονίδια σε καρκινικά κύτταρα επιτυχώς (bin Umair et al., 2022b).

Ερπητοϊοί

Μία γονιδιακή θεραπεία HSV-TK ,που ενεργοποιεί με φωσφορυλίωση το ganciclovir έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ποντίκια με xenografts από NSCLC. Μια μόνο ενδομυϊκή ένεση του HSV1716, ενός ογκολυτικού ιού έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε παιδιά με ανθεκτικούς υποτροπιάζοντες συμπαγείς όγκους. Εξασθενημένοι ογκολυτικοί ερπητοϊοί έχουν χρησιμοποιηθεί σε μοντέλα ζώικα για διαφορους καρκίνους όπως παιδιατρικοί όγκοι εγκεφάλου, καρκίνος του μαστού και διάφοροι γαστρικοί καρκίνοι. (bin Umair et al., 2022b).

Ιοί ευλογιάς (Pox viruses)

Απομακρύνοντας το F1L γονίδιο από τον ιό του εμβολίου της ευλογιάς αυξάνεται η ογκολυτική δράση και η ασφάλεια του , όπως αποδείχθηκε σε κυτταρική σειρά γλοιοβλαστώματος . Επίσης διαχέεται στην κυκλοφορία και μπορεί να αντιμετωπίσει μακρινές μεταστάσεις , όπως φάνηκε σε προ κλινικές μελέτες . Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν φορείς του γονιδίου της θυμιδινικής κινάσης στη θεραπεία αυτοκτονίας (bin Umair et al., 2022b).

RNA ιοί

Λεντιϊοί

Ανήκουν σε μια από τις τρεις οικογένειες των ρετροϊών Μπορούν να δεχθούν μεγάλα διαγονίδια και έχουν υψηλή ικανότητα μεταγωγής για αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της Duchenne, της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, της σχετιζόμενης με την ηλικία εκφύλισης της ωχράς κηλίδας, της χρόνιας κοκκιωματώδους νόσου. Στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου χρησιμοποιώντας ένα λεντιϊό ως φορέα με IDLVs που μεταφέρει ovalbumin (OVA) σαν μη-ίδιο αντιγόνο η ανάπτυξη του όγκου εξαφανίστηκε μετά από μια και μόνο ανοσοποίηση (bin Umair et al., 2022b).

Άλλοι ρετροϊοί

Ο Toca511 είναι ένας ειδικός για όγκους ρετροϊός που κωδικοποιεί την κυτοκίνη δεαμινάση και είχε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ασθενείς με υψηλού βαθμού γλοιώματα . Η αντιγραφή του MoMLV-VSV-G φορέα έδειξε κυτταροτοξικότητα σε

ραβδομυοσαρκώματα και καρκίνο του προστάτη . Ο ογκολυτικός foamy virus (ο FV) ,ένας μη παθογόνος ρετροϊός μείωσε την αύξηση του όγκου σε xenografts ενδοπεριτοναικού καρκίνου των ωοθηκών . Κλινικές δοκιμές σε ασθενείς με γλοιώματα και μεταστατικό καρκίνο του εντέρου με Toca511 και Toca 5c είχαν καλά αποτελέσματα (bin Umair et al., 2022b).

Άλφα ιοί

Το 2017 το στέλεχος SVF-VA7 βρέθηκε ότι σκοτώνει κύτταρα σειράς καρκίνου του προστάτη . Ένα άλλο στέλεχος SVF με αντιγόνα ογκογονίδια του HPV E6,E7 έδειξε αντικαρκινική δράση και 85% των ποντικών μετά από 108 μέρες ήταν ελεύθερα καρκίνου. Ο M1 alpha ιός σκοτώνει εκλεκτικά τα κύτταρα του καρκίνου της ουροδόχου κύστεως προκαλώντας απόπτωση και όχι φυσιολογικά κύτταρα .Ο SVF-AM6-124T ,που είναι ανθεκτικός σε IFN-1 , μαζί με αντι -PD1 αύξησε τα CD8+ κύτταρα και τη διήθηση με ανοσοκύτταρα σε γλοιώματα (bin Umair et al., 2022b) .

Το εμβόλιο Vnax001 αποτελείται από σωματίδια ιού Semlinski forest που κωδικοποιούν αντιγόνα E6 και E7 του HPV και σε κλινική δοκιμή φάσης I το 2020 βρέθηκε να είναι ασφαλές καλά ανεκτό και να παράγει ανοσοαπάντηση με CD+4 ,CD+8 έναντι των E6 και E7 αντιγόνων (bin Umair et al., 2022b).

Ιός Newcastle

Σαν χίμαιρα από Newcastle και ιό αφθώδους στοματίτιδας έδειξε κυτταροτοξική δράση σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Σε μια άλλη μελέτη με ανασυνδυασμένο ιό ογκολυτικό NDV φορέα, που περιέχει συνδέτη, που επάγει την απόπτωση μέσω παράγοντα νέκρωσης του όγκου -tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) έδειξε καταστροφή των κυττάρων ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Καταστολή της αύξησης του όγκου σε γλοιώματα έδειξε η χορήγηση r NDV, που μετέφερε p53 . Μια in vivo μελέτη με r NDV-TV σαν εμβόλιο έδειξε αποδόμηση του ινοσαρκώματος WEHI164. Εμβόλια που αποτελούνται από R NDV και IL-12 αποδείχθηκαν αποτελεσματικά σε ζωικά μοντέλα με καρκίνο του μαστού ,του εντέρου και σε μελάνωμα. Ενώ ένα εμβόλιο που έκφραζε μαζί IL-17 , IL-15 ήταν αποτελεσματικό σε μελάνωμα σε ποντίκια (bin Umair et al., 2022b).

Picornavirus ιοί

Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος ανοσοθεραπευτικός και ογκολυτικός ιός είναι ο ιός coxsackievirus. Το στέλεχος CAVATAK (CVA21)μαζί με ipilimumab έδειξε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ασθενείς με προχωρημένο μελάνωμα, που ελάμβαναν αντι-PD1

θεραπεία σε κλινική δοκιμή φάσης I. Σε φάση II χορηγήθηκε CVA-21 με ipilimumab χωρίς προηγούμενη θεραπεία και ήταν αποτελεσματική και ασφαλής. CAVATAC με υποθεραπευτική δόση μιτομυκίνης C ήταν αποτελεσματική σε καρκίνο της ουροδόχου κύστεως. Σε προχωρημένο μελάνωμα Cavatac με pembrolizumab έδειξε ογκολυτική δράση Ένα πλασμίδιο picorna ιού με τροποποίηση του P2A ώστε να εκφράζει IL-12 έδειξε τη θεραπευτική του δράση έναντι των καρκινικών κυττάρων. Ένας picorna ιός Seneca Valley virus σε εξασθενημένη μορφή δόθηκε σε ενδοφλέβια δόση 107-1011 σωματίδια ανά κιλό σε 36 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος, σε νευροενδοκρινείς όγκους και σε καρκινοειδή σε μια κλινική μελέτη φάσης I με θετικά αποτελέσματα. Παρόμοια αποτελέσματα είχε η χορήγηση 107 σωματιδίων ανά κιλό σε φάση II σε 40 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος (bin Umair et al., 2022b).

Ιός ιλαράς

Τροποποιημένος ιός MeV-Stealth χρησιμοποιείται σε καρκίνο των ωοθηκών σε ποντίκια. Ιός που κωδικοποιεί L-12 είχε ισχυρή αντικαρκινική δράση σε καρκίνο του κόλου σε αρουραίους. Ένα στέλεχος ιού Edmonston, που εκφράζει ανθρώπινο νατριούχο symporter ή καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο χρησιμοποιήθηκε σαν ογκολυτικό μέσο σε ηπατοκυτταρικού καρκίνου σειρές. Ένας ανασυνδυασμένος ιός π.χ. SLAM-blind ιός ιλαράς, έδειξε αντικαρκινική δράση σε xenografts σε ποντίκια και είναι μια υποσχόμενη θεραπεία για μεταστατικό και νεκτιν-4 τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Σε ασθενείς με πολλαπλού μυέλωμα μια αυξημένη απάντηση ειδικών σε αντιγόνα T κυττάρων παρατηρήθηκε μετά από την ογκολυτική θεραπεία με ιό ιλαράς (bin Umair et al., 2022b). Έχει χρησιμοποιηθεί για εμβόλια έναντι του ZIKA και το SARS-COVID.

E.2 Νανοσωματίδια

Μεταλλικά νανοσωματίδια

Ο Rou και συν χρησιμοποίησαν AuNPs-νανοσωματίδια από χρυσό- για να μεταφέρουν RNA aptamers ειδικών για το γονίδιο της β-κατενίνης στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την αναστολή της μεταγραφικής δράσης της β-κατενίνης στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων του πνεύμονος και επομένως την απόπτωση. Τα AuNPs χρησιμοποιήθηκαν για τη μεταφορά επίσης si RNAs Βασικό

εμπόδιο στη τεχνική αυτή είναι η συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων μετά τη σύνδεση με τα νουκλεϊνικά οξέα. Ο Elbakry και συν το ξεπέρασε με την τοποθέτηση των si RNAs στο χρυσό σε διαδοχικά στρώματα. Ακόμη νανοράβδοι nanorods χρησιμοποιήθηκαν για να μειώσουν την έκφραση πρωτεϊνών όπως πρωτεϊνική φωσφατάση, ERK και DARPPP-32 στο ντοπαμινεργικό σηματοδοτικό μονοπάτι του εγκεφάλου, που έχει κάποιο αποτέλεσμα σε θεραπείες καρκίνου και εξαρτήσεις φαρμάκων.

AuNPs, που φέρουν ολιγονουκλεοτίδια αντινοσηματικά έναντι του BCR-ABL mRNA, ένα mRNA σύντηξης, που μεταφράζεται σε δραστική κινάση της τυροσίνης και παίζει ρόλο στη λευχαιμογένεση, προκαλούν αποτελεσματική αποσιώπηση και αύξηση του K562 κυτταρικού θανάτου.

Ο Abriga -Gonzalez και συν εξέτασαν την αποτελεσματικότητά της διαμόλυνσης με DNA με χρήση AuNPs στη σύνθεση των οποίων χρησιμοποιήθηκε και chitosan, acylated chitosan και ολιγοσακχαρίτης chitosan σε HEK-293 κύτταρα και βρήκαν ότι τα σύμπλοκα με ολιγοσακχαρίτη chitosan ήταν πιο δραστικά (Roma-rodrigues et al., 2020).

Χρησιμοποιούνται τόσο στη διάγνωση όσο και στη θεραπεία του καρκίνου. Η χρήση PEI στην παρασκευή τους βοηθά στη είσοδο τους στα κύτταρα και στη απελευθέρωση τους από τη δράση λυσοσωμάτων. Ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποιούν γυμνό DNA καλυμμένο με νανοσωματίδια σιδήρου και ένα έξυπνο κολοειδή νανοφορέα για διαμόλυνση μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων αίματος. Για τη διευκόλυνση της εισόδου του DNA στα κύτταρα εφαρμόζεται μαγνητικό πεδίο.

Ο Kim και συν έδειξαν ότι η εφαρμογή μαγνητικού πεδίου και η χρήση SPIONS οδηγεί στην απόπτωση τα καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον τα νανοσωματίδια σιδήρου φορτωμένα με siRNAs για θεραπεία γονιδιακής αποσιώπησης μπορούν να αναπτυχθούν εξαιτίας του μικρού μεγέθους και της ευκολίας τροποποίησης των νανοσωματιδίων. Τελευταία νανοσωματίδια κατασκευασμένα από οξείδια σιδήρου χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με μαγνητοθεραπεία για θεραπεία B κυττάρων - λεμφώματος με επιτυχία. Στον πίνακα συνοψίζονται τα μεταλλικά νανοσωματίδια που βρίσκουν εφαρμογή στη θεραπεία του καρκίνου.

Πίνακας 10.Μεταλλικά νανοσωματίδια και εφαρμογή τους στην εξάλλειψη του καρκίνου (Roma-rodrigues et al., 2020).

Type of Nanoparticle	Description	Implication in Tumor Eradication		Reference
		In Vitro	In Vivo	
Gold	AuNP ¹ with NLS ² -peptide-target, designed to inhibit miR-211 and NCL ³ function in AML ⁴ cells	Effective silencing of the NCL/miR-211/NFkB/DNMT1 pathway, with synergistic blockage of AML cell proliferation and colony formation	Extension of AML mice survival, lower white blood cells, metastases to lungs and blasts in bone marrow and reversed splenomegaly	[187]
Gold	AuNPs wrapped in dsDNA ⁵ loops from pEGFP ⁶ to retinal pigment epithelium cells	DNA-AuNPs were faster internalized/uptaken than liposome complexes		[188]
Gold	PEGylated AuNP functionalized with antisense oligonucleotide against BCR-ABL mRNA	Decreased proliferation and cell viability in chronic myeloid leukemia cell lines		[18]
Gold	AuNP functionalized with chitosan oligosaccharide and pIRES ₂ -EGFP or pSV-β-Gal plasmids	Green/one-pot synthesis of chitosan-AuNPs without toxic chemical reagents, showed increased transfection of pDNA into HEK-293 cell line.		[176]
Iron	Oxide iron NPs to deliver siRNA targeting BCL-2 in oral cancer cells	Reduced cell viability and relative cell migration in Ca9-22 cell line.		[184]
Iron	SPIONs ⁷ with chitosan-graft-PEI and PK11195 as gene carriers targeting the mitochondria	Reduced cell viability of tumor cell lines A549, KB and Hella, via alteration of mitochondrial metabolism, and under an external magnetic field, increased the apoptotic pathway.		[186]

¹ AuNP: gold nanoparticle (NP), ² NLS: nuclear localization signal, ³ NCL: nucleolin, ⁴ AML: acute myeloid leukemia. ⁵ dsDNA: double stranded DNA. ⁶ pEGFP: enhanced green fluorescent protein plasmid. ⁷ SPIONs: superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

Νανοσωματίδια από άνθρακα

Μπορούν και διαπερνούν βιολογικές μεμβράνες και ο Al-Jamal και συν τα χρησιμοποίησε για να διαπεράσει τη μεμβράνη των νευρώνων σε αρουραίους μεταφέροντας RNA και προκάλεσε μείωση της caspase -3, που ενέχεται στην απόπτωση . Η χρήση τους περιορίζεται από την τοξικότητα τους για τη μείωση της οποίας έχουν χρησιμοποιήσει την εισαγωγή μιας ομάδας αμινοξέων για να ελαττώσουν την υδροφοβική τους ιδιότητα (Roma-rodrigues et al., 2020).

Μια άλλη ομάδα νανοσωματιδίων είναι αυτά, που κατασκευάζονται από γραφίτη και στα οποία για τη σύνθεση τους χρησιμοποιείται PEI ή PEG με σκοπό να μειωθεί η τοξικότητα τους. Ο Huang και συν χρησιμοποίησε νανοσωματίδια από γραφίτη μαζί με si RNA για να επιτεθεί σε υποδοχέα χυμοκίνης τύπου 4 σε καρκινικά κύτταρα μαστού μειώνοντας τόσο τα επίπεδα mRNA όσο και πρωτεΐνης (Roma-rodrigues et al., 2020)

Λιποσωματίδια

Τα λιποσωματίδια μπορούν να τροποποιηθούν επιφανειακά με προσθήκη πεπτιδίων , γλυκανών και αντισωμάτων για να στοχεύσουν τα καρκινικά κύτταρα . Τέτοιος δείκτης είναι ο HER2 για κύτταρα καρκίνου του μαστού , όπου εκφράζεται μέχρι και 1000 φορές περισσότερο από ό,τι σε φυσιολογικά κύτταρα . Τα καρκινικά ηπατοκύτταρα εκφράζουν υποδοχείς τρανσφερρίνης μέχρι και 2780 φορές περισσότερο από τα φυσιολογικά. Ο Wang και συν παρασκεύασαν λιποσωματίδια με τρανσφερρίνη για τη στοχευμένη μεταφορά του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης, που χορηγείται υποδορίως για τη θεραπεία ηπατικού καρκίνου σε xenografts ποντικών (Dogbey et al., 2023b) Τα λιποσωματίδια μπορούν να διευκολύνουν την μεταφορά του DNA με αλλαγή στο Ph , στη φωτοευαισθησία και στη θερμοκρασία (Kanvinde et al., 2022) Ο Chen και συν ανέπτυξαν ένα νανοσύμπλοκο από λιποσωματίδια (p53/C-r NC/L-FA) για την ενδοκυττάρια μεταφορά του αποπτωτικού κυττοχρώματος -c και ενός πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p53. Αυτό προκαλεί απόπτωση σε κυτταρικές σειρές και αναστολή της αύξησης σε καρκίνο του μαστού σε ζωικό μοντέλο ποντικού. Παρόμοιο αποτέλεσμα είχε η χορήγηση από τον Zuo και συν συμπλόκου λιποσωματίδιου με χοληστερόλη, που προέρχεται από EGF και DOPE για τη μεταφορά του p53 σε κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών (Roma-rodrigues et al., 2020).

Τα λιποσωματίδια χρησιμοποιούνται ευρέως και σε εφαρμογές CRISPR /CAS9 . Ο Hosseini και συν ανέπτυξε νανοσωματίδια πλούσια σε χοληστερόλη τα οποία μετέφεραν πλασμίδια Cas9/sg RNA διαμόλυναν κυτταρικές σειρές HEK293, που εκφράζαν GFP και προκάλεσαν knock out του GFP (Roma-rodrigues et al., 2020).

Ο He και συν έδειξαν ότι λιποσωμικό CRISPR πλασμιδιακό DNA, που κωδικοποιεί CAS9 και single-guide RNA, που στοχεύει στο γονίδιο της DNA-methyltransferase σε κύτταρα καρκίνου των ωοθηκών ποντικού είχε θεραπευτικά αποτελέσματα (Dogbey et al., 2023b). Ο Zhang και συν χορήγησαν λιποσωμικό αντι-CYP1A1 si RNA και πέτυχαν την αναστολή της αύξησης του καρκίνου του πνεύμονος σε BALB/c nude xenografts. Σε μια προσπάθεια έρευνας τεκμηρίωσης ο Moitra και συν ανέπτυξαν λιποσωματίδια, που καθοδηγούνται από aptamer και είναι ευαίσθητα σε αλλαγές του pH για να μεταφέρουν πλασμιδιακό DNA και si RNA σε καρκινικά βλαστικά κύτταρα, που υπερεκφράζουν EpCam. LErafAON είναι ένα αντινοσηματικό c-raf ολιγονουκλεοτίδιο μέσα σε λιποσωματίδιο, που μειώνει το Raf-1 σε καρκινικά κύτταρα κάνοντας τα πιο ευαίσθητα στην ακτινοθεραπεία. Ο Li και συν δοκίμασαν ένα λιποσωματίδιο για τη μεταφορά πλασμιδιακού DNA, που κωδικοποιεί τον ανθρώπινο

παράγοντα των ουδετεροφίλων HNP1 σε πθήκους, αλλά είχαν τοξικές δράσεις στο σημείο της ένεσης και ισχυρή ανοσογόνο δράση (Kanvinde et al., 2022).

Τελευταία, ο Shao και συν. δοκίμασαν με επιτυχία να στοχεύσουν σε mRNA σύντηξης TMPRSS2/ERG για να ενισχύσουν τη δράση του docetaxel σε καρκίνο του προστάτη με τη χρήση λιποσωματιδίων (Roma-rodrigues et al., 2020).

Λιπιδικά νανοσωματίδια

Η πρώτη προσπάθεια αντικαρκινικής θεραπείας με mRNA έγινε το 1995 από τον Conry και συν., που χορήγησαν λουσιφεράση με mRNA, που κωδικοποιούσε καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο σαν αντικαρκινικό εμβόλιο. Τα si RNA θεωρήθηκαν αρχικά πολλά υποσχόμενη θεραπεία στην αναστολή της αύξησης του όγκου. Αλλά οι περιορισμοί in vivo ήταν πολλοί όπως η γρήγορη ενζυμική αποδόμηση, η καταστροφή τους από ανοσοκύτταρα και η φτωχή διεισδυτικότητα σε κυτταρικές μεμβράνες. Τα λιπιδικά νανοσωματίδια, που φέρουν si RNAs δείχνουν καλύτερες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, βιοδιαθεσιμότητα και επιλεκτική στόχευση. Η χρήση ουδέτερων λιπιδίων όπως DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine) είχε καλύτερα αποτελέσματα στη θεραπεία με si RNA μεταφερόμενο από λιπιδικά νανοσωματίδια σε xenografts καρκίνου σε ποντίκια. Οι τοπικές τοξικές δράσεις στις επαναλαμβανόμενες ενδοφλέβιες ενέσεις και η ανοσογονικότητα ήταν μικρότερες από ό,τι στη θεραπεία με ιϊκούς φορείς (Kanvinde et al., 2022).

Ο Botto και συν. έδειξαν ότι χρησιμοποιώντας SLNs για μεταφορά πλασμιδιακού RNA για να προκαλέσει RNA παρεμβολή σε NUPR1 ρυθμιζόμενα γονίδια πέτυχαν την αναστολή της αύξησης ηπατοκυτταρικού καρκίνου in vitro (Kanvinde et al., 2022). Ο Penumarti και συν. ανέπτυξαν SLN σύμπλοκο για τη μεταφορά DNA, που έδειξε υψηλή βιοσυμβατότητα και διαμόλυνση σε δενδριτικά κύτταρα (Roma-rodrigues et al., 2020).

Πολυμερή νανοσωματίδια

Φορείς βασισμένοι σε PAMAM-polyamidoamine particles

Στη θεραπεία του καρκίνου τα PAMAM δένδρομερή μεταφέρουν χημικοθεραπευτικούς παράγοντες όπως μεθοτρεξάτη, δοξορουμπικίνη και σισιπλάτινα. Όσον αφορά στη μεταφορά γενετικού υλικού λόγω του μικρού τους μεγέθους είναι ιδανικά για τη μεταφορά si RNA. Τα δένδρομερή G3 PAMAM σε σύμπλοκα με TWIST1 si RNA αποδείχθηκε ότι μπορούν να προσληφθούν από τα καρκινικά κύτταρα μαστού SUM 1315, προκαλώντας Lockdown του TWIST1 (ένας μεταγραφικός παράγοντας που υπερεκφράζεται σε τριπλά-αρνητικό καρκίνο του

μαστού και των γονιδίων επιθηλιακής -μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT). Το Superfect και το Polyfect είναι διαθέσιμα στο εμπόριο ενεργοποιημένα συστήματα μεταφοράς γενετικού υλικού *in vitro* ,όπως πλασμιδιακό DNA και si RNA (Dogbey et al., 2023b).

Μια πολύ μεγάλη πρόκληση είναι αυτή της πολυφαρμακευτικής ανθεκτικότητας - multidrug resistance. Ο Li και συν παρασκεύασαν PAMAM- MDR1 si RNA polyplexes στην επιφάνεια των οποίων έφεραν h-R3 αντίσωμα, τα οποία έδειξαν αναστροφή της πολυφαρμακευτικής ανθεκτικότητας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα polyplexes αυτά είχαν συνεργική δράση με το Paclitaxel , προκαλώντας απόπτωση και αναστολή της αύξησης του όγκου. Επιπλέον σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MCF7/ADR τροποποιημένα με φωσφολιπίδια έχουν αποδειχθεί ότι μεταφέρουν si MDR1 αναστρέφοντας την πολυφαρμακευτική ανθεκτικότητα (Kanvinde et al., 2022). Ο Lim και συν έδειξαν ότι PAMAM -nanodiamond υβριδικά νανοσύμπλοκα με E6/E7 si RNA ογκοπρωτεΐνης για τη θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, που προκαλείται από τον ιό των ανθρωπίνων θηλωμάτων είχαν μικρότερη τοξικότητα και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα (Kanvinde et al., 2022). Ο Santo και συν κατασκεύασαν poly(2-aminoethyl methacrylate) βασισμένα σε PAMA polyplexes καλυμμένα με PEG για να εκτιμήσουν την αποτελεσματικότητά τους σε κυτταρικές σειρές COS-7 και HepG2 .Τα νανοσωματίδια καλυμμένα με PEG παρουσίαζαν μικρότερη τοξικότητα και ικανότητα διαμόλυνσης.

Φορείς συνθετικών πολυμερών

Ο Kalvnagh και συν έδειξαν ότι πλασμιδιακό DNA INF-A μέσα σε κάψουλα από PGLA είχε αυξημένη ικανότητα μεταφοράς και προστασία από DNAσες. Ο Rysnayanti και συν χρησιμοποίησαν PGLA νανοσωματίδια για να μεταφέρουν MDR1 και BCL2 si RNA για θεραπεία καρκίνου των ωοθηκών . Πέτυχαν την αναστροφή της πολυφαρμακευτικής αντοχής . Ο Su και συν χρησιμοποίησαν PGLA νανοσωματίδια για να μεταφέρουν Paclitaxel και si RNA stat3 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονος. Ο Khan και συν πρόσθεσαν στην επιφάνεια των PGLA νανοσωματιδίων N-acetylglycosamine και συμπεριέλαβαν si RNA surviving για τη θεραπεία του ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Τα ποντίκια, που θεραπευθήκαν με νανοσωματίδια έδειξαν μεγαλύτερη αναστολή της αύξησης του όγκου και 75% βελτίωση της μείωσης του βάρους σε σύγκριση με ποντίκια χωρίς θεραπεία ή με θεραπεία με ελεύθερο si RNA (Kanvinde et al., 2022).

Πολυκατιονικά δραστικά φάρμακα

Ο Kanvinde και συν συνέθεσαν ένα πολυμερικό φορέα χλωροκίνης . Τροποποίησαν το μικρό μακρομοριακό φάρμακό σε μακρομοριακή δομή και επομένως και τις φαρμακοκινητικές του ιδιότητες κάνοντας δυνατή τη λήψη του από το στόμα ή συστηματικά . Ο Zhou και συν κατασκεύασαν ένα φορέα τόσο γονιδίου όσο και προφαρμάκου. Το προ φάρμακο αποδομούνται σε bespermine ,το οποίο επανέφερε στο κανονικό τα επίπεδα των πολυαμινών στα καρκινικά κύτταρα ευαισθητοποιώντας τα. Επιπλέον ο φορέας μετέφερε DNA TNFa προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο σε πολλές κυτταρικές σειρές καρκίνου. Ο Xie και συν συνέθεσαν ένα πολυμερές από πολύ αμιδο αμινο αντι CX-CR4 φάρμακο και mir 200c microRNA , το οποίο αναστέλλει τη διεισδυτικότητα σε χολαγγειοκαρκίνωμα (Kanvinde et al., 2022).

Κλινικές μελέτες με χρήση νανοσωματιδίων

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται κλινικές δοκιμές αντικαρκινικής θεραπείας με χρήση νανοσωματιδίων σε σχέση με το γονίδιο-στόχο , το είδος του καρκίνου και την κατάσταση τους (Kanvinde et al., 2022).

Πίνακας 11 .Μη ιϊκοί φορείς σε κλινικές δοκιμές έναντι του καρκίνου (Kanvinde et al., 2022).

Table 5. Non-viral vectors that are in clinical trials for cancer therapy.

Nucleic Acid	Vector	Sponsor	Disease	Target Gene	Clinical Trial	Status
siRNA	LNPs	Dicerna Pharmaceuticals	Hepatocellular carcinoma	MYC	NCT02314052	Terminated
	LNPs	Dicerna Pharmaceuticals	Hematological and solid tumors	MYC	NCT02110563	Terminated
	CD polymer	Calando Pharmaceuticals	Solid tumors	RRM2	NCT00689065	Terminated
	Gold NPs	Northwestern University	Glioblastoma	Bcl-2	NCT03020017	Completed
	LNPs	Alnylam Pharmaceuticals	Solid tumors	KSP and VEGF	NCT01158079	Completed
	Liposomes	Silence Therapeutics	Pancreatic cancer	PKN3	NCT01808638	Completed
	LNPs	National Cancer Institute	Liver cancer	PLK1	NCT01437007	Completed
	LNPs	Dicerna Pharmaceuticals	Solid tumors	MYC	NCT02110563	Terminated
	LNPs	University of Florida	Glioblastoma	TN-C	NCT04573140	Recruiting
	LNPs	Arbutus Biopharma Corp.	Neuroendocrine/Adrenal tumors	PLK1	NCT02191878	Completed
	Polymeric matrix	Silenseed Limited	Pancreatic cancer	KRAS	NCT01676259	Recruiting
	LNPs	Silence Therapeutics	Solid tumors	PKN3	NCT00938574	Completed
	LNPs	M.D. Anderson Cancer Center	Hepatocellular carcinoma, GI tumors	EphA2	NCT01591356	Active
miRNA	Liposomes	Mirna therapeutics	Advanced cancers	miR-34	NCT01829971	Terminated
	Minicells	Asbestos disease research foundation	Lung cancer	miR-16	NCT02369198	Completed
	LNPs	Moderna	Solid tumors, ovarian cancer	OX40L T cell	NCT03323398	Active
mRNA	LNPs	Moderna	Solid tumors and lymphoma	OX40L T cell	NCT03739931	Active
	LNPs	Moderna	Ovarian cancer	OX40L T cell	NCT03323398	Active
	Lipopolyplex	Stemirna therapeutics	Esophageal cancer	T cells	NCT03908671	Not yet recruiting
	LNPs	Moderna	Solid tumors	TAA	NCT03313778	Recruiting
	Liposomes	BioNtech SE	Stage IV melanoma	NY-ESO-1, MAGE-A3, tyrosinase, and TPTE	NCT04526899	Recruiting
	Liposomes	BioNtech SE	Prostate cancer	TAA	NCT04382898	Recruiting
	Liposomes	University Medical Center Groningen and BioNtech SE	Ovarian cancer	TAA	NCT04163094	Recruiting
	Lipid based particle	Ludwig Institute for Cancer Research, Boehringer Ingelheim, MedImmune, CureVac, PharmaJet	Lung cancer	MUC1, survivin, NY-ESO-1, 5T4, MAGE-C2, and MAGE-C1	NCT03164772	Completed
			melanoma, squamous cell carcinoma of skin, head, and neck or adenoid cystic carcinoma			
	Polymeric carrier	CureVac		TLR7/8/RIG-1	NCT03291002	Active

Abbreviations: Myc—master regulator of cell cycle entry and proliferative metabolism; RRM2—ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2; Bcl2—B-cell lymphoma 2; KSP—kinesin spindle protein; VEGF—vascular endothelial growth factor; PKN3—protein kinase N3; PLK1—polo-like kinase 1; TN-C—tenascin-C; KRAS—Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; EphA2—ephrin type-A receptor 2; miR—microRNA; TAA—tumor-associated antigens; NY-ESO-1—New York esophageal squamous cell carcinoma-1; MAGE—melanoma-associated antigen; TPTE—transmembrane phosphatase with tensin homology; MUC1—Mucin 1; 5T4—trophoblast glycoprotein; TLR—Toll-like receptor; RIG-1: retinoic-acid-inducible gene I.

ΣΤ.Φάρμακα γονιδιακής θεραπείας που έχουν πάρει έγκριση από το FDA

Στον παρακάτω πίνακα 12 φαίνονται φάρμακα γονιδιακής θεραπείας που έχουν πάρει έγκριση από το FDA . Δείχνει την εμπορική ονομασία , τη θεραπευτική ουσία , την εταιρεία παρασκευής , τις ενδείξεις και το είδος της θεραπείας Approved Cellular and Gene Therapy Products | FDA

Πίνακας 12. Φάρμακα γονιδιακής και κυτταρικής θεραπείας που έχουν εγκριθεί από το FDA

Εμπορικό σκεύασμα	Εταιρεία	Ενδείξεις	Είδος θεραπείας
ADSTILADRIN Nadofaragene fradenovec-vncg	Ferring PharmaceuticalsA/S	Ενήλικες με Διηθητικό μη Μυϊκό καρκίνο Ουροδόχου κύστεως (NMIBC) in situ με ή χωρίς θηλώματα	Γονίδιο INFα2b Με φορέα Adenovirus 5
AMTAGVI Lifileucel	Iovanec Biotherapeutics Inc	Ενήλικες με μη εξαιρεσιμο ή μεταστατικό Μελάνωμα που προηγουμένως θεραπευθηκαν με ή χωρίς MEK αναστολείς	Αυτόλογη ανοσοθεραπεία με T κύτταρα προερχόμενα από τον όγκο TIL που πολλαπλασιάζονται παρουσία IL2 και αντίσωμα αντι-CD3 και θρεπτικά κύτταρα.

ABECMA Idecabtagene Vileucel	Cellgene Corporation Bristol Myers Squibb Company	Ενήλικες με υποτροπιάζον ανθεκτικό μελάνωμα μετα από δυο η περισσότερες θεραπείες συμπεριλαμβανομένο υ ανοσοθεραπευτικού παράγοντα ,αναστολέ α πρωτεοσώματος και αντι-CD38 μονοκλωνικού αντισώματος	Αυτόλογη ανοσοθεραπεία με CAR-T κύτταρα γενετικά τροποποιημένα ώστε να εκφράζουν το χημειοαντι BCMA αντιγονικό υποδοχέα
BREYANZI Licocabtagene Meraleucel	Juno Therapeutics Inc Bristol Myers Squibb	Ενήλικες με ανθεκτικό ή υποτροπιάζον Β λέμφωμα, διηθητικό μεγαλοκυτταρικό Βλέμφωμα, που δεν ορίζεται διαφορετικά και μπορεί να ξεκινάει από την εφηβεία, πρωτοπαθές μεσοθωρακικό μακροκυτταρικό λέμφωμα και τριχοειδικό λέμφωμα βαθμού 3B	CD19 Αυτόλογη ανοσοθεραπεία με CAR-T κύτταρα
CARVYKTI Ciltabtagene	Janssen Biotech Inc	Ενήλικες με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό	CAR-T θεραπεία αυτόλογη . Τα T κύτταρα

Autoleucel		πολλαπλούν μυέλωμα που έλαβαν τουλάχιστον μια σειρά θεραπείας συμπεριλαμβανομένο υ αναστολέα πρωτεασώματος, ανοσοθεραπευτικού παράγοντα και είναι ανθεκτικοί σε lenalidamide	τροποποιούνται γενετικά από λεντιϊό ώστε να εκφράζουν στην επιφάνεια τους BCMA(B cell mature antigen)
IMLYGIC Talimogene Lanerparepe	BioVexine Amgen Inc	Τοπική θεραπεία μη εξαιρέσιμων βλαβών μυελώματος η υποδόριων βλαβών σε ασθενείς με υποτροπιάζον μελάνωμα μετά από χειρουργική εξαίρεση	Εξασθενημένος απλού τύπου I ερπητοϊός που είναι επεξεργασμένος να εκφράζει τον ανθρώπινο παράγοντα διέγερσης μακροφάγων και πολυμορφοκυττάρω ν (GM-CSF) για να αυξήσει την ανοσία απέναντι σε αντιγόνα του όγκου που απελευθερώνονται κατά την αντιγραφή του ιού
KYMRIA	Novartis	Ασθενείς μέχρι 25	CD19 αυτόλογη

Tisagenlecleucel	Pharmaceutical Corporation	ετών με οξεία λευχαιμία β προδρομικών κυττάρων που είναι ανθεκτικοί ή μετά από 2η ή μεταγενέστερη υποτροπή Ενήλικες με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό μεγαλοκυτταρικό Βλέμφωμα μετά από 2 ή περισσότερες σειρές συστηματικής θεραπείας, με διηθητικό μεγαλοκυτταρικό Βλέμφωμα (DLBCL)μη οριζόμενο αλλοιώς, υψηλού βαθμού Β λέμφωμα και τριχοειδικό DLBCL Αντενδείκνυται σε πρωτοπαθές λέμφωμα ΚΝΣ Σε ενήλικες με υποτροπιάζον τριχοειδικό λέμφωμα FL μετά από δυο ή	ανοσοθεραπεία με CAR-T κύτταρα
------------------	----------------------------	---	--------------------------------

		περισσότερες συστηματικές θεραπείες .	
OMISIRGE Omidubicel- only	Camida Cell Ltd	Ενήλικες και παιδιά >12 ετών με αιματολογικές κακοήθειες που σχεδιάζουν να λάβουν μεταμόσχευση αίματος ομφαλίου λώρου μετά από διαταραχές μυελοαποδόμησης για να μειώσουν το χρόνο αποκατάστασης των ουδετεροφίλων και πιθανών μολύνσεων	Θεραπεία με αλλογενετικά τροποποιημένα προγονικά κύτταρα HPCs από ομφάλιο λώρο (CD34+ ,CD3+)
PROVENGE Sipuleucel-T	Dendreon Corporation	Ασυμπτωματικός ή ελάχιστα συμπτωματικός μεταστατικός ανθεκτικός ορμονικά καρκίνος προστάτη	Αυτόλογη ανοσοθεραπεία με κ/α των ανοσοκυττάρων του ασθενούς με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη ειδική για τον προστάτη. Αυτά όταν ενίονται στον ασθενή ενεργοποιούν APCS να

			επιτεθούν στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη
TECARTUS Brexucabtagene Autoleucel	Kite Pharmaceutical Inc	Ενήλικες με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό mantle cell λέμφωμα MCL Ενήλικες με υποτροπιάζουσα ή ανθεκτική οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία B προγονικών κυττάρων	CD19 ανοσοθεραπεία CAR -T κυττάρων
TECELRA Afamitesgene autoleucel	Adaptimmune LCC	Ενήλικες με μη εξαιρέσιμο ή μεταστατικό συγκυτιακό σάρκωμα που έλαβε προηγούμενως χημειοθεραπεία και ο ογκος εκφράζει αντιγόνο MAGE-A4	T-κυτταρική αυτόλογη ανοσοθεραπεία
YESCARTA Axicabtagene Ciloceucel	Kite Pharma Inc	Ενήλικες με μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα ανθεκτικό σε πρώτης γραμμής χημειοανοσοθεραπεί α ή υποτροπιάζει 12 μήνες μετά από	CD19 αυτόλογη ανοσοθεραπεία με CAR -T κύτταρα

		πρώτης γραμμής χημειοανοσοθεραπεί α Ενήλικες με υποτροπιάζον ή ανθεκτικό Βλέμφωμα , με διηθητικό Β λέμφωμα (DCBCL)μη οριζόμενο διαφορετικά , πρωτοπαθές μεσοθωρακικό μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα, υψηλού βαθμού Β λέμφωμα, DLBCL τριχοειδικό λέμφωμα Αντενδείκνυται σε πρωτοπαθές λέμφωμα ΚΝΣ Σε υποτροπιάζον ή ανθεκτικό τριχοειδικό λέμφωμα μετά από 2 ή περισσότερες σειρές συστηματικής θεραπείας	
--	--	---	--

Z.Κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο

Μετά από προσέγγιση του ιστότοπου clinicaltrials.gov στις 6 Αυγούστου 2024 βρέθηκαν συνολικά 1346 κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας για τον καρκίνο . Από

αυτές οι 81 ήταν στην ΙΙΙ φάση. Οι μελέτες αυτές αφορούν σε αιματολογικές κακοήθειες και συμπαγείς όγκους όπως καρκίνος κεφαλής τραχήλου, καρκίνος μαστού , προστάτη, νεφρού , παγκρέατος, γλοιώματα εγκεφάλου , είναι σε προχωρημένα στάδια με μεταστάσεις αλλά και καρκίνοι αγνώστου προελεύσεως. Τα πρωτόκολλα θεραπείας περιλαμβάνουν συνδυασμό χημειοθεραπείας, ακτινοθεραπείας, ανοσοθεραπείας, στοχευμένης θεραπείας και γονιδιακής θεραπείας. Στη γονιδιακή θεραπεία περιλαμβάνονται CART κύτταρα, θεραπεία αυτοκτονίας, ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που μεταφέρουν γονίδιο ιντερφερόνης- α , πλασμίδιο που κωδικοποιεί HLA-B27 και γονίδιο β -2 μικροσφαιρίνης. Στα ευρύτερα πλαίσια γονιδιακής θεραπείας περιλαμβάνονται ογολυτικοί ιοί, αντικαρκινικά εμβόλια και αντιαγγειογενετικοί παράγοντες. Πολλές μελέτες περιλαμβάνονται στη γονιδιακή θεραπεία εξαιτίας του τρόπου παρακολούθησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία όπως ποσοστό μεταλλάξεων ογκογονιδίων c-mc , k-ras ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων όπως p53.

Η.Συμπεράσματα

Σήμερα η γονιδιακή θεραπεία αποτελεί μια πρακτική, που εφαρμόζεται στην καθημερινή κλινική πράξη της θεραπείας του καρκίνου, όπως αποδεικνύεται από τα φαρμακευτικά σκευάσματά, που έχουν πάρει έγκριση από τους οργανισμούς έγκρισης φαρμάκων διαφόρων χωρών και κυκλοφορούν στο εμπόριο και από τις πολλές κλινικές δοκιμές γονιδιακής θεραπείας στον καρκίνο, που διεξάγονται παγκοσμίως. Οι αιματολογικές κακοήθειες αφορούν στο μεγαλύτερο ποσοστό των γονιδιακών θεραπειών, που εφαρμόζονται αλλά σιγά σιγά και οι συμπαγείς όγκοι αντιμετωπίζονται με μεθόδους γονιδιακής θεραπείας

Οι προοπτικές εξέλιξης είναι τεράστιες καθώς η γονιδιακή θεραπεία συνιστά κύριο εκπρόσωπο της εξατομικευμένης θεραπείας ή ιατρικής ακριβείας και αφορούν σε όλους τους επιμέρους τομείς της. Για παράδειγμα όσον αφορά στα συστήματα μεταφοράς οι τεχνητοί ανασυνδυασμένοι ιϊκοί φορείς δεν παρουσιάζουν τα μειονεκτήματα της εισχωρητικής μεταλλαξιγένεσης και ανοσογονικότητας και έχουν καλύτερη ικανότητα διαμόλυνσης και έκφρασης του διαγονιδίου. Επίσης τα νανοσωματίδια με κατάλληλη επεξεργασία είναι περισσότερο ιστοειδικά, λιγότερο τοξικά και ανοσογονικά και πιο αποτελεσματικά στη μεταφορά και έκφραση του

γενετικού υλικού. Όσον αφορά στις τεχνικές επεξεργασίας του γενετικού υλικού το CRISPR/CAS9 και το prime editing έφεραν επανάσταση στον τομέα αυτό και οι εφαρμογές τους ολοένα αυξάνονται. Τέλος η αυτόλογη ανοσοθεραπεία με CAR-T κύτταρα με χιμαιρικούς αντιγονικούς υποδοχείς είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη θεραπεία και πολλά υποσχόμενη να εξελιχθεί και να επεκταθεί σε σχεδόν όλους τους τύπους καρκίνου.

Ωστόσο οι περιορισμοί είναι αρκετοί και αφορούν τόσο στις ανεπιθύμητες ενέργειες της γονιδιακής θεραπείας όσο και στην αποτελεσματικότητα της. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες περιλαμβάνουν την τοξικότητα, την ανοσογονικότητα και την πιθανότητα μεταλλαξιγένεσης και δευτερογενώς καρκινογένεσης. Η αποτελεσματικότητα είναι περιορισμένη εξαιτίας της αποτυχίας μεταφοράς του διαγονιδίου σε δύσκολα προσεγγίσιμους καρκίνους, της αποτελεσματικής διαμόλυνσης των καρκινικών κυττάρων, της σταθερής και μακροχρόνιας έκφρασης του διαγονιδίου.

Ένα σημαντικό εμπόδιο στη διάδοση της γονιδιακής θεραπείας είναι το απαγορευτικό κόστος. Για παράδειγμα μια ενδοφλέβια έγχυση του KYMRIAH που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του λεμφώματος και της Β λευχαιμίας κοστίζει 617.000\$. Οι οικονομικά αδύνατοι ασθενείς αυτόματα αποκλείονται από τη λήψη αυτής της θεραπείας. Είναι σημαντικό η διεθνής επιστημονική κοινότητα να ευαισθητοποιηθεί και να αναλάβει δράση για τη διάθεση του επιστημονικού ερευνητικού προϊόντος με τρόπο δίκαιο και κοινωνικό ανεξάρτητα από οικονομικές και άλλες διακρίσεις.

Θ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alekseenko, I., Kuzmich, A., Kondratyeva, L., Kondratieva, S., Pleshkan, V., & Sverdlov, E. (2021). Step-by-Step Immune Activation for Suicide Gene Therapy Reinforcement. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/IJMS22179376>

Allen, D., Kalter, N., Rosenberg, M., & Hendel, A. (2023). Homology-Directed-Repair-Based Genome Editing in HSPCs for the Treatment of Inborn Errors of Immunity and Blood Disorders. *Pharmaceutics*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15051329>

Antisense oligonucleotides: a novel Frontier in pharmacological strategy - Search Results - PubMed. (n.d.). Retrieved June 28, 2024, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Antisense+oligonucleotides%3A+a+novel+Frontier+in+pharmacological+strategy>

Ardini, M., Vago, R., Fabbrini, M. S., & Ippoliti, R. (2022). From Immunotoxins to Suicide Toxin Delivery Approaches: Is There a Clinical Opportunity? *Toxins*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14090579>

Ates, I., Rathbone, T., Stuart, C., Hudson Bridges, P., & Cottle, R. N. (2020). Delivery approaches for therapeutic genome editing and challenges. *Genes*, 11(10), 1–32. <https://doi.org/10.3390/genes11101113>

Ayala Ceja, M., Khericha, M., Harris, C. M., Puig-Saus, C., & Chen, Y. Y. (2024). CAR-T cell manufacturing: Major process parameters and next-generation strategies. *The Journal of Experimental Medicine*, 221(2). <https://doi.org/10.1084/JEM.20230903>

Azhagiri, M. K. K., Babu, P., Venkatesan, V., & Thangavel, S. (2021a). Homology-directed gene-editing approaches for hematopoietic stem and progenitor cell gene therapy. *Stem Cell Research and Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02565-6>

Azhagiri, M. K. K., Babu, P., Venkatesan, V., & Thangavel, S. (2021b). Homology-

directed gene-editing approaches for hematopoietic stem and progenitor cell gene therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02565-6>

Belete, T. M. (2021). The Current Status of Gene Therapy for the Treatment of Cancer. *Biologics : Targets & Therapy*, 15, 67–77. <https://doi.org/10.2147/BTT.S302095>

Bhat, A. A., Nisar, S., Mukherjee, S., Saha, N., Yarravarapu, N., Lone, S. N., Masoodi, T., Chauhan, R., Maacha, S., Bagga, P., Dhawan, P., Akil, A. A. S., El-Rifai, W., Uddin, S., Reddy, R., Singh, M., Macha, M. A., & Haris, M. (2022). Integration of CRISPR/Cas9 with artificial intelligence for improved cancer therapeutics. *Journal of Translational Medicine*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03765-1>

Biffi, G., & Tuveson, D. A. (2021). Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts. *Physiological Reviews*, 101(1), 147–176. <https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2019>

bin Umair, M., Akusa, F. N., Kashif, H., Seerat-e-Fatima, Butt, F., Azhar, M., Munir, I., Ahmed, M., Khalil, W., Sharyar, H., Rafique, S., Shahid, M., & Afzal, S. (2022a). Viruses as tools in gene therapy, vaccine development, and cancer treatment. *Archives of Virology*, 167(6), 1387–1404. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05432-8>

Brown, D. W., Beatty, P. H., & Lewis, J. D. (2022). Molecular Targeting of the Most Functionally Complex Gene in Precision Oncology: p53. *Cancers*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/cancers14215176>

Bulaklak, K., & Gersbach, C. A. (2020). The once and future gene therapy. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-19505-2>

Butt, M. H., Zaman, M., Ahmad, A., Khan, R., Mallhi, T. H., Hasan, M. M., Khan, Y. H., Hafeez, S., Massoud, E. E. S., Rahman, M. H., & Cavalu, S. (2022). Appraisal for the Potential of Viral and Nonviral Vectors in Gene Therapy: A

Review. *Genes*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/GENES13081370>

Chen, H., Chengalvala, V., Hu, H., & Sun, D. (2021). Tumor-derived exosomes: Nanovesicles made by cancer cells to promote cancer metastasis. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 11(8), 2136–2149. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.04.012>

Chen, X., Zhang, T., Su, W., Dou, Z., Zhao, D., Jin, X., Lei, H., Wang, J., Xie, X., Cheng, B., Li, Q., Zhang, H., & Di, C. (2022). Mutant p53 in cancer: from molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell Death and Disease*, 13(11). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05408-1>

Chen, Y., McAndrews, K. M., & Kalluri, R. (2021). Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(12), 792–804. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00546-5>

Collotta, D., Bertocchi, I., Chiapello, E., & Collino, M. (2023). Antisense oligonucleotides: a novel Frontier in pharmacological strategy. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2023.1304342>

Cornetta, K., Lin, T. Y., Pellin, D., & Kohn, D. B. (2022). Meeting FDA Guidance recommendations for replication-competent virus and insertional oncogenesis testing. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 28, 28–39. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2022.11.009>

Das, S. K., Menezes, M. E., Bhatia, S., Wang, X. Y., Emdad, L., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2015). Gene Therapies for Cancer: Strategies, Challenges and Successes. *Journal of Cellular Physiology*, 230(2), 259–271. <https://doi.org/10.1002/jcp.24791>

Dholakia, J., Cohen, A. C., Leath, C. A., Evans, E. T., Alvarez, R. D., & Thaker, P. H. (2022). Development of Delivery Systems for Local Administration of Cytokines/Cytokine Gene-Directed Therapeutics: Modern Oncologic Implications. *Current Oncology Reports*, 24(4), 389–397. <https://doi.org/10.1007/S11912-022-01221-3>

Dogbey, D. M., Torres, V. E. S., Fajemisin, E., Mpondo, L., Ngwenya, T., Akinrinmade, O. A., Perriman, A. W., & Barth, S. (2023a). Technological advances in the use of viral and non-viral vectors for delivering genetic and non-genetic cargos for cancer therapy. *Drug Delivery and Translational Research*, 13(11), 2719–2738. <https://doi.org/10.1007/S13346-023-01362-3>

Eskandani, R., Kazempour, M., Farahzadi, R., Sanaat, Z., Eskandani, M., Adibkia, K., Vandghanooni, S., & Mokhtarzadeh, A. (2022). Engineered nanoparticles as emerging gene/drug delivery systems targeting the nuclear factor- κ B protein and related signaling pathways in cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 156. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2022.113932>

Findlay, A. R., & Weihl, C. C. (2022). Genetic-Based Treatment Strategies for Muscular Dystrophy and Congenital Myopathies. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 28(6), 1800–1816. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000001203>

Finotti, A., & Gambari, R. (2023). Combined approaches for increasing fetal hemoglobin (HbF) and de novo production of adult hemoglobin (HbA) in erythroid cells from β -thalassemia patients: treatment with HbF inducers and CRISPR-Cas9 based genome editing. *Frontiers in Genome Editing*, 5. <https://doi.org/10.3389/FGED.2023.1204536>

genticine review - Search Results - PubMed. (n.d.). Retrieved June 26, 2024, from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=genticine+review>

Glabman, R. A., Choyke, P. L., & Sato, N. (2022). Cancer-Associated Fibroblasts: Tumorigenicity and Targeting for Cancer Therapy. *Cancers*, 14(16). <https://doi.org/10.3390/cancers14163906>

Godbout, K., & Tremblay, J. P. (2023). Prime Editing for Human Gene Therapy: Where Are We Now? *Cells*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/cells12040536>

Gonçalves, G. A. R., & Paiva, R. de M. A. (2017). Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)*, 15(3), 369–375.

<https://doi.org/10.1590/S1679-45082017RB4024>

Hassin, O., & Oren, M. (2023). Drugging p53 in cancer: one protein, many targets. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 22(2), 127–144. <https://doi.org/10.1038/S41573-022-00571-8>

He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., Xie, H., Peng, X., Yin, W., Tao, Y., & Wang, X. (2020). Mirna-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2628–2647. <https://doi.org/10.7150/ijbs.47203>

Kanvinde, S., Kulkarni, T., Deodhar, S., Bhattacharya, D., & Dasgupta, A. (2022). Non-Viral Vectors for Delivery of Nucleic Acid Therapies for Cancer. *Biotech (Basel (Switzerland))*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/biotech11010006>

Kobelt, D., Pahle, J., & Walther, W. (2022). A Brief Introduction to Current Cancer Gene Therapy. *Methods in Molecular Biology*, 2521, 1–21. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2441-8_1

Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaïos, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., Diakosavvas, M., Angelou, K., Tsatsaris, G., Pagkalos, A., Ntounis, T., & Fasoulakis, Z. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: A review. *Anticancer Research*, 40(11), 6009–6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>

Kouprina, N., Earnshaw, W. C., Masumoto, H., & Larionov, V. (2013). A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 70(7), 1135–1148. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-1113-3>

Lan, T., Chen, L., & Wei, X. (2021). Inflammatory cytokines in cancer: Comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. *Cells*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cells10010100>

Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases:

mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/S41392-019-0089-Y>

Liu, J., Ren, L., Li, S., Li, W., Zheng, X., Yang, Y., Fu, W., Yi, J., Wang, J., & Du, G. (2021). The biology, function, and applications of exosomes in cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 11(9), 2783–2797. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2021.01.001>

Liu, Y., Hu, X., Han, C., Wang, L., Zhang, X., He, X., & Lu, X. (2015). Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *BioEssays*, 37(12), 1277–1286. <https://doi.org/10.1002/bies.201500093>

Liu, Z., Shi, M., Ren, Y., Xu, H., Weng, S., Ning, W., Ge, X., Liu, L., Guo, C., Duo, M., Li, L., Li, J., & Han, X. (2023). Recent advances and applications of CRISPR-Cas9 in cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/S12943-023-01738-6>

Lundstrom, K. (2023). Viral Vectors in Gene Therapy: Where Do We Stand in 2023? *Viruses*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/V15030698>

Menon, A., Abd-Aziz, N., Khalid, K., Poh, C. L., & Naidu, R. (2022). miRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911502>

Molenda, S., Sikorska, A., Florczak, A., Lorenc, P., & Dams-Kozłowska, H. (2023). Oligonucleotide-Based Therapeutics for STAT3 Targeting in Cancer-Drug Carriers Matter. *Cancers*, 15(23). <https://doi.org/10.3390/CANCERS15235647>

Petraitytė, G., Preikšaitienė, E., & Mikštienė, V. (2021). Genome Editing in Medicine: Tools and Challenges. *Acta Medica Lituanica*, 28(2), 266–280. <https://doi.org/10.15388/AMED.2021.28.2.8>

Rabaan, A. A., AlSaihati, H., Bukhamsin, R., Bakhrebah, M. A., Nassar, M. S., Alsaleh, A. A., Alhashem, Y. N., Bukhamseen, A. Y., Al-Ruhimy, K., Alotaibi, M., Alsubki, R. A., Alahmed, H. E., Al-Abdulhadi, S., Alhashem, F. A., Alqatari, A. A., Alsayyah, A., Farahat, R. A., Abdulal, R. H., Al-Ahmed, A. H., ... Mohapatra,

R. K. (2023). Application of CRISPR/Cas9 Technology in Cancer Treatment: A Future Direction. *Current Oncology*, 30(2), 1954–1976. <https://doi.org/10.3390/curroncol30020152>

Rad, S. M. A. H., Langroudi, L., Kouhkan, F., Yazdani, L., Koupaei, A. N., Asgharpour, S., Shojaei, Z., Bamdad, T., & Arefian, E. (2015). Transcription factor decoy: a pre-transcriptional approach for gene downregulation purpose in cancer. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(7), 4871–4881. <https://doi.org/10.1007/S13277-015-3344-Z>

Rodrigo, S., Senasinghe, K., & Quazi, S. (2023). Molecular and therapeutic effect of CRISPR in treating cancer. *Medical Oncology*, 40(2). <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01930-6>

Roma-rodrigues, C., Rivas-garcía, L., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2020). Gene Therapy in Cancer Treatment: Why Go Nano? *Pharmaceutics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12030233>

Rotte, A., Frigault, M. J., Ansari, A., Gliner, B., Heery, C., & Shah, B. (2022). Dose-response correlation for CAR-T cells: a systematic review of clinical studies. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 10(12). <https://doi.org/10.1136/JITC-2022-005678>

Sadowski, K., Olejarz, W., & Basak, G. (2022a). Modern Advances in CARs Therapy and Creating a New Approach to Future Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23). <https://doi.org/10.3390/IJMS232315006>

Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *International Journal of Oncology*, 54(2), 407–419. <https://doi.org/10.3892/IJO.2018.4661>

Schmitz, M., & Querques, I. (2024). DNA on the move: mechanisms, functions and applications of transposable elements. *FEBS Open Bio*, 14(1), 13–22.

<https://doi.org/10.1002/2211-5463.13743>

Sen, D., Sarkar, S., & Mukhopadhyay, P. (2023). Prime Editing: An Emerging Tool in Cancer Treatment. *Molecular Biotechnology*, 65(4), 509–520. <https://doi.org/10.1007/S12033-022-00580-3>

Shchaslyvyi, A. Y., Antonenko, S. V., Tesliuk, M. G., & Telegeev, G. D. (2023). Current State of Human Gene Therapy: Approved Products and Vectors. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 16(10). <https://doi.org/10.3390/PH16101416>

Sheikh, S., Ernst, D., & Keating, A. (2021). Prodrugs and prodrug-activated systems in gene therapy. *Molecular Therapy*, 29(5), 1716–1728. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.006>

Shi, Y., Liu, Z., Lin, Q., Luo, Q., Cen, Y., Li, J., Fang, X., & Gong, C. (2021). Mirnas and cancer: Key link in diagnosis and therapy. *Genes*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/genes12081289>

Smole, A. (2022). Cancer immunotherapy with CAR T cells: well-trodden paths and journey along lesser-known routes. *Radiology and Oncology*, 56(4), 409–419. <https://doi.org/10.2478/RAON-2022-0049>

Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., Gonzalez-Rodriguez, A. P., Martínez-Pérez, A., Rodrigo, J. P., García-Pedrero, J. M., & Gonzalez, S. (2023). Chemo-Immunotherapy: A New Trend in Cancer Treatment. *Cancers*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/CANCERS15112912>

Uddin, F., Rudin, C. M., & Sen, T. (2020). CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Frontiers in Oncology*, 10, 1387. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01387>

Watanabe, M., Nishikawaji, Y., Kawakami, H., & Kosai, K. I. (2021). Adenovirus Biology, Recombinant Adenovirus, and Adenovirus Usage in Gene Therapy. *Viruses*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/V13122502>

Wu, X., & Matosevic, S. (2022). Gene-edited and CAR-NK cells: Opportunities and challenges with engineering of NK cells for immunotherapy. *Molecular Therapy Oncolytics*, 27, 224–238. <https://doi.org/10.1016/J.OMTO.2022.10.011>

Zheng, N., Li, L., & Wang, X. (2020). Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials of genome editing systems. *Clinical and Translational Medicine*, 10(1), 412–426. <https://doi.org/10.1002/ctm2.34>

Zoting Gayatri Subhash, Pagire. A review on gene therapy on cancer. *International journal of research publication and reviews* Vol 3 , no 6 , pp4678-4686, June 2022 www.ijrpr.com ISSN 2582-7421.