

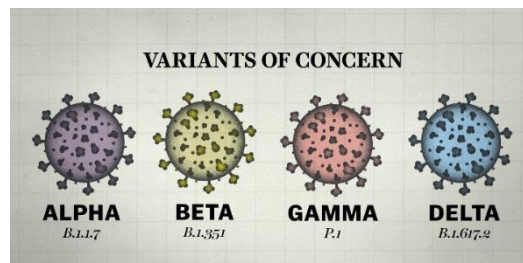
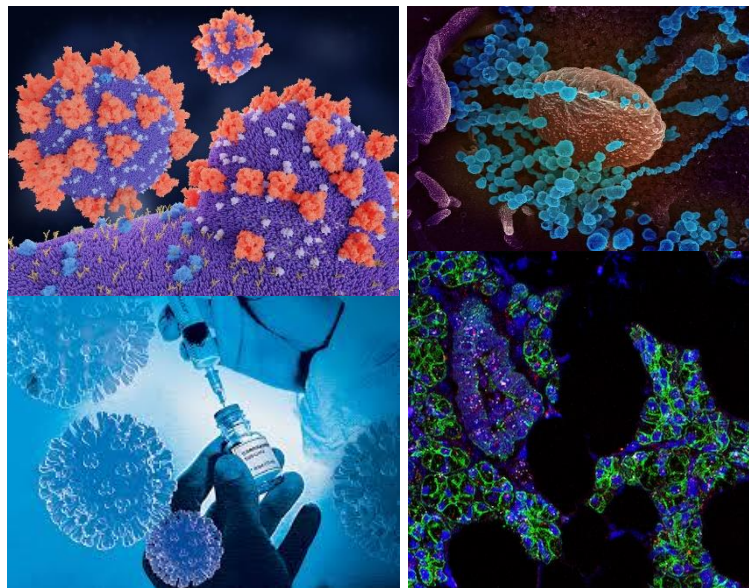


Σχολή Επιστημών Υγείας

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ (No 2)

Μια συλλογική εργασία των φοιτητών του 4<sup>ου</sup> έτους που συμμετείχαν στο μάθημα  
*ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ* το ακαδημαϊκό έτος  
2020-2021



**Νεότερα Δεδομένα για τη μάχη κατά της πανδημίας από τον Νέο Κορωνοϊό SARS-CoV-2**

Συγγραφείς:

Αιβάνιστου Μαρία, Αντωνιάδης Κυριάκος, Καρυδάκη Κωνσταντίνα-Ελίνα,  
Λαμπόγλου Γιασεμή, Λέφας Δημήτριος, Λούσκου Γεωργία, Νέστωρα Αλεξάνδρα,  
Πλευρίδη Μαρία, Σολακούδη Ευμορφία

Υπό την Επιμέλεια της Διδάσκουσας, κ. Κυριακής Παπαγεωργίου

Συντονιστής: Αναπληρωτής Καθηγητής του ΤΒΕΤ, κ. Θεολόγος Μιχαηλίδης

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

*Ερευνητικές Μέθοδοι Γενετικής Μηχανικής*  
2021

ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ  
ΜΗΧΑΝΙΚΗΣ

**Εικόνες εξωφύλλου:**

**Πάνω αριστερά:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της πρόσδεσης της πρωτεΐνης spike (κόκκινο) του ιού SARS-CoV-2 στους υποδοχείς ACE-2 (μπλε) σε ένα ανθρώπινο κύτταρο: το αρχικό στάδιο της ασθένειας COVID-19.

**Πηγή:** Juan Gaertner/Science Photo Library

**Κέντρο αριστερά:** Η ανάπτυξη εμβολίων έναντι της ασθένειας COVID-19 αποτελούν πολύτιμα εργαλεία για την προστασία από τη νόσο.

**Πηγή:** <https://www.genengnews.com/news/sars-cov-2-prototype-vaccine-protects-macaques>

**Πάνω δεξιά:** Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης η οποία απεικονίζει αντίγραφα του ιού SARS-CoV-2 (μπλε κυκλικά σωματίδια) να εξέρχονται στην επιφάνεια κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με τον ιό και καλλιιεργήθηκαν στο εργαστήριο. Ο ιός έχει απομονωθεί από ασθενή στις ΗΠΑ.

**Πηγή:** NIAID's Rocky Mountain Laboratories (RML) in Hamilton, Montana, USA.

**Κέντρο δεξιά:** Φωτογραφία συνεστιακής μικροσκοπίας όπου απεικονίζεται το RNA του ιού SARS-CoV-2 (ροζ) και ο υποδοχέας ACE2 (λευκός) σε κύτταρα σιελογόνου αδένων (πράσινα) που έχουν απομονωθεί από ασθενή ο οποίος είχε μολυνθεί με τον ιό.

**Πηγή:** Huang, N., Pérez, P., Kato, T. et al. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nat Med* 27, 892–903 (2021). Φωτογραφία: Paola Perez, Ph.D., National Institute of Dental and Craniofacial Research.

**Κάτω:**

Ο ιός SARS-CoV-2 δεν μεταλλάσσεται γρηγορότερα στις μέρες μας. Αφήνοντάς τον όμως να εξαπλώνεται σε όλο τον κόσμο, του δώσαμε (και του δίνουμε) ολόένα και περισσότερες ευκαιρίες να μεταλλάσσεται καθώς αντιγράφεται. Το αποτέλεσμα είναι ότι μετά από αμέτρητες τυχαίες μεταλλάξεις, ο ιός αρχίζει πλέον να προσαρμόζεται στις φυσικές μας άμυνες. Και επειδή είναι απόλυτα φυσιολογικό ένας ιός να αλλάζει με την πάροδο του χρόνου, αυτό είναι κάτι που δεν πρόκειται να σταματήσει αν εμείς δεν σταματήσουμε να του δίνουμε τόσες πολλές ευκαιρίες. Πως? Ο βασικότερος τρόπος είναι ο ταχύτερος εμβολιασμός του συνόλου του πληθυσμού του πλανήτη, ανεξάρτητα από εισόδημα, κοινωνική θέση ή εθνότητα.

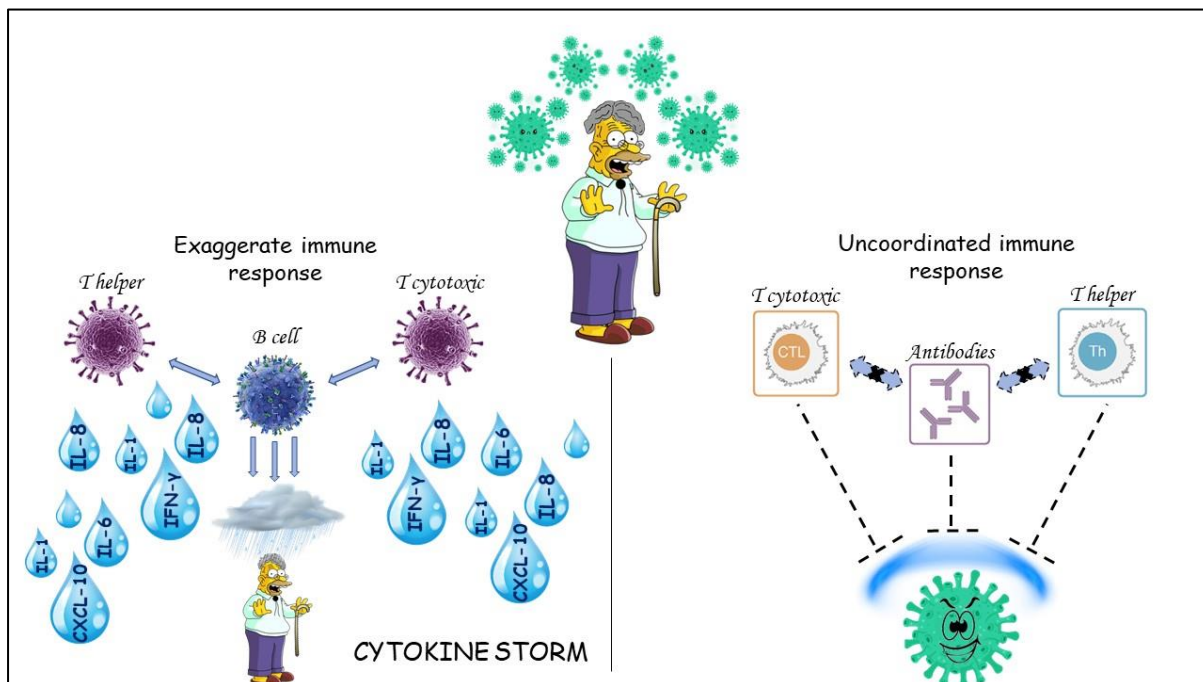
## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I. Ενότητα 1: Η μοριακή βιολογία του ιού SARS-CoV-2 και η σχέση του με τον ξενιστή του .....</b>	<b>1</b>
1. <b>Καρυδάκη Κωνσταντίνα-Ελίνα:</b> «Καταγισμός» SARS-CoV-2: Ηλικία & Ανοσοποιητικό φέρνουν την αυτοκαταστροφή.....	2
2. <b>Λαμπόγλου Γιασεμή:</b> Το επαναστατικό CRISPR ως εργαλείο για τη μελέτη του ιού SARS-CoV-2 .....	6
3. <b>Σολακούδη Ευμορφία:</b> Γονίδια του ξενιστή, βοηθοί στην μόλυνση από τον SARS-CoV-2.....	9
<b>II. Ενότητα 2: Οι μηχανισμοί στους οποίους στηρίζονται συμβατικά και/ή καινοτόμα φάρμακα για την αντιμετώπιση της ασθένειας Covid-19.....</b>	<b>13</b>
1. <b>Λούσκου Γεωργία:</b> Long-acting nanoparticulate DNase-1 έναντι SARS-CoV-2 εξαρτώμενη σηψαιμία: 1-0 .....	14
2. <b>Νέστωρα Αλεξάνδρα:</b> Remdesivir & Favipiravir: Πιθανοί σύμμαχοί μας ενάντια στον SARS-CoV-2? .....	18
<b>III. Ενότητα 3: Οι κατηγορίες, οι μηχανισμοί δράσης και η αποτελεσματικότητα των παραδοσιακών και σύγχρονων εμβολίων εναντίον του ιού SARS-CoV-2.....</b>	<b>22</b>
1. <b>Αλιβάνιστου Μαρία:</b> Εμβόλιο BNT162b1: “more is not always better” ....	23
2. <b>Αντωνιάδης Κυριάκος:</b> Εμβόλιο ChAdOx1 nCoV-19: η σημασία της δεύτερης δόσης του εμβολίου στην παρατεταμένη ανοσία έναντι του SARS-CoV-2 .....	26
3. <b>Λέφας Δημήτριος:</b> Υπολογιστικά προγράμματα: Ένα παράδειγμα παραπλανητικής πρόβλεψης κατά τον σχεδιασμό του SARS-CoV-2 εμβολίου .....	30
4. <b>Πλευρίδη Μαρία:</b> Ανοσολογικές αποκρίσεις του INO-4800: υποψήφιο DNA εμβόλιο κατά της COVID-19 .....	34

**Ενότητα 1: Η μοριακή βιολογία του ιού SARS-CoV-2 και η σχέση του με τον ξενιστή του**

«Καταιγισμός» SARS-CoV-2: Ηλικία & Ανοσοποιητικό φέρνουν την αυτοκαταστροφή

Από την Καρυδάκη Κωνσταντίνα-Ελίνα  
(ΑΜ: 1983)



**Εικόνα 1:** Οι ηλικιωμένοι ύστερα από μόλυνση με τον ιό SARS-CoV-2 έρχονται αντιμέτωποι με την απορρύθμιση του ανοσοποιητικού τους συστήματος μέσω 2 φαινομένων: της μη συνέργειας των T λεμφοκυττάρων και της καταιγίδας κυτταροκινών.

Η παρούσα μελέτη [C. R. Moderbacher et. al. 2020], εισάγει την έννοια του μη συγχρονισμού του ανοσοποιητικού συστήματος, ενάντια στην προσβολή από τον ιό SARS-CoV-2 και το ρόλο που διαδραματίζει η ηλικία. Η έρευνα για την επιστράτευση της ειδικής ανοσιακής απόκρισης από τον οργανισμό, δίνει την απάντηση στην ποικιλία των κλινικών καταστάσεων, στην πιθανότητα επανα-προσβολής, καθώς και στη χρονική τοποθέτηση της ανοσιακής μας απάντησης, της διάρκειας της νόσου και της ανοσίας μας. Μια συγχρονισμένη ανοσιακή απόκριση, από έναν υγιή οργανισμό εξουδετερώνει τον ιό και έτσι η προσοχή στρέφεται στους ηλικιωμένους. Η μη συνέργεια των λεμφοκυττάρων και το μειωμένο απόθεμα παρθένων T κυττάρων, μπορούν να οδηγήσουν στην αυτοκαταστροφή, μέσω της απορρύθμισης και υπερδιέγερσης του ανοσοποιητικού, ένα φαινόμενο που ονομάζεται «ανοσοπαθογένεση» με βασικό αίτιο την «καταιγίδα κυτταροκινών».

Η μη συνέργεια των T λεμφοκυττάρων έγκειται στη συχνά αργοπορημένη ενεργοποίηση κάποιου συστατικού της ειδικής ανοσίας. Στην παρούσα έρευνα συμπεριλήφθηκαν 30 άτομα, τα οποία βρίσκονταν σε οξεία ή ήπια φάση της ασθένειας ή ήταν

πρώην ασθενείς, που πλέον βρίσκονταν υπό ανάρρωση. Οι ερευνητές κάνουν λόγο για τη δυσμενή κλινική κατάσταση ατόμων του δείγματος, η οποία οφείλεται στο μη συγχρονισμό της ειδικής ανοσιακής τους απόκρισης - T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4+) και T κυτταροτοξικά κύτταρα (CD8+)- και της μη έγκαιρης ανάπτυξης αντισωμάτων.

Με αυτά τα παραδείγματα, γίνεται αντιληπτή η ποικιλία των περιπτώσεων στις οποίες η ανοσία μπορεί να δράσει ελλειμματικά ή/και αργοπορημένα, με αποτέλεσμα να μην είναι προβλέψιμη η εξέλιξη της νόσου. Για το λόγο αυτό, οι ερευνητές επιτέλεσαν την 1<sup>η</sup> ταυτόχρονη μέτρηση της παραγωγής εξουδετερωτικών αντισωμάτων, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας, σε μια προσπάθειά τους να μελετήσουν τη συμβολή των 2 αυτών φαινομένων στην κρισιμότητα της μόλυνσης. Το βασικότερο συμπέρασμα στο οποίο οδηγήθηκαν ήταν πως η ανάπτυξη αντισωμάτων δε σχετίζεται με την αποτελεσματική αντιμετώπιση της ασθένειας και την ήπια εξέλιξή της, ενώ άλλα συστατικά της ανοσίας είναι υπεύθυνα για την καταπολέμηση του υπό διερεύνηση ιού. Στρεφόμενοι, λοιπόν, στην ειδική ανοσία, καταλήγουν πως τα T βοηθητικά κύτταρα (CD4+) είναι μειωμένα σε οξείες περιπτώσεις μόλυνσης, ενώ αυξάνονται δραματικά σε ασθενείς που βρίσκονται υπό ανάρρωση, μαζί με την αύξηση και των αντισωμάτων, για τα οποία η επικουρική δράση των CD4+ είναι καθοριστική. Μελετώντας και τα T κυτταροτοξικά κύτταρα (CD8+), οι ερευνητές πραγματοποιούν ανάλογες παρατηρήσεις, γεγονός που τους οδηγεί στη λογική, αλλά εξαιρετικά χρήσιμη παρατήρηση, πως μόνο η συγχρονισμένη δράση των CD4+ και CD8+ T κυττάρων, προοιωνίζει την ήπια εξέλιξη της νόσου και με αποτυχία της συνέργειας αυτής, τα άτομα οδηγούνται σε σοβαρή ασθένεια. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από την ερευνητική ομάδα των Y. Kalpakci et. al, οι οποίοι καταμετρούν το ποσοστό διπλά θετικών κυττάρων (CD4+ CD8+), το οποίο εμφανίζεται σημαντικά μειωμένο σε ασθενείς με σοβαρή εξέλιξη της ασθένειας COVID-19 και καταλήγουν στο συμπέρασμα πως εκτός από την κρισιμότητα της ασθένειας, σημαντική είναι και η περίπτωση, λόγω του φαινομένου αυτού, να υπάρξει ευπάθεια απέναντι σε μια επόμενη προσβολή από τον ιό.

Εκτός από το φαινόμενο του μη συγχρονισμού των συστατικών της ανοσίας, οι ασθενείς έρχονται αντιμέτωποι και με το σύνδρομο της καταιγίδας κυτταροκινών. Το σύνδρομο αυτό αντιπροσωπεύεται από υπερενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, σε μία προσπάθεια καταπολέμησης του ιού, με αποτέλεσμα τον «καταιγισμό» αντι-ικών και αντι-φλεγμονωδών κυτταροκινών, που καθίστανται επικίνδυνες για τον ίδιο τον οργανισμό. Με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής, οι ερευνητές κατέγραψαν σε περιπτώσεις ασθενών με οξεία εξέλιξη της ασθένειας, υψηλά επίπεδα IFN- $\gamma$ , CD40-CD40L, CXCL10, TNF $\alpha$ , καθώς και μια ευρεία ομάδα ιντερλευκινών (IL-), εκτός όμως από την IL-17, η οποία καθιστά και έναν περιορισμό στην παρούσα έρευνα και θα συζητηθεί παρακάτω. Οι πολύ υψηλοί τίτλοι των μορίων αυτών, σε συνδυασμό με την ανικανότητα αντιμετώπισης του ιού από τον οργανισμό, οδηγούν στο συμπέρασμα, πως η ειδική ανοσιακή απόκριση, η οποία είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση μορίων όπως τα προαναφερθέντα, κυριεύεται από υπέρμετρη δραστηριοποίηση, αλλά ταυτόχρονα αδυναμία συντονισμού των συστατικών της, ώστε και να καταπολεμηθεί η μόλυνση και να μη διακινδυνεύσει η ακεραιότητα του οργανισμού.

Η ανάγκη μελέτης κι άλλων παραμέτρων που μπορεί να συμβάλλουν στα φαινόμενα αυτά, οδήγησε τους ερευνητές στη διερεύνηση του ρόλου που διαδραματίζει η ηλικία στην

εξέλιξη της νόσου και στην εμφάνιση παθογένεσης. Οι μελέτες, πλέον, πραγματοποιήθηκαν σε αυξημένο δείγμα κατά 34 άτομα, ηλικίας άνω των 65 ετών, με μετρήσεις που δίνουν την απάντηση στα υψηλά ποσοστά προσβολής των γηραιότερων από τον ιό SARS-CoV-2. Ο συσχετισμός του χαμηλού αποθέματος παρθένων T κυττάρων (CD4+ & CD8+) με τη σοβαρότητα της ασθένειας ήταν ισχυρός και αποδεικνύει για μία ακόμη φορά, πως μόνο αν η ειδική ανοσία επιστρατευτεί εγκαίρως και συντονισμένα, υπάρχει δυνατότητα αντιμετώπισης του ιού. Σε αυτά τα δεδομένα έρχονται να προσθέσουν οι Meftahi et.al, οι οποίοι συνδέουν το γεγονός αυτό με δυσλειτουργία στην προ- και αντι-φλεγμονώδη ανοσοαπόκριση του οργανισμού, κατά το σύνδρομο της καταιγίδας κυτταροκινών.

Οι ερευνητές για την πραγματοποίηση των μελετών τους και για τη συνεισφορά των παρατηρήσεών τους στον αγώνα έναντι του ιού SARS-CoV-2, χρησιμοποίησαν ένα επαρκές δείγμα ατόμων, ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν έγκυρα αποτελέσματα, που να αντιπροσωπεύουν πληθώρα ομάδων. Η ανάγκη, ωστόσο, για μαζική εξέταση ακόμη περισσότερων πληθυσμών κρίνεται αναγκαία. Το υπό ανάλυση δείγμα περιορίστηκε σε απόσπαση αίματος των ασθενών, ένα εργαλείο που δίνει πολλές πληροφορίες για την κατάσταση του οργανισμού, αλλά και πάλι υστερεί έναντι μίας ολιστικής μελέτης του σώματος, όπως θα ήταν η ανάλυση και των πνευμόνων, όργανο που αποτελεί βασικό στόχο του παρόντος ιού. Πληροφορίες για το βαθμό προσβολής των πνευμόνων έδωσε η ερευνητική ομάδα των E. Wauters et. al., οι οποίοι για την εξαγωγή των συμπερασμάτων τους χρησιμοποίησαν τη μέθοδο single cell RNA sequencing σε κύτταρα βρογχοκυψελίδων και αντιπαρέθεσαν τα αποτελέσματά τους σχετικά με τα μη ανιχνεύσιμα επίπεδα IL-17 στο αίμα, καθώς η ιντερλευκίνη αυτή αποτελεί ένα μόριο το οποίο εδράζεται κυρίως στους πνεύμονες. Για τον εντοπισμό των καταγεγραμμένων κυτταροκινών, οι ερευνητές του υπό μελέτη άρθρου χρησιμοποίησαν τεχνικές ενδοκυττάριου χρωματισμού κυτταροκινών και κυτταρομετρία ροής, με σκοπό την παρατήρηση της απόκρισης των κυττάρων στο χρόνο, γεγονός που αποτελεί και έναν από τους βασικούς στόχους τους. Μετρήθηκαν κυτταροκίνες τόσο στον ορό, όσο και στο πλάσμα του αίματος, ενώ με ex vivo ανοσοεντοπισμό πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των παραγόμενων αντισωμάτων.

Οι ερευνητές συνέβαλαν σημαντικά στη διερεύνηση των αιτιών που οδηγούν έναν οργανισμό στην κάμψη έναντι της μόλυνσης και στην πρωτογενή μελέτη της απόκρισης του οργανισμού σε μία τέτοια κατάσταση. Εντόπισαν την αργοπορημένη και μη συντονισμένη ενεργοποίηση της ειδικής ανοσίας, που ορίζεται από τη δράση των T βοηθητικών και T κυτταροτοξικών κυττάρων, τη συνεργασία τους προς απελευθέρωση υπέρμετρων κυτταροκινών έναντι του ιού, καθώς και τη συμβολή της ηλικίας στην επιδείνωση της προσβολής, μέσω του μειωμένου αποθέματος παρθένων T κυττάρων των ατόμων. Γνωρίζοντας ακόμα καλύτερα τους μηχανισμούς δράσης του σώματος, μπορεί σίγουρα η ερευνητική κοινότητα να προσεγγίσει την καταπολέμηση της κρίσιμης αυτής προσβολής από τον ιό SARS-CoV-2.

## **Βιβλιογραφία**

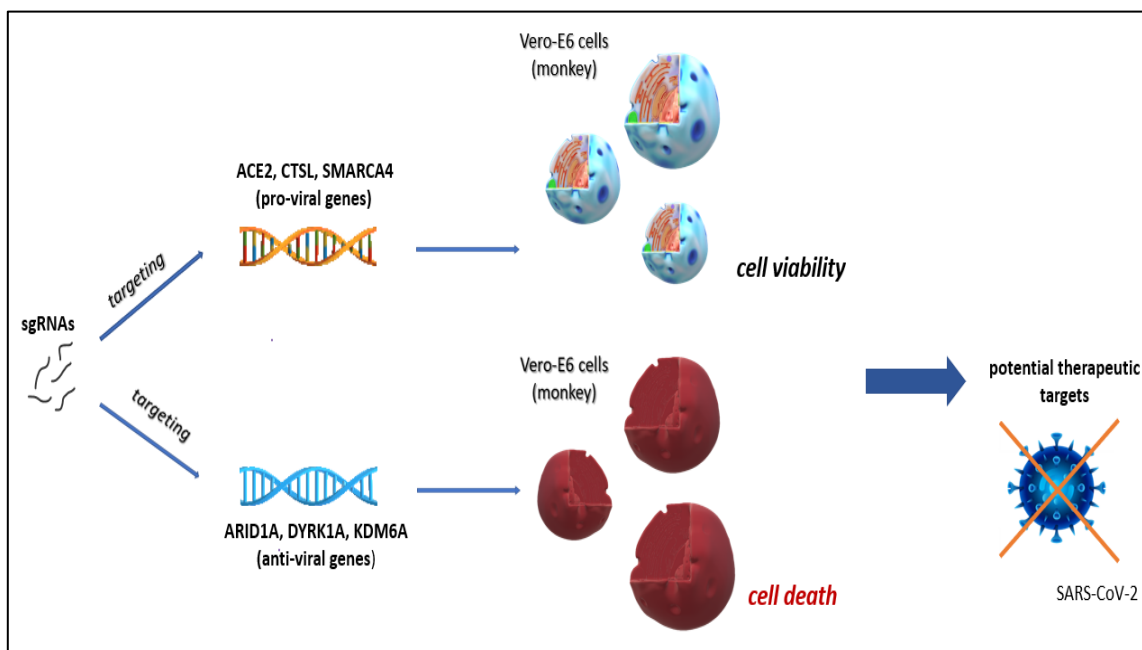
1. *Moderbacher C. R. et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity, Cell 183, 996–1012 (2020).*

2. *Kalpakci Y. et al. Comparative evaluation of memory T cells in COVID-19 patients and the predictive role of CD4+ CD8+ double positive T lymphocytes as a new marker, SciELO 12, 1666-1672 (2020).*
3. *Meftahi G. H et al. The possible pathophysiology mechanism of cytokine storm in elderly adults with COVID-19 infection: the contribution of “inflamm-aging”, Nature 11, 1–15 (2020).*
4. *Wauters E. et al. Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages, Cell research 31, 272–290 (2021).*



*Το επαναστατικό CRISPR ως εργαλείο για τη μελέτη του ιού SARS-CoV-2*

Από την Λαμπόγλου Γιασεμή  
(AM: 1999)



**Εικόνα 1:** Στοχεύοντας με sgRNAs προ-ικά γονίδια σε κύτταρα μαϊμούς Vero-E6 παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα επέζησαν. Αντιθέτως όταν sgRNAs στόχευσαν αντι-ικά γονίδια σε όμοια κύτταρα, επέφεραν κυτταρικό θάνατο. Τα παραπάνω δίνουν στοιχεία τα οποία μπορεί να οδηγήσουν σε πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

Η προκαλούμενη πανδημία από τον SARS-CoV-2 μαστίζει τον πλανήτη τον τελευταίο ενάμισι περίπου χρόνο και αποτελεί μια νέα πρόκληση για τους επιστήμονες ανά τον κόσμο. Σε μία από τις αμέτρητες προσπάθειες αντιμετώπισης του ιού χρησιμοποιήθηκε μια νέα, επαναστατική και πολλά υποσχόμενη τεχνολογία, αυτή του CRISPR. Σε επιστημονική έρευνα ταυτοποίησης παραγόντων που σχετίζονται με την είσοδο του ιού στα κύτταρα, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά ανάλυση CRISPR σε ολόκληρο το γονιδίωμα, για γονίδια του ξενιστή που επηρεάζουν τη μόλυνση με τους ιούς SARS-CoV-2, MERS-CoV, CoV HKU5-SARS CoV-1-S (ανασυνδυασμένος ιός που εκφράζει την ακίδα του ιού SARS-CoV-1) που προσβάλλει νυχτερίδες και rcVSV-SARS-CoV-2-S (ανασυνδυασμένος ιός που εκφράζει την ακίδα του ιού SARS-CoV-2). Ταυτοποιήθηκαν βασικοί υικοί υποδοχείς όπως ο ACE2 υποδοχέας του SARS-CoV-2, ο DPP4 υποδοχέας του MERS-CoV και η πρωτεάση Cathepsin L που παίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση εισόδου του SARS-CoV-2 στο κύτταρο. Επίσης, επικυρώθηκαν τα βασικά γονίδια προ-ιογενούς όπως τα SMARCA4, SMAD3 και αντι-ικής φύσεως όπως τα ARID1A, KDM6A και ταυτοποιήθηκαν ανταγωνιστές μικρών μορίων, των γονιδίων που παρέχουν προστασία έναντι του προκαλούμενου από SARS CoV-2 κυτταρικού θανάτου και της επιμόλυνσης σε κύτταρα Vero-E6, μεταξύ άλλων. Στα πλειονότητα των πειραμάτων για να αποκαλυφθούν γονίδια ξενιστές που απαιτούνται για τη λοίμωξη από SARS-CoV-2

**πραγματοποιήθηκε ανάλυση CRISPR σε κυτταρικές σειρές *Chlorocebus sabaues* (αφρικανική πράσινη μαϊμού ή βερβेट), εν συντομία Vero-E6, λόγω ιδιαίτερων πλεονεκτημάτων που παρέχουν σχετικά με την καταγωγή του SARS.**

Πραγματοποιήθηκαν 6 βασικά πειράματα. Στο πρώτο πείραμα έγινε ανάλυση CRISPR σε ολόκληρο το γονιδίωμα για τους ιούς που αναφέρθηκαν για να εντοπιστούν γονίδια που προσδίδουν αντίσταση ή ευαισθησία στη μόλυνση από αυτούς. Από την SARS-CoV-2 CRISPR ανάλυση προέκυψαν πολλά γονίδια που προσδίδουν αντίσταση (προ-ικα) ή ευαισθησία (αντι-ικα) όταν στοχεύονται από sgRNAs. Ο ισχυρότερος στόχος αντίστασης φάνηκε ότι ήταν ο ικός υποδοχέας ACE2 και το γονίδιο CTSL που παίζει βασικό ρόλο στην είσοδο του ιού στο κύτταρο. Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκε να έχει διαφορετικό πείραμα από τη βιβλιογραφία <sup>[2]</sup> όπου πραγματοποιήθηκε CRISPR ανάλυση σε ολόκληρο το γονιδίωμα βασισμένη στην επιβίωση των κυττάρων A549-ACE2 που μολύνθηκαν με τον ιό Sdel και μετασχηματίστηκαν με βιβλιοθήκη sgRNAs. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο κορυφαίος στόχος ήταν ο ACE2, και το γονίδιο CTSL<sup>[1]</sup>.

Στο δεύτερο πείραμα εστιάζοντας μόνο στον ιό SARS-CoV-2, έγινε προσπάθεια εντοπισμού σετ γονιδίων εμπλουτισμένα στην SARS-CoV-2 ανάλυση CRISPR, χρησιμοποιώντας το εργαλείο εντοπισμού εμπλουτισμού STRING-db. Στα αποτελέσματα φάνηκε ότι η SMARCA4, η καταλυτική υπομονάδα του συγκροτήματος αναδιαμόρφωσης SWI/SNF, ήρθε μετά το ACE2 ως ο δεύτερος ισχυρότερος στόχος αντίστασης του SARS-CoV-2.

Στο τρίτο πείραμα έγινε προσπάθεια εντοπισμού της εξειδίκευσης διαφόρων γονιδίων για τους ιούς. Αυτό επιτεύχθηκε στοχεύοντας τα πιο σημαντικά και λιγότερο σημαντικά γονίδια με control sgRNAs, και με sgRNAs που στόχευαν άλλα γονίδια ενδιαφέροντος. Εισήχθησαν ο ορθομυξοϊός IAV, ο πικο-ιός EMCV και ο VSV ως ιοί κοντρόλ, οι οποίοι προκαλούν κυτταροπαθητικά αποτελέσματα στα κύτταρα Vero-E6. Εστιάζοντας στους κορυφαίους στόχους αντίστασης για κάθε ανάλυση ιών, βρέθηκαν γονίδια ειδικά για τη γενεαλογία SARS (ACE2), γενεαλογία MERS (DPP4) και γονίδια ειδικά για όλους τους CoVs (CTSL, ARID1A).

Στο τέταρτο πείραμα επιλέχθηκαν 25 γονίδια για περαιτέρω επιβεβαίωση της ανάλυσης CRISPR του SARS-CoV-2, εκ των οποίων τα 18 ήταν γονίδια αντίστασης και τα 7 ευαισθητοποίησης. Έγινε στοχοποίηση με sgRNAs και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων. Στα αποτελέσματα φάνηκε ότι κύτταρα με sgRNAs που στόχευαν προ-ϊκά γονίδια παρουσίασαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα από κύτταρα που περιείχαν control sgRNAs μη στόχευσης. Επίσης κύτταρα με sgRNAs που στόχευαν αντι-ικα γονίδια παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία στον κυτταρικό θάνατο σε σχέση με τα control. Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με πείραμα από τη βιβλιογραφία <sup>[3]</sup>, όπου παρουσιάζονταν ομοιότητες, όπως το γεγονός ότι τα κύτταρα στα οποία μεταφέρθηκαν sgRNAs που στόχευαν παράγοντες που απαιτούνται για ιογενή λοίμωξη επιβίωσαν, ενώ δίνουν μια εικόνα για το ρόλο των sgRNAs στα γονίδια και συνεπώς στη μόλυνση των κυττάρων από τον ιό.

Όσον αφορά το πέμπτο πείραμα, δεδομένου του προ-ιογενούς ρόλου συγκεκριμένων μονοπατιών και γονιδίων, ελέγχθηκε αν ανταγωνιστές μικρών μορίων αυτών των μονοπατιών

έχουν αντι-ικική δράση κατά του SARS-CoV-2. Συγκεκριμένα, η θεραπεία με PFI-3, που στοχεύει τις περιοχές με βρώμιο των πρωτεϊνών SMARCA4 και SMARCA2 του συμπλόκου SWI/SNF, παρείχε προστασία από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από ιό και μείωσαν τη συχνότητα ιογενούς λοίμωξης.

Τέλος, για το έκτο πείραμα σκοπός ήταν να επικυρωθεί ο βασικός ρόλος του HMGB1 στην έκφραση του ACE2 και συνεπώς στη μόλυνση από SARS-CoV-2. Παρουσιάστηκαν λοιπόν δύο ανεξάρτητα sgRNAs που στοχεύουν το HMGB1 σε καθεμία από τις τρεις ανεξάρτητες κυτταρικές σειρές: Vero-E6, Huh7.5 και Calu-3. Επιβεβαιώθηκε η μείωση της πρωτεΐνης HMGB1 με Western blot, και φάνηκε ότι η HMGB1 προστάτευε τα κύτταρα από τον κυτταρικό θάνατο που προκαλείται από το SARS-CoV-2, καθώς η μόλυνση στα κύτταρα επέφερε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της HMGB1 στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα, και έτσι το επίπεδο προστασίας συσχετίστηκε με αυτή.

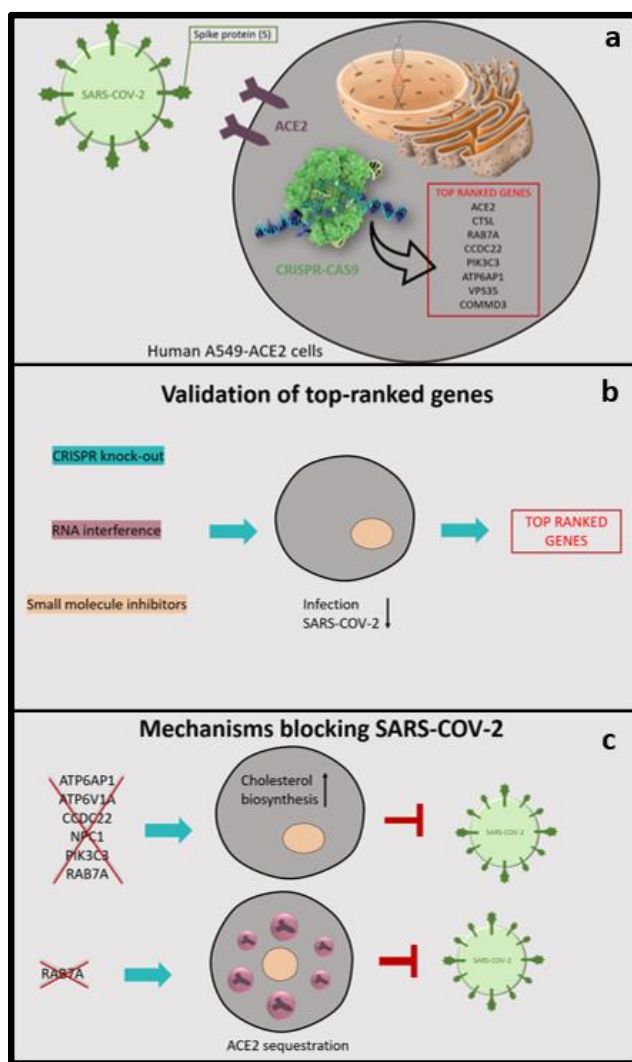
Οι περιορισμοί που αναφέρονται και αφορούν την έρευνα είναι εύλογοι όπως το γεγονός ότι οι μηχανισμοί με τους οποίους τα γονίδια επηρεάζουν την μόλυνση από τους ιούς παραμένουν άγνωστοι και ότι παρόλο που τα κύτταρα Vero είναι πρότυπο κυτταρικής σειράς για τους CoVs δεν αντιπροσωπεύουν πλήρως πρωταρχικά κύτταρα όπως τα ανθρώπινα. Συμπερασματικά, ο ισχυρότερος στόχος αντίστασης για τον SARS-CoV-2 είναι ο ικός υποδοχέας ACE2, το γονίδιο CTSL και η καταλυτική υπομονάδα SMARCA4, υπήρξαν όμως και άλλοι σημαντικοί στόχοι αντίστασης οι οποίοι σχετίζονταν με τη γενεαλογία των ιών. Επίσης η στόχευση κυττάρων με sgRNAs αποτελεί πολύ σημαντικό εργαλείο καθώς όταν στοχεύονται προ-ικικά γονίδια τα κύτταρα επιβιώνουν, ενώ αντίθετα, η στόχευση στα αντι-ικικά γονίδια επιφέρει κυτταρικό θάνατο. Η εύρεση και μόνο γονιδίων που επηρεάζουν τη μόλυνση από τον ιό είναι πολύ σημαντικό δεδομένο, πόσο μάλλον το γεγονός ότι μπορούμε να παρέμβουμε σε αυτά, καθώς ανοίγουν νέες οδοί θεραπείας. Άξιο αναφοράς είναι επίσης η θεραπεία με PFI-3 όπου μειώθηκε αισθητά η συχνότητα ιογενούς λοίμωξης αλλά και το ότι η HMGB1 προστάτευε τα κύτταρα από κυτταρικό θάνατο, τα οποία μπορούν μελλοντικά να συμβάλουν σε τεράστιο βαθμό στην αντιμετώπιση της πανδημίας.

## **Βιβλιογραφία**

1. Wei J. et al., *Genome-wide CRISPR Screens Reveal Host Factors Critical for SARS-CoV-2 Infection*, *Cell* 184, 76–91 (2021).
2. Yunkai Z. et al., *Nature Communications*, *A genome-wide CRISPR screen identifies host factors that regulate SARS-CoV-2 entry* (2021).
3. Hoffmann H. et al., *Functional interrogation of a SARS-CoV-2 host protein interactome identifies unique and shared coronavirus host factors*, *Cell Host & Microbe* 29, 267–280 (2021).
4. Wang R. et al., *Genetic Screens Identify Host Factors for SARS-CoV-2 and Common Cold Coronaviruses*, *Cell* 184, 106–119 (2021).
5. Schneider W. M. et al., *Genome-Scale Identification of SARS-CoV-2 and Pan-coronavirus Host Factor Networks*, *Cell* 184, 120–132 (2021).

*Γονίδια του ξενιστή, βοηθοί στην μόλυνση από τον SARS-CoV-2*

Από την Σολακούδη Ευμορφία  
(ΑΜ:2044)



**Εικόνα 1:** α) Χρήση τεχνικής CRISPR-Cas9 σε ανθρώπινα κύτταρα πνεύμονα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα ACE2 (A549ACE2) και εντοπισμός των top-ranked γονιδίων που παίζουν ρόλο στη διαδικασία της μόλυνσης, β) Επιβεβαίωση των top-ranked γονιδίων με τις τρεις τεχνικές: CRISPR knock-out, RNA interference και αναστολείς μικρών μορίων, γ) Μηχανισμοί με τους οποίους επιτελείται η ανοχή προς την μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2 και σχετίζονται με το μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης και με τη συσσώρευση του υποδοχέα ACE2 στο κυτταρόπλασμα.

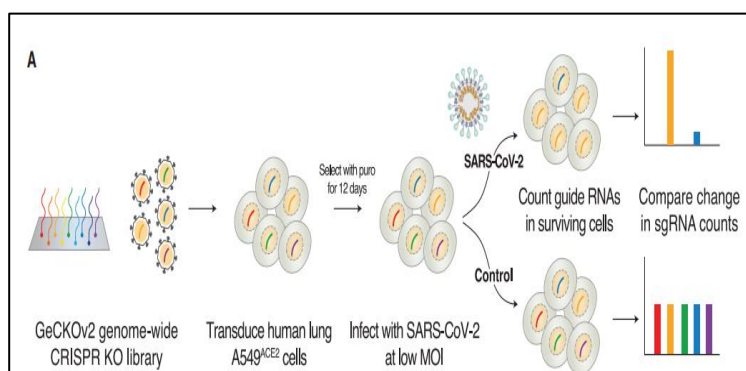
Το άρθρο με τίτλο «Identification of Required Host Factors for SARS-CoV-2 Infection in Human Cells» αποτελεί μια πρόσφατη γονιδιωματική μελέτη με στόχο τον προσδιορισμό παραγόντων και κυρίως γονιδίων του ξενιστή που απαιτούνται για τη μόλυνση από τον ιό SARS-CoV-2. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν κατά βάση την τεχνική του CRISPR-Cas9 στοχεύοντας διάφορα γονίδια, ενώ ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων τους. Με αυτό τον τρόπο αποκαλύφθηκαν τα γονίδια των οποίων η αποσιώπηση προκαλεί μείωση της μολυσματικότητας του ιού, και κατά συνέπεια θεωρούνται απαραίτητα στοιχεία του ξενιστή για τη διαδικασία της μόλυνσης. Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η λειτουργία των προϊόντων αυτών των γονιδίων και τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν. Πιο συγκεκριμένα, έγινε λόγος για το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης, το οποίο φαίνεται να διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο. Το υπό

**μελέτη άρθρο αποτελεί πηγή σημαντικών δεδομένων όσον αφορά τη διερεύνηση του ιού, καθώς επίσης και βάση πάνω στην οποία μπορούν να στηριχτούν μελλοντικές έρευνες.**

Το άρθρο, αρχικά, κάνει αναφορά σε κάποια χαρακτηριστικά του ιού SARS-CoV-2, όπως είναι η σημασία της πρωτεΐνης ακίδας, η οποία συνδέεται με τον υποδοχέα των κυττάρων ξενιστών ACE2. Ιδιαίτερα σημαντική φαίνεται να είναι και η διαδικασία της πρωτεολυτικής διάσπασης της πρωτεΐνης ακίδας από πρωτεάσες του ξενιστή, τόσο για την σύντηξη των μεμβρανών όσο και για την απελευθέρωση του RNA από τον ιό.

Το πρώτο και βασικότερο πείραμα αυτού του άρθρου είναι η απώλεια λειτουργίας

γονιδίων μέσω της διαδικασίας CRISPR σε επίπεδο γονιδίου. Χρησιμοποιήθηκε κυτταρική σειρά από ανθρώπινα κύτταρα πνεύμονα που υπερέκφραζαν τον υποδοχέα ACE2 (A549<sup>ACE2</sup>) και μετασχηματίστηκε με την εισαγωγή φορέα, ο οποίος περιλάμβανε γονίδιο για την πρωτεΐνη Cas9, guide RNAs και γονίδιο ανθεκτικότητας στην πουρομυκίνη.



**Εικόνα 2:** Διαδικασία CRISPR- Cas9 σε ανθρώπινα κύτταρα πνεύμονα που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα ACE2 (A549<sup>ACE2</sup>) και μέτρηση των αποτελεσμάτων.

Αφού πραγματοποιήθηκε επιλογή των κυττάρων με πουρομυκίνη, επιμολύνθηκαν με τον ιό SARS-CoV-2 σε δύο συνθήκες μόλυνσης, υψηλής (0.3 MOI) και χαμηλής (0.01 MOI), και στη συνέχεια μετρήθηκαν τα κύτταρα που επιβίωσαν, καθώς και η αφθονία των guide RNAs σε αυτά. Με τη διαδικασία αυτή διαπιστώθηκαν ποια γονίδια, μετά την απώλεια λειτουργίας τους, προσέφεραν ανοσία προς τον ιό. Με άλλα λόγια, ποια γονίδια είναι απαραίτητα για την μόλυνση των κυττάρων από τον SARS-CoV-2.

Με βάση τα αποτελέσματα δημιουργήθηκαν κάποιες κατηγορίες γονιδίων του ξενιστή σχετικά με τη λειτουργία τους και τα μονοπάτια, στα οποία παίρνουν μέρος. Οι κατηγορίες αυτές περιλαμβάνουν: προσκόλληση και ενδοκυττάρωση, διάσπαση πρωτεΐνης ακίδας και σύντηξη μεμβρανών, ενδοσωμική ανακύκλωση, μετακίνηση ER-Golgi, καθώς και ρυθμιστές μεταγραφής.

Στη συνέχεια, οι ερευνητές εκτέλεσαν μια σειρά πειραμάτων σε ένα μέρος μόνο των γονιδίων που μελέτησαν, έτσι ώστε να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματά τους. Με τις διαδικασίες CRISPR Knockout, RNA interference (RNAi) και με αναστολείς μικρών μορίων διαπιστώθηκε όντως μείωση της μόλυνσης από τον ιό.

Θέλοντας να καταλάβουν τον τρόπο με τον οποίο η αλλαγή ενός γονιδίου επηρεάζει την ανοσία προς τον ιό, παρατηρήθηκε πως η απώλεια λειτουργίας συγκεκριμένων γονιδίων, όπως για παράδειγμα των ATP6AP1, RAB7A και PIK3C3, οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης χοληστερόλης (10% - 50%). Για να εξακριβωθεί εάν η βιοσύνθεση της χοληστερόλης συνέβαλλε με κάποιο τρόπο στην ανοσία των κυττάρων, χορηγήθηκε σε αυτά αλμοδιπίνη, η οποία αποτελεί ανταγωνιστή του καναλιού-ασβεστίου και αυξάνει την

παραγόμενη ενδοκυττάρια χοληστερόλη. Πράγματι, η αύξηση της χοληστερόλης στα κύτταρα οδήγησε τελικά σε μείωση της ιικής μόλυνσης, καθιστώντας έτσι την αλμοδιπίνη πιθανό φάρμακο κατά του SARS-CoV-2.

Ένα γονίδιο υψηλού ενδιαφέροντος φαίνεται να είναι και το γονίδιο RAB7A. Η πρωτεΐνη Rab7a είναι μια μικρή GTPase που εμπλέκεται σε διαδικασίες, όπως η μεταφορά κυστιδίων και η διακίνηση μεμβρανών. Η απώλεια λειτουργίας του γονιδίου αυτού οδηγεί σε μειωμένη έκφραση του υποδοχέα ACE2 στην επιφάνεια των κυττάρων ξενιστών, καθώς και συσσώρευση του στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που πιθανώς οφείλεται στον εγκλωβισμό του υποδοχέα σε κυστίδια. Επιπλέον, το RAB7A είναι ένα από τα γονίδια που εμπλέκονται και επηρεάζουν το μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης, καθιστώντας το ένα από τα γονίδια που μπορούν να εμποδίσουν την παθογένεια του SARS-CoV-2 με πολλαπλούς τρόπους.

Η σύγκριση με άλλα άρθρα, που διαφέρουν τόσο με το κεντρικό άρθρο όσο και μεταξύ τους κυρίως ως προς τη μεθοδολογία ή τον ιό που χρησιμοποιήθηκε, έδωσε χρήσιμες πληροφορίες στη έρευνα. Διαπιστώθηκε ότι οι μελέτες αυτές είχαν πολλές διαφορές όσον αφορά τα γονίδια που έβρισκαν, γεγονός που οφειλόταν κάθε φορά είτε σε διαφορετική τεχνική (πρωτεωμικές μελέτες) είτε σε διαφορετικό ιό (Zika virus), είτε ακόμα και σε διαφορετική κυτταρική σειρά ξενιστών (νευρικά κύτταρα, Vero E6) (Gordon, D.E. et al. 2020, Li, Y. et al. 2019, Zhu, Y. et al. 2020). Ωστόσο, τα γονίδια που επαναλαμβάνονταν συχνά στις διάφορες μελέτες σχετίζονται κυρίως με τέσσερις βασικές κατηγορίες:

- Είσοδο του ιού στα κύτταρα ξενιστές (ACE2, Καθεψίνη L)
- Επεξεργασία RNA (SNX27)
- Μετακίνηση κυστιδίων (RAB7A)
- V-ATPase (ATP6V1F, ATP6V1C1)

Το κύριο άρθρο σε συνδυασμό και με άλλες μελέτες προτείνουν, τελικά, μια σειρά γονιδίων των κυττάρων ξενιστών, των οποίων η παρουσία και δράση φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη μόλυνση από τον ιό. Η μελέτη αυτή παρέχει ουσιαστικά στους ερευνητές πιθανούς στόχους για μελλοντικές θεραπείες με στόχο την καταπολέμηση της πανδημίας. Αξιοσημείωτη είναι η αναφορά των περιορισμών του άρθρου από τους ίδιους τους ερευνητές, που με αυτό τον τρόπο υποδεικνύουν τα κενά του δικού τους άρθρου και τα σημεία, στα οποία μπορούν να στηριχτούν μελλοντικές έρευνες και να γίνουν πιο εκτενείς μελέτες. Οι περιορισμοί αφορούσαν τέσσερα σημεία: 1) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα που υπερέκφραζαν τον υποδοχέα ACE2, οπότε είναι σημαντικό να γίνουν και πειράματα σε κύτταρα που εκφράζουν σε φυσιολογικά επίπεδα τον υποδοχέα, 2) Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα του πνεύμονα μόνο και όχι σε άλλους ιστούς. Έτσι δεν ήταν δυνατόν να διαπιστωθεί εάν κάποιος από τους παράγοντες που βρέθηκαν είναι ιστοειδικός ή όχι, 3) Στο άρθρο παρατηρήθηκε και έγινε αναφορά στο ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης της χοληστερόλης επηρεάζει την ιική μόλυνση όμως δεν διευκρινίστηκε ο μηχανισμός με τον οποίο αυτό συμβαίνει και 4) Πραγματοποιήθηκε CRISPR ανάλυση μόνο σε επίπεδο γονιδίων, ενώ έχουν γίνει κάποιες αναφορές ότι και μη-κωδικές περιοχές του γονιδιώματος μπορούν να επιτελέσουν σημαντικό ρόλο στην ανοσία από τον ιό.

## **Βιβλιογραφία**

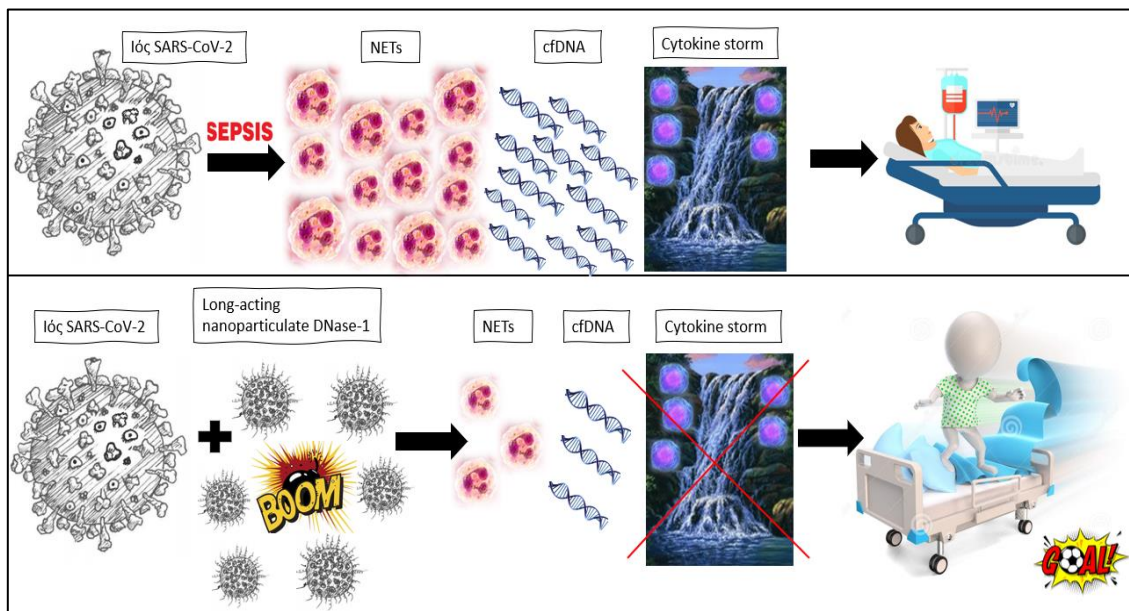
1. Daniloski, Z. *et al.* Identification of Required Host Factors for SARS-CoV-2 Infection in Human Cells. *Cell*, 184, 92–105. (2021). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.030>.
2. Zhu, Y. *et al.* The S1/S2 boundary of SARS-CoV-2 spike protein modulates cell entry pathways and transmission. *bioRxiv*. (2020). <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.266775>.
3. Li, Y. *et al.* Genome-wide CRISPR screen for Zika virus resistance in human neural cells. *PNAS*, 116 (19), 9527-9532. (2019). <https://doi.org/10.1073/pnas.1900867116>.
4. Gordon, D.E. *et al.* A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 583, 459-468. (2020).
5. Heaton, B.E. *et al.* SRSF protein kinases 1 and 2 are essential host factors for human coronaviruses including SARS-CoV-2. *bioRxiv*. (2020). <https://doi.org/10.1101/2020.08.14.251207>.
6. Wei, J. *et al.* Genome-wide CRISPR screen reveals host genes that regulate SARS-CoV-2 infection. *Cell*, 184. (2020). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.028>.

**Ενότητα 2: Οι μηχανισμοί στους οποίους στηρίζονται συμβατικά  
και/ή καινοτόμα φάρμακα για την αντιμετώπιση της ασθένειας  
Covid-19**



*Long-acting nanoparticulate DNase-1 έναντι SARS-CoV-2 εξαρτώμενη σημαμία: 1-0*

Από την Λούσκου Γεωργία  
(ΑΜ:2068)



**Εικόνα 1:** Ο ιός SARS-CoV-2 αυξάνει τα επίπεδα των NETs και cfDNA και ενεργοποιεί τον καταρράκτη κυτοκίνης, προκαλώντας σημαμία στους ασθενείς. Με την χρήση του long-acting nanoparticulate DNase-1 μειώνονται τα επίπεδα NETs και cfDNA, μειώνεται ο καταρράκτης κυτοκίνης, αναστέλλοντας την σημαμία και οδηγώντας στην ανάρρωση του ασθενή από τον ιό SARS-CoV-2.

Το άρθρο με τίτλο «Long-acting nanoparticulate DNase-1 for effective suppression of SARS-CoV-2-mediated neutrophil activities and cytokine storm» δημοσιεύτηκε τον Οκτώβριο του 2020. Ξεκινώντας, η ασθένεια Covid-19 είναι ένα εξαιρετικά μολυσματικό και θανατηφόρο σοβαρό οξύ αναπνευστικό σύνδρομο, που προκαλείται από τον ιό SARS-CoV-2. Λοιμώξεις SARS-CoV-2 χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτες φλεγμονώδεις ενδογενείς ανοσοαποκρίσεις οι οποίες προκαλούν τοπική και συστηματική βλάβη των ιστών, εξαιτίας των υψηλών επιπέδων δεικτών NETosis: cfDNA, (cell-free DNA), MPO (μυελοϋπεροξειδάση), NE (ουδέτερη ελαστάση), και ενεργοποίηση του καταρράκτη κυτοκίνης, με αποτέλεσμα να προκαλείται σηπτικό σοκ. Στο άρθρο, κατασκευάστηκαν νανοσωματίδια DNase-1 με σκοπό την αποτελεσματική καταστολή των επιπέδων NETosis και του καταρράκτη κυτοκίνης, ως μια αποτελεσματική θεραπευτική μέθοδος. Για την καλύτερη αξιολόγηση του άρθρου, έγινε σύγκριση με σχετικά άρθρα.

Οι λοιμώξεις SARS-CoV-2 προκαλούν ανεξέλεγκτες φλεγμονώδεις ενδογενείς ανοσοαποκρίσεις οδηγώντας σε τοπική και συστηματική βλάβη των ιστών, εξαιτίας των υψηλών επιπέδων δεικτών NETosis και της ενεργοποίησης του καταρράκτη κυτοκίνης. Όπως αναφέρουν οι Chuyi Tan et al. τα NETs είναι εξωκυτταρικές παγίδες ουδετερόφιλων με

αντιμολυσματική δράση. Αποτρέπουν την εξάπλωση των παθογόνων μικροοργανισμών και απενεργοποιούν τους παθογόνους παράγοντες. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στους ιστούς. Με τον όρο «καταρράκτης κυτοκίνης» αναφερόμαστε στις ξαφνικές απελευθερώσεις κυτοκίνης που συμβαίνουν όταν ένα ανοσοποιητικό σύστημα είναι υπερβολικά ενεργοποιημένο από λοίμωξη, οδηγώντας σε υψηλά επίπεδα κυτοκινών, μια επιβλαβής διαδικασία για πολλά όργανα. Λόγω της επείγουσας ανάγκης που υπάρχει για την ανάπτυξη νέων στρατηγικών θεραπείας, με στόχο την καταστολή της εξέλιξης της σηψαιμίας που προκαλείται από τον ιό SARS-CoV-2, οι ερευνητές μέσα από αυτό το άρθρο προσπαθούν να προσδιορίσουν αν οι δείκτες NETosis αυξήθηκαν σε άτομα με βαριά συμπτώματα SARS-CoV-2, να ερευνήσουν εάν η καταστολή των NETs θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για οξείες αναπνευστικές λοιμώξεις που σχετίζονται με τον Covid-19 και να προσδιορίσουν την αποτελεσματικότητα της δράσης των long-acting nanoparticulate DNase-1 (νανοσωματιδία μακράς δράσης DNase-1).

Ανέλυσαν στο αίμα ασθενών την συσχέτιση NETosis – οξεία απόκριση λόγω SARS-CoV-2. Παρουσίασαν γραφικά τα επίπεδα cfDNA, DNase-1 και Cit-Histone H3 που προέκυψαν ύστερα από εφαρμογή των τεχνικών ELISA, WESTERN BLOTTING, FACS και αξονική τομογραφία (CT) και σύγκριναν τα επίπεδα αυτά σε υγιείς και ασθενείς. Η στατιστική ανάλυση έγινε με τα στατιστικά εργαλεία (t-test). Άτομα με σοβαρά συμπτώματα, κυρίως αυτά που είχαν αναπτύξει σηψαιμία, είχαν πολύ χαμηλό αριθμό λεμφοκυττάρων. Αύξηση απόλυτου αριθμού ουδετερόφιλων προς λεμφοκύτταρα προκαλεί αύξηση της σοβαρότητας των συμπτωμάτων. Άρα, άτομα που νοσούν με Covid-19 έχουν υψηλό αριθμό ουδετερόφιλων.

Στη συνέχεια, χρησιμοποίησαν εξωγενή DNase-1 για την καταστολή της NETosis των ουδετερόφιλων με σκοπό να αντισταθμιστεί η απώλεια DNase-1 στους ασθενείς. Για να βρουν την δράση της DNase-1 στην αποικοδόμηση του DNA, επεξεργάστηκαν το πλάσμα των ασθενών με Covid-19 με σηψαιμία με ελεύθερη DNase-1 και με long-acting-DNase-1. Παρατήρησαν, ότι χρήση long-acting DNase-1 είχε σαν αποτέλεσμα μείωση cfDNA, NET, MPO, NE και επομένως αύξηση δραστηριότητας DNase-1.

Εφόσον όλα δοκιμάστηκαν μέχρι στιγμής *in vitro*, στόχευσαν στην αξιολόγηση της θεραπείας *in vivo* σε ποντίκια με σηψαιμία. Με χρήση της διαδικασίας CLP (απολίνωση και διάτρηση) παρατήρησαν ότι η long-acting-DNase-1 οδήγησε σε ποσοστό επιβίωσης 50% στα ποντίκια που έλαβαν αγωγή για 96 ώρες. Τα ποντίκια ανέκαμψαν πλήρως. Στη συνέχεια, μελέτησαν σε αρσενικά ποντίκια την συγκέντρωση ουδετερόφιλων στο περιτοναϊκό υγρό. Χορήγησαν δεξαμεθαζόνη και long-acting DNase-1 για την αξιολόγηση της συνδυαστικής θεραπευτικής δράσης, και παρατήρησαν ότι μετά από αγωγή μέσω CLP για 132 ώρες, το 60% των ποντικών επιβίωσε.

Στο συγκεκριμένο άρθρο υπάρχει ορθός πειραματικός σχεδιασμός. Είναι μια πολύπλευρη και εκτενής μελέτη. Επίσης, πλεονέκτημα της αποτελεσματικότητας των συμπερασμάτων τους είναι ότι έγιναν πειράματα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Όμως, στο συγκεκριμένο άρθρο δεν αναλύεται πως μειώνεται ο καταρράκτης κυτοκίνης και υπάρχει λειπή αναφορά σε τυχόν παρενέργειες μεθόδου.

Σε μια σχετική μελέτη των Alain et al., 2020 υποστηρίζεται ότι σε οξείες φλεγμονώδεις ασθένειες των πνευμόνων όπως το ARDS (ή αλλιώς οξύ αναπνευστικό σύνδρομο), τα

ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προκαλούν το σχηματισμό NETs, τα οποία συσσωρεύονται στο κυψελιδικό επίπεδο και συμμετέχουν σε επιθηλιακές και ενδοθηλιακές βλάβες προκαλώντας σοβαρή σηψαιμία. Παρατεταμένη παρουσία NETs φαίνεται εξαιρετικά επιβλαβής για τον ιστό του ξενιστή και μπορεί να διεγείρει αυτοάνοσες αποκρίσεις λόγω της υψηλής ανοσογονικότητάς του. Η NE έχει βρεθεί υπεύθυνη για αύξηση της σοβαρότητας της λοίμωξης που προκαλείται από SARS-CoV2, μέσω πολλαπλών μηχανισμών.

Το κλινικό αποτέλεσμα των ασθενών μπορεί να βελτιωθεί παρεμποδίζοντας (ή τουλάχιστον μειώνοντας) την είσοδο του SARS-CoV-2 σε αναπνευστικά κύτταρα. Εναλλακτικές τεχνικές όπως η χρήση αζιθρομυκίνης σε συνδυασμό με υδροξυχλωροκίνη (HCQ) για τη θεραπεία του COVID-19 έδειξε σημαντική μείωση της NE. Η αναστολή αυτής της πρωτεάσης σερίνης φαίνεται να είναι μια καλή θεραπευτική επιλογή. Θεραπεία με ασπιρίνη μειώνει τον σχηματισμό NETs στη μικροκυκλοφορία του πνεύμονα και στο πλάσμα, και μειώνει την εναπόθεση αιμοπεταλίων με ουδετερόφιλα στα αγγειακά τοιχώματα των πνευμόνων. Φάρμακα κατά της ελαστάσης όπως το Sivelestat ή αντιδιαβητικά φάρμακα όπως η μετφορμίνη θα μπορούσαν επίσης να αξιολογηθούν ως μέρος μιας ταχείας στρατηγικής επαναφοράς φαρμάκων για τη θεραπεία του COVID-19.

Όσον αφορά τις αντιπαραθέσεις στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με το συγκεκριμένο θέμα, το ότι η DNase-1 αποσυναρμολογεί τη δομή NET χωρίς να υποβαθμίζει ολόκληρα τα πρωτεϊνικά συστατικά τους, δείχνει ότι θα ήταν λιγότερο αποτελεσματικό στην κατάργηση μιας φλεγμονώδους απόκρισης που προκαλείται από NET. Ένα πιθανό μειονέκτημα κατά τη χρήση της DNase1 θα μπορούσε να είναι η επακόλουθη απελευθέρωση κυστιδίων πρωτεασών όπως NE, που πιθανώς προκαλεί κυτταροτοξικότητα. Κατά συνέπεια, η αγγειακή εξέταση φαίνεται να είναι απαραίτητη σε περιπτώσεις οξείας επιδείνωσης του σχηματισμού NET.

Σε μια σχετική μελέτη των Jin Wang et al. μια καταγίδα κυτοκίνης είναι σχεδόν πάντα παθογόνος λόγω των επιβλαβών συνεπειών της στον ξενιστή. Από την άλλη πλευρά, οι τοπικές και συστηματικές αποκρίσεις κυτοκίνης σε λοίμωξη είναι βασικά μέρη της αρχικής απόκρισης του ξενιστή στη μόλυνση. Απελευθέρωση κυτοκινών από NK-κύτταρα και μακροφάγα, μαζί με ενεργοποιημένα T-κύτταρα και χυμικές αποκρίσεις μπορούν να βοηθήσουν στην επίλυση της λοίμωξης. Εκτός από τη συμβολή σε μια καταγίδα κυτοκίνης, η αυξημένη NETosis πιθανότατα επηρεάζει και την εμφάνιση φλεβικής και αρτηριακής θρόμβωσης σε ασθενείς με COVID-19. Ως εναλλακτική τεχνική συνίσταται η μετάγγιση πλάσματος (CP) ως θεραπεία για την ανάρρωση ασθενών που πάσχουν από Covid-19. Αποδείχθηκε ότι η θεραπεία αυτή θα μπορούσε να μειώσει τα επίπεδα των κυτοκινών σε ασθενείς με σοβαρή γρίπη. Επίσης, μεταμόσχευση μεσεγγυματικών βλαστικών κυττάρων MSCs (ενήλικα βλαστικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα να αυτοαναπαράγονται και τα οποία δείχνουν πιθανότητα διαφοροποίησης σε πολλαπλούς τύπους κυττάρων) μπορούν να επηρεάσουν τις αντιφλεγμονώδεις δραστηριότητες παράγοντας ανοσοκατασταλτικές κυτοκίνες και με άμεση αλληλεπίδραση και αναστολή της ενεργοποίησης των ανοσοκυττάρων. Το συγκεκριμένο άρθρο βρίσκεται σε πλήρη ομοφωνία με την επιστημονική κοινότητα.

Συμπερασματικά, κατέληξαν ότι τα ήδη υπάρχοντα αντικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στις κλινικές δοκιμές για την αντιμετώπιση του SARS-CoV-2 είναι

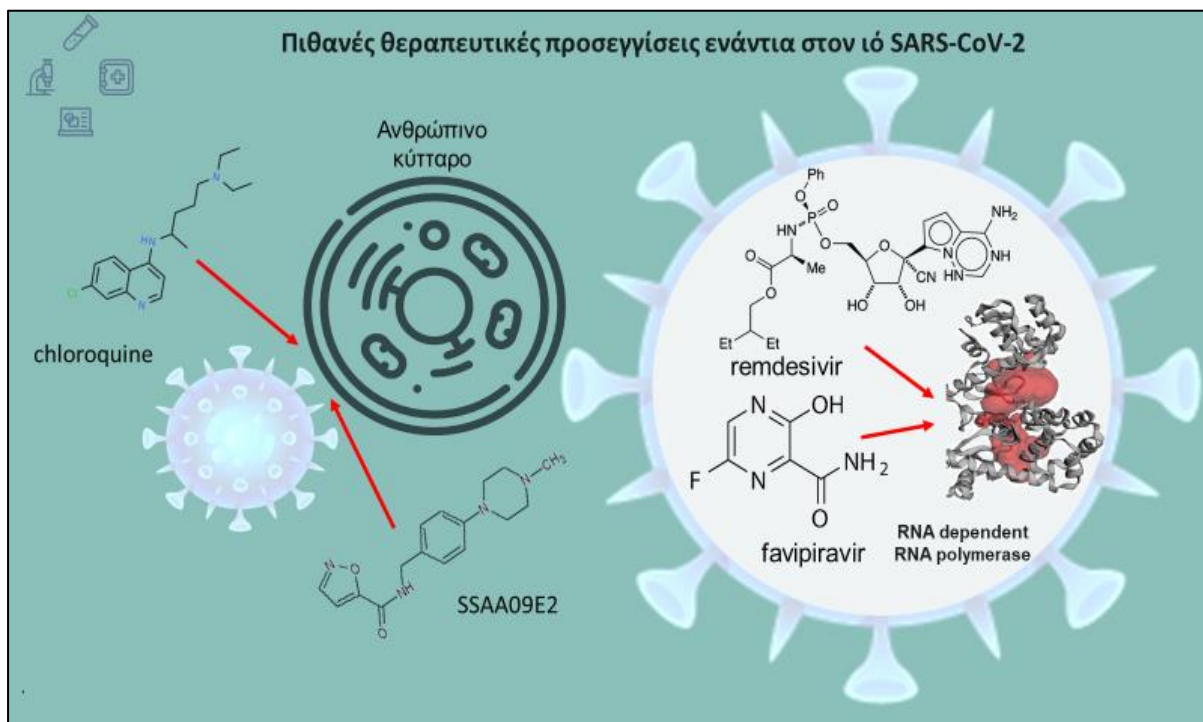
αποτελεσματικά σε ήπια νόσο, όχι σε κρίσιμη κατάσταση ή σηψαιμία. Μέσα από αυτά τα πειράματα είδαν ότι ενδοφλέβια χορήγηση long-acting DNase-1 αναστέλλει αποτελεσματικά τους παράγοντες NETosis, μειώνει τον «καταρράκτη κυτοκίνης» και βελτιώνει την επιβίωση σε ένα μοντέλο σηψαιμίας. Έτσι το long-acting- DNase-1 μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία για την αντιμετώπιση κρίσιμων ασθενειών Covid-19 μέσω καταστολής ουδετερόφιλων.

### **Βιβλιογραφία**

1. Yun Young Lee et al. «Long-acting nanoparticulate DNase-1 for effective suppression of SARS-CoV-2-mediated neutrophil activities and cytokine storm», in *Biomaterials* (journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials)), (2021)
2. Alain R. Thierry and Benoit Roch, «Neutrophil Extracellular Traps and By-Products Play a Key Role in COVID-19: Pathogenesis, Risk Factors, and Therapy», in *Journal of Clinical Medicine*, (2020)
3. Jin Wang, Mengmeng Jiang, Xin Chen, Luis J. Montaner, «Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts», in *Journal of Leukocyte Biology*, (2020)
4. Chuyi Tan et al. «The vitals of NETs», in *Journal of Leukocyte Biology*, (2020)

*Remdesivir & Favipiravir: Πιθανοί σύμμαχοί μας ενάντια στον SARS-CoV-2?*

Από την Νέστορα Αλεξάνδρα  
(ΑΜ:2020)



**Εικόνα 1:** Πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις εναντίον του SARS-CoV-2: chloroquine, SSA09E2, remdesivir και favipiravir. Οι ουσίες chloroquine και SSA09E2 αποτελούν αναστολείς εισόδου, ενώ οι remdesivir και favipiravir στοχεύουν την καταλυτική θήκη του ιικού ενζύμου RNA dependent RNA polymerase και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό του ιού. Οι ουσίες remdesivir και favipiravir αποτελούν την αποτελεσματικότερη θεραπευτική προσέγγιση εναντίον του SARS-CoV-2.

Λένε πως για να κερδίσεις έναν εχθρό πρέπει να τον πολεμήσεις με τα ίδια του τα όπλα! Τι γίνεται, όμως αν ο εχθρός αυτός είναι ένας ιός που προσβάλλει ανθρώπινα κύτταρα; Οι ιοί είναι παρασιτικά συστήματα τα οποία χρησιμοποιούν τον ξενιστή τους για να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν, ενώ διαθέτουν πολύ μικρό και συμπυκνωμένο γονιδίωμα που κωδικοποιεί τα απολύτως απαραίτητα στοιχεία για την επιβίωσή του. Ως εκ τούτου υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για την καταπολέμηση των ιών. Η μία στοχεύει τα ανθρώπινα κύτταρα και αφορά την αποτροπή της εισόδου του ιού στο κύτταρο ή τη διακοπή των σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στη μόλυνση. Αντίθετα, η δεύτερη αφορά την καταπολέμηση του ίδιου του ιού μέσω αποτροπής είτε της αντιγραφής του είτε της συναρμολόγησης του ιικού σωματίου, στοχεύοντας σημαντικές για τις λειτουργίες αυτές πρωτεΐνες. Το άρθρο “Viroinformatics approach to explore the inhibitory mechanism of existing drugs repurposed to fight against COVID-19” μελετά, με τη χρήση μεθόδων Βιοπληροφορικής, ουσίες που ανήκουν και στις δύο κατηγορίες. Από τις ουσίες που προτείνονται από τους συγγραφείς και που φαίνεται από περαιτέρω

**μελέτες να έχουν περισσότερο ελπιδοφόρα αποτελέσματα είναι εκείνες που στοχεύουν τον ίδιο το ιό και συγκεκριμένα μία πρωτεΐνη που εκφράζεται και χρησιμοποιείται αποκλειστικά από εκείνον, την εξαρτώμενη από RNA, RNA-polymerase.**

Σκοπός του άρθρου είναι η μελέτη του μηχανισμού δράσης των ουσιών chloroquine, SSAA09E2, favipiravir και remdesivir όταν χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση του κορονοϊού SARS-CoV-2, με τη χρήση της Βιοπληροφορικής. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές προσομοίωση μοριακής δυναμικής (molecular dynamic simulation) και μοριακή πρόσδεση (molecular docking) για να μελετηθεί ο τρόπος δράσης των εν λόγω ουσιών σε σχέση με τα ιικά μόρια, όπως είναι η πρωτεΐνη ακίδα (Spike protein), η εξαρτώμενη από RNA, RNA-polymerase (RdRp) και το κυτταρικό μόριο, ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2).

Οι ουσίες που επιλέχθηκαν για μελέτη ανήκουν στην ίδια ευρύτερη κατηγορία και ονομάζονται αντιικά φάρμακα ευρέος φάσματος (Broad-spectrum antiviral agents, BSAs). Πρόκειται για ουσίες που δεν δημιουργήθηκαν *a priori* για την καταπολέμηση του κορονοϊού, αλλά υπήρχαν για την καταπολέμηση άλλων. Ουσιαστικά η στρατηγική που ακολουθήθηκε ονομάζεται «drug repurposing» ή «drug repositioning» ή στα ελληνικά ανακύκλωση ή επαναχρησιμοποίηση φαρμάκων και αφορά την αναγνώριση καινούριων χρήσεων, για ήδη εγκεκριμένες ή πειραματικές φαρμακευτικές ουσίες, διαφορετικές από αυτές που είχαν αρχικά δημιουργηθεί (1).

Ως πιθανές θεραπευτικές μεθόδους οι συγγραφείς πρότειναν το συνδυασμό των ουσιών chloroquine και SSAA09E2 ως διπλούς αναστολείς της εισόδου του ιού στο κύτταρο, καθώς μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης ακίδας του ιού με τον ανθρώπινο υποδοχέα ACE2. Ο WHO, βέβαια, πρότεινε ισχυρά να μη χρησιμοποιείται η chloroquine ή το παραγώγό της, hydroxy-chloroquine σε κανέναν ασθενή ως θεραπεία για τον κορονοϊό και να μην αποτελεί προτεραιότητα στην έρευνα (8). Όταν δημοσιεύτηκε το άρθρο υπήρχαν αμφίσημες πληροφορίες και οι ίδιοι οι συγγραφείς προτείνουν να γίνει περαιτέρω έρευνα για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα ή μη της ουσίας.

Όσον αφορά την ουσία SSAA09E2 είναι ένας ιικός αναστολέας που χρησιμοποιήθηκε εναντίον του ιού MERS (2). Δεν έχουν γίνει πολλές έρευνες για τη δράση του εναντίον του SARS-CoV-2 και προς το παρόν δεν αποτελεί από μόνη της τουλάχιστον πιθανή θεραπευτική προσέγγιση (8).

Από τις ουσίες που μελετήθηκαν, οι περισσότερο πιθανές να έχουν θεραπευτική δράση είναι οι δύο που στοχεύουν το ίδιο τον ιό, συγκεκριμένα ένα συστατικό ιϊκής προέλευσης και όχι τα ανθρώπινα κύτταρα! Η προσέγγιση αυτή είναι ριζοσπαστική καθώς μπορεί να καταπολεμηθεί ο ιός χωρίς να προκληθεί βλάβη στα κύτταρα του ξενιστή και αποτελεί ζητούμενο αλλά και πρόκληση στην ανακάλυψη αποτελεσματικών φαρμάκων εναντίον των ιών (9). Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι ουσίες remdesivir και favipiravir στοχεύουν το ένζυμο RdRp που συμμετέχει στην αντιγραφή του ιού.

Η ουσία remdesivir αποτελεί νουκλεοτιδικό ανάλογο και εισέρχεται στο κύτταρο σα πρόδρομη ένωση η οποία μεταβολίζεται και έπειτα μετατρέπεται στη φαρμακευτική ουσία. Η RdRp διαθέτει μία καταλυτική «θήκη» (pocket), η οποία συμμετέχει στην καταλυτική δράση

του ενζύμου. Η ουσία remdesivir εισέρχεται στη θήκη αντί για την τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) και αλληλεπιδρά με διάφορα κατάλοιπα σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου, ομοιοπολικούς και άλλου είδους δεσμούς που τη σταθεροποιούν. Επίσης πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως μάλλον αλληλεπιδρά και με το επόμενο της νουκλεοτίδιο σχηματίζοντας δεσμό και προκαλούν στερικό αποκλεισμό. Με αυτόν τον τρόπο η διαδικασία της αντιγραφής οδηγείται στον τερματισμό, 3 νουκλεοτίδια μετά την είσοδο της ρεμντεσιβίρης (10).

Την περίοδο που γράφτηκε το άρθρο η remdesivir αποτελούσε πολλά υποσχόμενη ουσία με *in vivo* και *in vitro* ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Δεν είχαν όμως λάβει χώρα κλινικές δοκιμές (4). Σήμερα, μετά από αρκετές κλινικές δοκιμές και μελέτες τα αποτελέσματα είναι αμφίσημα. Ενδεικτικά, ο οργανισμός FDA ενέκρινε τη χρήση της, ενώ ο WHO πρότεινε να μη χρησιμοποιείται, διότι δεν έχει θεραπευτική δράση (4,5)! Τέλος, πρόσφατα άρχισε να μελετάται η ρεμντεσιβίρη σε συνδυασμό με άλλες ουσίες όπως αντισώματα ή άλλα φάρμακα όπως αναστολείς που προτείνει το άρθρο ως νέα θεραπευτική προσέγγιση. Για την προσέγγιση αυτή γίνονται κλινικές μελέτες σε ζώα και μπορεί να δώσει νέες θεραπευτικές προοπτικές (6). Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα χρήσης της εναντίον του κορονοϊού.

Η ουσία favirivir είναι επίσης νουκλεοτιδικό ανάλογο και όπως η remdesivir στοχεύει το ίδιο τον ιό και συγκεκριμένα ακριβώς το ίδιο ένζυμο, RdRp. Αρχικά εισάγεται στο κύτταρο σε μία πρόδρομη ένωση και έπειτα μετατρέπεται σε favirivir, η οποία εισέρχεται στην θήκη της RdRp, όπου δημιουργούνται δεσμοί υδρογόνου, ομοιοπολικοί και π δεσμοί που σταθεροποιούν ισχυρά την ουσία στη θήκη και διευκολύνουν τη δράση της. Συγκεκριμένα ενθέτει μεταλλάξεις στο RNA του ιού οδηγώντας σε μεταλλαξιγένεση. Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται αναστολή βασικών μεταβολικών λειτουργιών του ιού (7).

Περαιτέρω μελέτες έχουν παρουσιάσει μικτά αποτελέσματα σχετικά με την καταπολέμηση του Covid-19. Χρησιμοποιείται βέβαια από κάποιες χώρες όπως η Ιαπωνία, η Ρωσία, η Κένυα κ.α., αλλά υπάρχουν ανησυχίες για την ασφάλεια της ουσίας καθώς επίσης και για το γεγονός ότι ίσως αποτελεί μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Επιπλέον μελέτες πρέπει να γίνουν για να αποσαφηνιστεί πλήρως η δράση της ουσίας (7).

Οι συγγραφείς κατά τη διάρκεια της έρευνάς τους αντιμετώπισαν αρκετούς περιορισμούς. Αρχικά υπήρχε πίεση χρόνου λόγω της κλιμάκωσης της πανδημίας για την γρήγορη εύρεση θεραπείας, οπότε δεν είχαν τη δυνατότητα να κάνουν λεπτομερείς αναλύσεις και να μελετήσουν σε βάθος τους μηχανισμούς δράσης των ουσιών. Επιπλέον δεν είχαν στη διάθεσή τους την τρισδιάστατη δομή του ενζύμου RdRp, βασικού στοιχείου της έρευνας, οπότε κατασκεύασαν ένα πιθανό μοντέλο με τη χρήση των μεθόδων της Βιοπληροφορικής.

Περαιτέρω μελέτες πρέπει να γίνουν τόσο για τις συγκεκριμένες ουσίες όσο και για άλλες πιθανές για την καταπολέμηση του ιού και τον έλεγχο της πανδημίας.

## **Βιβλιογραφία**

1. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Aug;3(8):673-83
2. Adeyemi O Adedeji I and Stefan G Sarafianos, Antiviral drugs specific for coronaviruses in preclinical development, *Curr Opin Virol* 2014;8:45–53

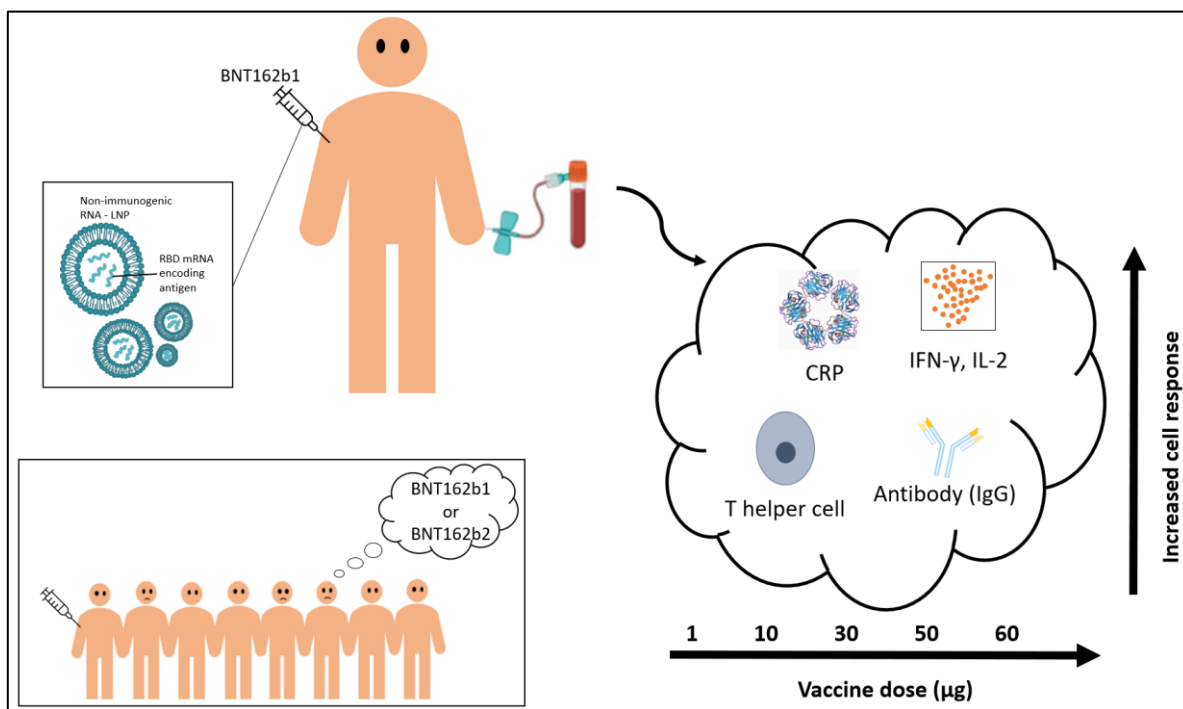
3. Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, Wang Q, Xu Y, Li M, Li X, Zheng M, Chen L, Li H. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm Sin B*. 2020 May;10(5):766-788.
4. Richard T. Eastman,† Jacob S. Roth,†‡ Kyle R. Brimacombe,† Anton Simeonov,† Min Shen,† Samarjit Patnaik,† and Matthew D. Hall, Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19, *Acs Central Science*. 2020;6:672–683
5. Christoph D. Spinner, MD1; Robert L. Gottlieb, MD, PhD2; Gerard J. Criner, MD3; José Ramón Arribas López, MD4; Anna Maria Cattelan, MD5; Alex Soriano Viladomiu, MD6; Onyema Ogbuagu, MD7; Prashant Malhotra, MD8; Kathleen M. Mullane, DO9; Antonella Castagna, MD10; Louis Yi Ann Chai, MD11; Meta Roestenberg, MD12; Owen Tak Yin Tsang, MD13; Enos Bernasconi, MD14; Paul Le Turnier, MD15; Shan-Chwen Chang, MD16; Devi SenGupta, MD17; Robert H. Hyland, DPhil17; Anu O. Osinusi, MD17; Huyen Cao, MD17; Christiana Blair, MS17; Hongyuan Wang, PhD17; Anuj Gaggar, MD, PhD17; Diana M. Brainard, MD17; Mark J. McPhail, MD18; Sanjay Bhagani, MD19; Mi Young Ahn, MD20; Arun J. Sanyal, MD21; Gregory Huhn, MD22; Francisco M. Marty, MD23; for the GS-US-540-5774 Investigators, Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients With Moderate COVID-19 A Randomized Clinical Trial, *JAMA* 2020 Sep 15;324(11):1048-1057
6. Martinez DR, et al. Early therapy with remdesivir and antibody combinations improves COVID-19 disease in mice. *bioRxiv [Preprint]*. 2021 Jan 28:2021.01.27.428478
7. Shashank Joshi,a Jalil Parkar,b Abdul Ansari,c Agam Vora,d Deepak Talwar,e Mangesh Tiwaskar,f Saiprasad Patil,g,\* and Hanmant Barkate, Role of favipiravir in the treatment of COVID-19, *Int J Infect Dis*. 2021 Jan;102:501-508
8. Coronavirus Drug and Treatment Tracker, K. J. Wu, *New York Times* May 5, 2021
9. Priya S. Shah & David V. Schaffer, Antiviral Therapy Targeting Viral Polymerase, *Current Pharmaceutical Design*, Volume 12, Issue 11, 2006
10. Saha A, Sharma AR, Bhattacharya M, Sharma G, Lee SS, Chakraborty C. Probable Molecular Mechanism of Remdesivir for the Treatment of COVID-19: Need to Know More, *Archives of Medical Research*, Volume 51, Issue 6, August 2020, Pages 585-586.



**Ενότητα 3: Οι κατηγορίες, οι μηχανισμοί δράσης και η αποτελεσματικότητα των παραδοσιακών και σύγχρονων εμβολίων εναντίον του ιού SARS-CoV-2**

*Εμβόλιο BNT162b1: “more is not always better”*

Από την Αλιβάνιστου Μαρία  
(ΑΜ:1952)



**Εικόνα 1:** Ανοσολογικές αποκρίσεις έναντι του εμβολίου BNT162b1. Εισαγωγή του mRNA εμβολίου BNT162b1 στα κύτταρα και απεικόνιση των ανοσολογικών πληθυσμών [CRP, IFN-γ, IL-2, T helper cell, Antibody (IgG)] που ανιχνεύονται στο αίμα των συμμετεχόντων μετά τη δράση του. Σημαντική είναι η αύξηση αυτών των πληθυσμών με την αύξηση της δόσης του εμβολίου. Επιπλέον, στο μικρό πλαίσιο, απεικονίζεται και η δυσάρεσκη που μπορεί να έχουν κάποιοι συμμετέχοντες μετά τον εμβολιασμό εξαιτίας των πιο ισχυρών συμπτωμάτων του συγκεκριμένου εμβολίου σε σχέση με άλλα.

Στον αγώνα κατά του SARS-CoV-2 έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ανάπτυξης τόσο θεραπευτικών όσο και προληπτικών μεθόδων όπως είναι τα εμβόλια. Σε αυτό τον αγώνα συμμετείχε και η ερευνητική ομάδα των Sahin et al. με τη μελέτη τους για το εμβόλιο BNT162b1. Το BNT162b1 πρόκειται για ένα εμβόλιο που αξιοποιεί την τεχνολογία του λιπιδικού νανοσωματιδιακού (lipid nanoparticle - LNP) τροποποιημένου mRNA και συγκεκριμένα περιέχει νουκλεοζίτη που κωδικοποιεί την περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (RBD) της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2. Στόχος της έρευνας των Sahin et al. ήταν η μελέτη της παραγωγής αντισωμάτων και του πολλαπλασιασμού των T κυτταρικών πληθυσμών που προκλήθηκαν μετά από χορήγηση αυτού του εμβολίου. Επιπλέον, σε αυτή τη μελέτη έγινε σύγκριση των ανοσολογικών αποκρίσεων των ατόμων που εμβολιάστηκαν με το BNT162b1 με άτομα που νόσησαν και θεραπεύτηκαν από τον SARS-CoV-2.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται ότι επιτεύχθηκε ο αρχικός στόχος. Για να γίνει αυτό εμβολιάστηκαν συνολικά 60 συμμετέχοντες με το BNT162b1. Δώδεκα συμμετέχοντες για κάθε μία από τις ομάδες διαφορετικών επιπέδων δόσης (1 μg, 10 μg, 30 μg και 50 μg) έλαβαν την πρώτη δόση την ημέρα 1 και μια αναμνηστική δόση την ημέρα 22, και 12 συμμετέχοντες έλαβαν μόνο μία πρωταρχική δόση των 60 μg την ημέρα 1. Το δείγμα της μελέτης αποτελούνταν από υγιή αρσενικά άτομα και μη έγκυες γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 37 ετών (εύρος 20-56 ετών) με ίση κατανομή φύλου. Η μελέτη ήταν εστιασμένη στην ανοσογονικότητα του εμβολίου η οποία όπως αποδείχθηκε ήταν ανάλογη της δόσης που χορηγήθηκε και ήταν πιο έντονη μετά τη χορήγηση της δεύτερης αναμνηστικής δόσης. Τα αποτελέσματα εξήχθησαν με χρήση κυτταρομετρίας ροής και αυτό που παρατηρήθηκε ήταν ότι κατά μέσο όρο στους συμμετέχοντες ο αριθμός των αντισωμάτων που συνδέονται με την περιοχή δέσμευσης της πρωτεΐνης ακίδας (RBD) κυμαίνονταν από 3.920-18.289 U/ml-1 σε άτομα εμβολιασμένα με BNT162b1, σε σύγκριση με αντισώματα (602 U/ml-1) που μετρήθηκαν σε ασθενείς που είχαν μολυνθεί με SARS-CoV-2. Επιπλέον, το εμβόλιο προκάλεσε λειτουργικές και προφλεγμονώδεις αποκρίσεις CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T κυττάρων σε όλους σχεδόν τους συμμετέχοντες.

Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν δεν είναι γνωστό πόσο ισχυρά είναι καθώς ενέχονται κάποιοι περιορισμοί στον τρόπο διεξαγωγής των πειραματικών διαδικασιών. Αρχικά, το μικρό μέγεθος του δείγματος και ο περιορισμός των συμμετεχόντων σε ηλικίες κάτω των 55 ετών δεν αποτελούν επαρκή δείκτη για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Επιπλέον, δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ανάλυση των T κυττάρων πριν και μετά τον εμβολιασμό, λόγω των περιορισμένων όγκων αίματος που ήταν διαθέσιμοι για αναλύσεις βιοδεικτών, ενώ δεν αξιολογήθηκε και η πιθανή επαγωγή CD8<sup>+</sup> T κυττάρων μνήμης που προϋπήρχαν στους ιστούς. Τέλος, είναι γνωστό ότι η ανοσία που προκαλείται από το εμβόλιο μπορεί να μειωθεί με την πάροδο του χρόνου, γι' αυτό είναι σημαντικό να μελετηθούν οι προστατευτικές ανοσολογικές αποκρίσεις στο μέλλον. Η απουσία αυτών των δεδομένων τη χρονική στιγμή που γράφτηκε το άρθρο καθιστά τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας ανεπαρκή, ωστόσο είναι αξιοσημείωτο ότι τα παραπάνω προβλήματα είναι αδυναμίες που οι ίδιοι οι συγγραφείς αναγνωρίζουν ότι υπάρχουν στην έρευνά τους και ήδη σχεδίαζαν την αντιμετώπισή τους.

Μία μελέτη που έγινε λίγο πριν από αυτή των Sahin et al. είναι για το BNT162b1 στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του για να βρεθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά του (Mulligan et al.). Και στις δύο έρευνες το εύρος του δείγματος ήταν ίδιο (18-55 ετών) ενώ το δείγμα και σε αυτή τη μελέτη δεν ήταν τυχαίο και συμμετείχαν 45 άτομα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν παρόμοια με πιο βασικό ότι σε μεγαλύτερες δόσεις (>60 μg) το εμβόλιο ήταν πολύ ισχυρό και δε χρειαζόταν να χορηγηθεί δεύτερη δόση αυτού. Το εμβόλιο ήταν επίσης ικανό να επάγει συγκεκριμένους τύπους αντισωμάτων και T κυτταρικών πληθυσμών που όμως δεν ήταν γνωστό κατά πόσο ήταν προστατευτικά και ικανά να λειτουργήσουν έναντι του SARS-CoV-2.

Ένα από τα εμβόλια που μελετήθηκαν μαζί με το BNT162b1 ήταν το BNT162b2 που πλέον αποτελεί το ευρείας κατανάλωσης εμβόλιο κατά του SARS-CoV-2 που διατίθεται από τις BioNTech-Pfizer. Το BNT162b2 είναι κι αυτό ένα mRNA εμβόλιο που χρησιμοποιεί την

τεχνολογία LNP με τη διαφορά ότι δε χρησιμοποιείται μόνο η περιοχή δέσμευσης του υποδοχέα (RBD) της πρωτεΐνης ακίδας του SARS-CoV-2 αλλά ολόκληρο το γονίδιο αυτής (Polack et al.). Το εύρος του δείγματος περιλάμβανε άτομα ηλικίας 16 ετών και άνω ενώ το δείγμα ήταν τυχαίο και συμμετείχαν 43,548 άτομα. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνεται να υπάρχουν αρκετές ομοιότητες με το BNT162b1 όσον αφορά την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητά τους, ωστόσο το BNT162b2 φαίνεται να είναι αποτελεσματικό και σε ηλικίες άνω των 55 ετών, σε άτομα με άλλες ασθένειες (π.χ. HIV) ακόμα και σε άτομα που κατά τη διάρκεια των δοκιμών κόλλησαν τον ιό. Τέλος, ειπώθηκε με σιγουριά ότι το BNT162b2 είναι 95% δραστικό κατά της νόσου Covid-19, ενώ υπάρχει πιθανότητα 99% να βρεθούν τα ίδια αποτελέσματα και κατά τον μαζικό εμβολιασμό, νούμερα που δεν έχουν βρεθεί ακόμα για το BNT162b1. Παρόλο που και για το BNT162b2 υπάρχουν κάποιες ελλείψεις στις μελέτες, όπως αποδείχθηκε σήμερα είναι αυτό που επικράτησε και διατέθηκε στο κοινό.

Σε άλλη μελέτη παρουσιάζεται η σύγκριση μεταξύ των δύο εμβολίων BNT162b1 και BNT162b2 κατά τη φάση 1 των δοκιμών τους (Walsh et al.). Για το BNT162b1 οι μελέτες έγιναν σε άτομα ηλικίας 18-55 ετών και για το BNT162b2 οι μελέτες έγιναν σε άτομα ηλικίας 65-85 ενώ συνολικά συμμετείχαν 195 άτομα. Σε αυτή τη σύγκριση επικράτησε το BNT162b2 και ο κύριος λόγος ήταν οι πιο ήπιες αντιδράσεις που είχαν οι συμμετέχοντες σε αυτό, ιδιαίτερα τα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, στο πλαίσιο των παρόμοιων αποκρίσεων αντισωμάτων που προκλήθηκαν και από τα δύο υποψήφια εμβόλια. Αξίζει βέβαια να σημειωθεί ότι και σε αυτό το άρθρο ήταν εμφανής και η ασφάλεια αλλά και η αποτελεσματικότητα και των δύο εμβολίων.

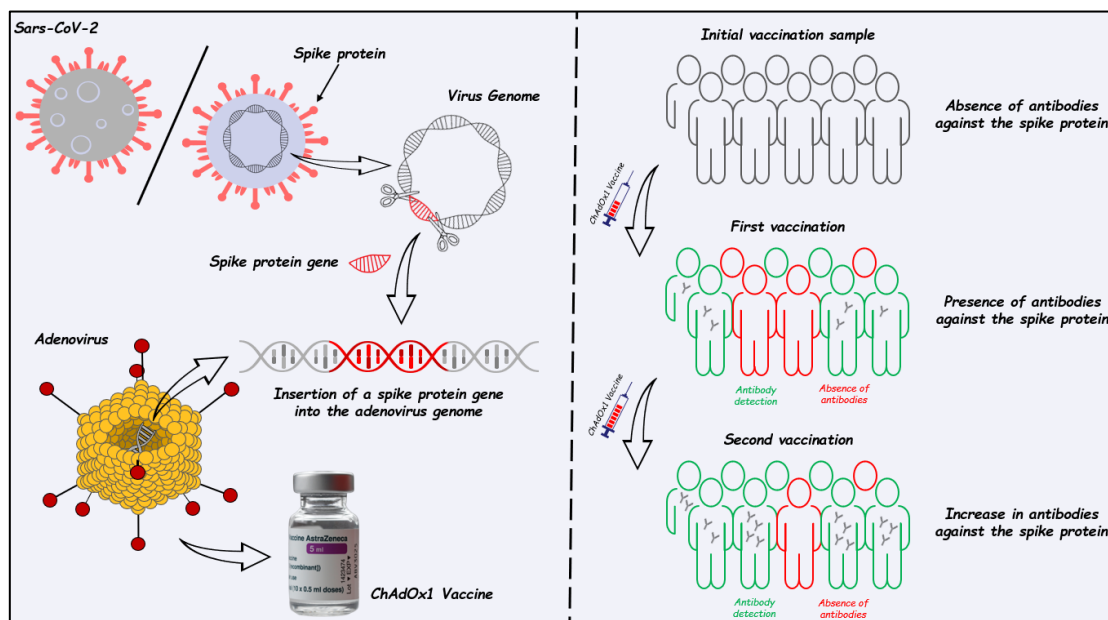
Συνεπώς, ενώ υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν τα αποτελέσματα των Sahin et al. όσον αφορά την ικανότητα του BNT162b1 εμβολίου να επάγει χυμική και κυτταρική ανοσία και έτσι να είναι αρκετά αποτελεσματικό φαίνεται να υπάρχει αντιπαράθεση στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με το συγκεκριμένο θέμα. Αυτό συμβαίνει γιατί ταυτόχρονα υπήρχαν κι άλλα υποψήφια εμβόλια που δοκιμάζονταν και μάλιστα υπερίσχυσε ένα από τα άλλα παραγκωνίζοντας αυτόματα τις μελέτες για το BNT162b1. Παρόλο που το BNT162b1 δεν αποτελεί ενεργό όπλο κατά του SARS-CoV-2 οι μελέτες που έγιναν για αυτό ήταν ενθαρρυντικές και αποτελεί ένα σύμμαχο που μπορεί να αποβεί χρήσιμος στο μέλλον.

## **Βιβλιογραφία**

1. Sahin U. et al. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH 1 T cell responses. *Nature*. 586(7830), 594-599 (2020).
2. Mulligan M. J. et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature*. 586(7830), 589-593 (2020).
3. Polack F. P. et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 vaccine. *New England Journal of Medicine*. 383(27), 2603-2615 (2020).
4. Walsh E. E. et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 vaccine candidates. *New England Journal of Medicine*. 383(25), 2439-2450 (2020).

## Εμβόλιο ChAdOx1 nCoV-19: η σημασία της δεύτερης δόσης του εμβολίου στην παρατεταμένη ανοσία έναντι του SARS-CoV-2

Από τον Αντωνιάδη Κυριάκο  
(ΑΜ:1954)



**Εικόνα 1:** Εμβόλιο ChAdOx1 nCoV-19. Στα αριστερά της εικόνας φαίνεται η διαδικασία κατασκευής του εμβολίου ξεκινώντας από τον ιό Sars-CoV-2. Συγκεκριμένα απομονώνεται το γονιδίωμα του ιού Sars-CoV-2 και το γονίδιο της πρωτεΐνης ακίδας (Spike Protein) του ιού ενσωματώνεται, με μεθόδους γενετικής μηχανικής, στο γονιδίωμα ενός αδενοϊού. Ο αδενοϊός αυτός εμπεριέχεται στο εμβόλιο. Στα δεξιά της εικόνας φαίνεται η διαδικασία των δύο εμβολιασμών. Ένας αρχικός πληθυσμός εμβολιάζεται με το εμβόλιο ChAdOx1 nCoV-19, 2 φορές, και φαίνεται η επίδραση του εμβολιασμού στην αύξηση των αντισωμάτων κατά της πρωτεΐνης ακίδας.

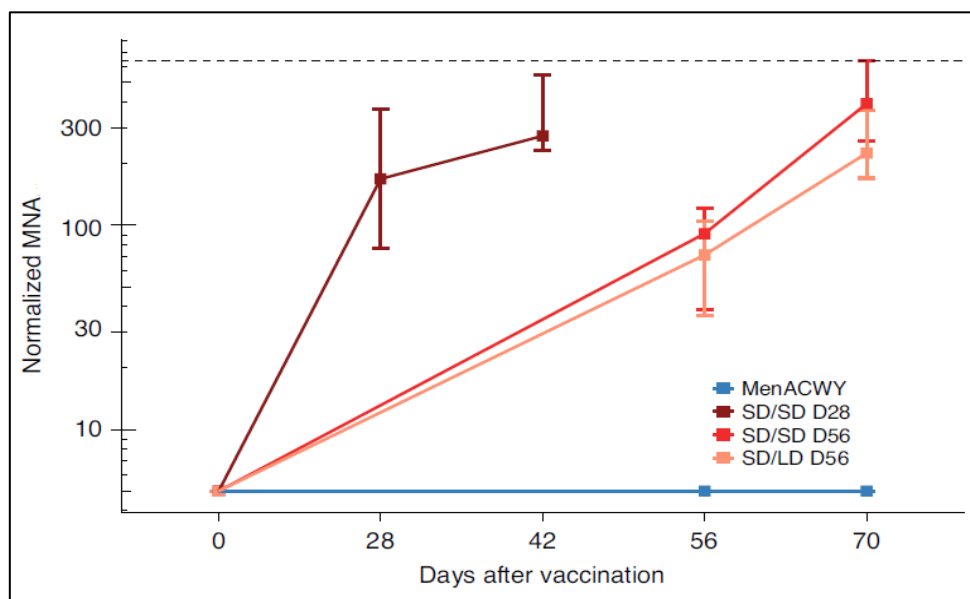
Το εμβόλιο ChAdOx1 nCoV-19 είναι ένα από τα επικρατέστερα εμβόλια που έχουν προταθεί για την αντιμετώπιση της πανδημίας που προκάλεσε ο ιός Sars-CoV-2. Πρόκειται για ένα εμβόλιο αδενοϊκού φορέα ο οποίος έχει τροποποιηθεί γενετικά, με την εισαγωγή του γονιδίου της πρωτεΐνης ακίδας στο γονιδίωμά του (Εικόνα 1). Επιπλέον, φαίνεται ότι είναι ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό εμβόλιο για την αντιμετώπιση του ιού Sars-CoV-2, αφού από τον πρώτο κύκλο εμβολιασμό εντοπίζονται αντισώματα κατά της πρωτεΐνης ακίδας του ιού στους ορούς των ατόμων που εμβολιάζονται. Όμως, παρατηρήθηκε ότι μία δεύτερη αναμνηστική δόση του εμβολίου, μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ποσότητα των αντισωμάτων αυτών, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα του εμβολίου και οδηγώντας σε μία παρατεταμένη ανοσία έναντι του ιού SARS-CoV-2.

Η αξιολόγηση της ποσότητας και της ποιότητας των χυμικών και κυτταρικών ανοσοαποκρίσεων που προκύπτουν μετά τον δεύτερο εμβολιασμό πραγματοποιήθηκε από τους Barrett J. R. *et al.*. Για να γίνει αυτό, έγιναν κλινικές μελέτες με 52 άτομα ηλικίας 18 έως

55 ετών τα οποία επιλέχθηκαν τυχαία και είχαν ήδη λάβει μια αρχική δόση του εμβολίου. Επιπλέον, για να μπορέσουν να εξαχθούν συμπεράσματα για την σημασία της ποσότητας της δεύτερης δόσης αλλά και για το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα στις 2 δόσεις, οι ερευνητές χώρισαν το δείγμα σε επιμέρους ομάδες. Έτσι, 20 άτομα έλαβαν μια ολόκληρη δεύτερη δόση του εμβολίου και 32 έλαβαν τη μισή δεύτερη δόση μετά από 56 μέρες. Επιπλέον 10 από τους 20 έλαβαν την δεύτερη δόση μετά από διάστημα 56 ημερών και 10 μετά από διάστημα 28 ημερών. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από 10 εθελοντές οι οποίοι έλαβαν μία δεύτερη δόση του εμβολίου μηνιγγιτιδόκοκκου ACWY.

Παρόλο που το μέγεθος του δείγματος ήταν μικρό, οι Barrett J. R. *et al.* κατάφεραν να καταλήξουν σε συμπεράσματα σχετικά με την σημασία της δεύτερης δόσης στην ανοσία. Για να γίνει αυτό, μετρήθηκαν με ανοσοδοκιμασία μικροσφαιρών (MIA), τα αντισωμάτων IgG κατά της ακίδας του SARS-CoV-2. Παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός τους αυξάνεται αισθητά μετά από μία δόση του εμβολίου και παραμένει στα ίδια επίπεδα και μετά την δεύτερη δόση. Επιπλέον, οι τίτλοι των αντισωμάτων IgM και IgA (υπολογίστηκαν με δοκιμασία ELISA) αυξήθηκαν περαιτέρω μετά από έναν δεύτερο εμβολιασμό. Η λειτουργικότητα των αντισωμάτων αυτών κατά του ιού προσδιορίστηκε με την ικανότητά τους να προκαλούν εξαρτώμενη από αντίσωμα φαγοκύτωση μονοκυττάρων (ADMP), εξαρτώμενη από αντίσωμα φαγοκυττάρωση ουδετερόφιλων (ADNP) και εξαρτώμενη από αντίσωμα εναπόθεση συμπληρώματος (ADCD). Οι δύο δείκτες αυξήθηκαν με τον εμβολιασμό και ήταν υψηλότεροι στις ομάδες των ατόμων που έκαναν και την δεύτερη δόση του εμβολίου. Η ικανότητα του εμβολίου να διεγείρει την εξαρτώμενη από αντισώματα ενεργοποίηση NK κυττάρων (ADNKA), διερευνήθηκε επίσης και αναφέρθηκε ως η ικανότητα ενεργοποίησης της έκφρασης CD107a. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η εφάπαξ δόση ChAdOx1 προκάλεσε χαμηλές αποκρίσεις ADNKA, οι οποίες όμως ενισχύθηκαν από τη δεύτερη δόση. Τα ευρήματα αυτά επιβεβαιώνονται και από την συμπληρωματική μελέτη των Voysey M. *et al.*. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι το ChAdOx1 nCoV-19 προκαλεί ευρεία απόκριση T κυττάρων (δοκιμασία ELISpot) και για τις δύο υπομονάδες αντιγόνου S γεγονός που ενισχύεται με μία δεύτερη αναμνηστική δόση (Barrett J. R. *et al.*, Ewer K. J. *et al.*).

Σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της δεύτερης δόσης του εμβολίου παίζει και η στρατηγική εμβολιασμού, δηλαδή η ποσότητα της κάθε δόσης και ο χρόνος που μεσολαβεί ανάμεσα σε αυτές. Σύμφωνα με τους Barrett J. R. *et al.* μία δεύτερη ολόκληρη δόση είναι πιο αποτελεσματική σε σχέση με μία μισή δεύτερη δόση (Εικόνα 2). Βέβαια συμπληρωματικές μελέτες από τους Voysey M. *et al.* έδειξαν ότι μία στρατηγική εμβολιασμού με μία εξασθενημένη πρώτη δόση και μία κανονική δεύτερη δόση έχει μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από μία στρατηγική δύο κανονικών δόσεων. Συγκεκριμένα ο εμβολιασμός με μια αρχικά εξασθενημένη δόση οδηγεί σε μεγαλύτερη ανοσοαπόκριση μετά και τον εμβολιασμό με την δεύτερη δόση. Ταυτόχρονα βέβαια, και από τις δύο ομάδες, μελετήθηκαν και άλλοι συνδυασμοί εμβολίων, χωρίς όμως να οδηγούν σε καλύτερα αποτελέσματα. Επίσης, αποδείχθηκε από τους Barrett J. R. *et al.* ότι, ένας δεύτερος εμβολιασμός μετά από μετά από 8 – 12 εβδομάδες είναι πιο αποτελεσματικός από εμβολιασμούς που πραγματοποιούνται σε μικρότερα ή μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2:** SARS-CoV-2 MNA μετά τον εμβολιασμό της πρώτης δόσης. Στον άξονα y φαίνονται οι τιμές της δοκιμασίας MNA (δοκιμασία μέτρησης μικροπλακών Folegatti P. M. et al.) μετά από κανονικοποίηση και στον άξονα x η μέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό. Κάθε ευθεία αντιστοιχεί σε μία διαφορετική στρατηγική εμβολιασμού. SD / SD: δύο τυπικές δόσεις χορηγούνται είτε μεταξύ 28 ή 56 ημερών. SD / LD: βασική πρώτη δόση ακολουθούμενη από χαμηλή δεύτερη δόση μετά από 56 ημέρες. MenACWY: δύο δόσεις εμβολίου μηνιγγιτιδόκοκκου (τυφλό). Σε κάθε τιμή φαίνεται η τυπική απόκλιση μέσω των γραμμών σφάλματος. Η κλίμακα του άξονα y είναι λογαριθμική ( $\log_{10}$ ). Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν το ανώτερο όριο της ανάλυσης (640) και το κατώτερο όριο των κανονικοποιημένων δεδομένων ορίστηκε σε 5.

Τέλος, σημαντικά είναι και τα ευρήματα των ερευνών σχετικά με τις ηλικίες των ατόμων που μπορούν να κάνουν το εμβόλιο ChAdOx1. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί σε άτομα ηλικίας 18 έως 55 ετών στα οποία έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότητα του εμβολίου. Βέβαια πιο πρόσφατες των Voysey M. *et al.* δείχνουν ότι το εμβόλιο μπορεί να χορηγηθεί και σε άτομα μεγαλύτερα των 70 ετών αφού μετά από έναν εμβολιασμό ενίσχυσης η ανοσογονικότητα είναι παρόμοια σε όλες τις ηλικιακές ομάδες. Βέβαια, λόγω του μικρού αριθμού δοκιμών, δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την καθολικότητα των αποτελεσμάτων.

Συμπερασματικά, το εμβόλιο ChAdOx1 nCoV-19 πρόκειται για έναν άξιο ανταγωνιστή των εμβολίων mRNA. Όλες οι μελέτες δείχνουν ότι είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό σε άτομα με ηλικίες 18-55, αυξάνει τόσο τους τίτλους αντισωμάτων όσο και την επαγόμενη από το εμβόλιο ανοσοαπόκριση κατά του SARS-CoV-2. Επιπλέον ελπιδοφόρα είναι και τα αποτελέσματα που έχει σε ηλικίες μεγαλύτερες των 55 ετών χωρίς όμως να έχουν γίνει μελέτες σε μεγάλα δείγματα πληθυσμού. Όσον αφορά την δοσολογία του εμβολίου, παρατηρήθηκε ότι μία δεύτερη αναμνηστική δόση μπορεί να ενισχύσει την αποτελεσματικότητά του. Ο χρόνος και η στρατηγική που ακολουθείται ανάμεσα στις δύο δόσεις δεν είναι καθορισμένος και γίνονται ακόμα μελέτες ώστε να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες εμβολιασμού. Βέβαια παρόλο που τα αποτελέσματα των ερευνών είναι θετικά, έχουν εμφανιστεί και παρενέργειες σε άτομα που έχουν εμβολιαστεί, που σχετίζονται με θρομβώσεις

(Wise J.). Τέτοια περιστατικά εμφανίζονται κυρίως στην Ευρώπη και ακόμα δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς.

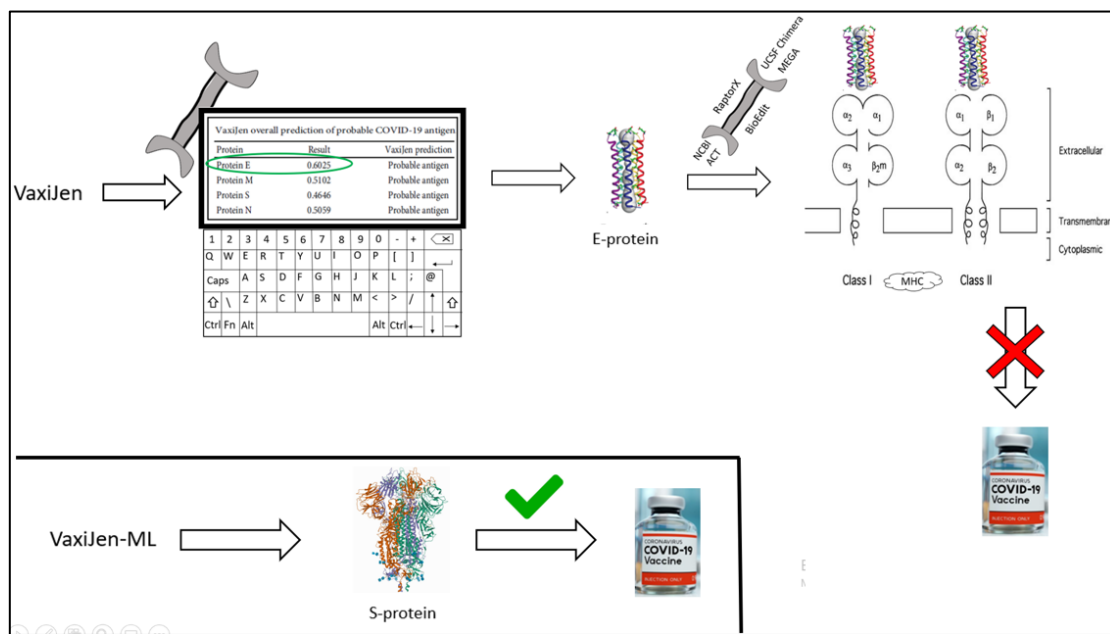
### **Βιβλιογραφία**

1. Barrett J. R. et al. Phase 1/2 trial of SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1 nCoV-19 with a booster dose induces multifunctional antibody responses. *Nature medicine*. 27(2), 279-288 (2021).
2. Voysey M. et al. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine: a pooled analysis of four randomised trials. *The Lancet*. 397(10277), 881-891 (2021).
3. Voysey M. et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *The Lancet*. 397(10269), 99-111 (2021).
4. Ramasamy M. N. et al. Safety and immunogenicity of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine administered in a prime-boost regimen in young and old adults (COV002): a single-blind, randomised, controlled, phase 2/3 trial. *The Lancet*. 396(10267), 1979-1993 (2020).
5. Folegatti P. M. et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *The Lancet*. 396(10249), 467-478 (2020).
6. Ewer K. J. et al. T cell and antibody responses induced by a single dose of ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) vaccine in a phase 1/2 clinical trial. *Nature medicine*. 27(2), 270-278 (2021).
7. Wise J. Covid-19: European countries suspend use of Oxford-AstraZeneca vaccine after reports of blood clots. *Online article*. (2021).



*Υπολογιστικά προγράμματα: Ένα παράδειγμα παραπλανητικής πρόβλεψης κατά τον σχεδιασμό του SARS-CoV-2 εμβολίου*

Από τον Λέφα Δημήτριο (ΑΜ:2000)



*Εικόνα 1. Το παράδειγμα άστοχης πρόβλεψης της βέλτιστης πρωτεΐνης για χρήση στην κατασκευή εμβολίου έναντι του SARS-CoV-2, μέσω ενός ανοσοπληροφορικού εργαλείου.*

Τα αποτελέσματα της χρήσης των υπολογιστικών εργαλείων για την εύρεση πιθανών επιτόπων που θα μπορούσαν να δράσουν ως στόχοι με σκοπό την παρασκευή εμβολίων έναντι του ιού SARS-CoV-2, αποδεικνύονται κάποιες φορές παραπλανητικά και δεν αντικατοπτρίζουν πάντα την πραγματικότητα. Το παραπάνω γεγονός συνέβη και σε μια ομάδα ερευνητών οι οποίοι βασίστηκαν στα αποτελέσματα του προγράμματος VaxiJen, το οποίο πρότεινε την πρωτεΐνη E του ιού ως τη βέλτιστη για χρήση στην κατασκευή εμβολίου και την πρωτεΐνη S ως τη χειρίστη για το σκοπό αυτό. Ύστερα, όμως, από ένα έτος μελετών έχει αποδειχθεί το ακριβώς αντίθετο και τα εμβόλια που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή έχουν φτιαχτεί με βάση την πρωτεΐνη Spike του SARS-CoV-2.

Η ομάδα των Miyssa et al. είχε ως στόχο να προσδιορίσει, πιθανά πεπτιδία του ιού SARS-CoV-2 που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή ενός εμβολίου πεπτιδίων, χρησιμοποιώντας ανοσοπληροφορικά εργαλεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η εργασία τους ολοκληρώθηκε τον Φεβρουάριο του 2020 και αυτό είναι σημαντικό, καθώς μέχρι τότε δεν είχε πραγματοποιηθεί εκτεταμένη έρευνα για τον νέο ιό και τα στοιχεία που ήταν διαθέσιμα δεν προσεγγίζουν σε καμία περίπτωση την πληθώρα γνώσεων που έχουμε σήμερα, ένα χρόνο αργότερα. [1]

Η συλλογιστική πορεία των ερευνητών ήταν επιστημονικά ορθή. Προσπάθησαν να συμβάλλουν στη δημιουργία ενός εμβολίου πεπτιδίων καθώς προσφέρει πιο στοχοποιημένη ανοσοαπόκριση, και σε αντίθεση με τα παραδοσιακά εμβόλια που έχουν αυξημένο κόστος παραγωγής, μπορούν να προκαλέσουν αλλεργίες και ενέχουν κινδύνους σε μερικές περιπτώσεις όσον αφορά την ασφάλειά τους, φαντάζουν μια αποδοτικότερη προσέγγιση συνολικά. Άλλωστε η ιδέα για την κατασκευή τέτοιων ειδών εμβολίων υπάρχει αρκετά χρόνια. Πιο συγκεκριμένα, μια έρευνα του 2007 έδειξε τα πλεονεκτήματα της χρήσης πεπτιδίων στην κατασκευή εμβολίων, μερικά από τα οποία είναι η απουσία του μολυσματικού παράγοντα, η απουσία κινδύνου για γενετικό ανασυνδυασμό όπως στα εμβόλια DNA, και το γεγονός ότι δεν χρειάζεται να καλλιεργηθεί ο παθογόνος μικροοργανισμός εργαστηριακά.<sup>[2]</sup>

Κατά την περίοδο που δημοσιεύθηκε η έρευνα των Miyssa et al. οι γνωστές πληροφορίες για τον SARS-CoV-2 ήταν ότι περιέχει μονόκλωνο RNA θετικής κατεύθυνσης μήκους περίπου 30.000 βάσεων και ότι οι πρωτεΐνες του ιού που σχετίζονται με τη λειτουργία του είναι η πρωτεΐνη φάκελος (E), η νουκλεοκαψιδιακή πρωτεΐνη (N), η μεμβρανική πρωτεΐνη (M) και η πρωτεΐνη ακίδα (S).

Οι ερευνητές αξιοποίησαν πληθώρα εργαλείων πληροφορικής για την πρόβλεψη πιθανών τρόπων στον ιό που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την πρόκληση ανοσολογικής απόκρισης στον οργανισμό που θα χορηγηθούν, και άρα για την κατασκευή εμβολίων. Αρχικά, άντλησαν τις γνωστές έως τότε αλληλουχίες του SARS-CoV-2 από την GenBank του NCBI, και τις σύγκριναν μεταξύ τους με τη βοήθεια του Artemis Comparison Tool (ACT) με σκοπό να βρουν κοινές ακολουθίες. Ύστερα, χρησιμοποιώντας το VaxiJen Server, προέβλεψαν τις πιθανές περιοχές στον ιό που θα μπορούσαν να δράσουν ως αντιγόνα με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, και όχι την αλληλουχία. Το πρόγραμμα έδειξε ότι η πρωτεΐνη E του ιού αποτελεί την πιθανότερη περιοχή για χρήση στην κατασκευή εμβολίων, οπότε οι ερευνητές συνέχισαν την έρευνά τους με γνώμονα μόνο την πρωτεΐνη αυτή. Ανέλυσαν την αλληλουχία της πρωτεΐνης μέσω του BioEdit για να βρουν διατηρημένα σημεία. Μέσω του προγράμματος IEDB προέβλεψαν τους επιτόπους στα T-κύτταρα και των 2 τύπων (MHC I και MHC II) και ανέλυσαν την κάλυψη (ανοσολογική ανοχή) που παρέχεται στον πληθυσμό με τη χρήση διαφόρων συνδυασμών από μικροπεπτίδια της πρωτεΐνης E. Τέλος, ανέλυσαν τη 3D δομή της πρωτεΐνης E μέσω του RaptorX και πραγματοποίησαν *in silico* μοριακή πρόσδεση (molecular docking) με τη χρήση των UCSF Chimera και AutoDock 4.0, προκειμένου να εκτιμηθεί η δεσμευτική συγγένεια μεταξύ των επιτόπων και της μοριακής δομής των MHC I και MHC II. Παράλληλα με τα παραπάνω οι ερευνητές κατασκεύασαν και το φυλογενετικό δέντρο μέγιστης φειδωλότητας των 7 στελεχών κορονοϊού, των οποίων τις αλληλουχίες απέκτησαν αρχικά, μέσω του προγράμματος MEGA. Το αποτέλεσμα της παραπάνω έρευνας είναι η παρουσίαση πιθανών πεπτιδίων της πρωτεΐνης E, τα οποία όταν χρησιμοποιούνται ως επίτοποι εμφανίζουν υψηλή ανοσογονική κάλυψη στον πληθυσμό, όπως άλλωστε υπολογίστηκε και από την ικανότητα αλληλεπίδρασής τους με τα μόρια MHC I και MHC II, και η έκκληση των ερευνητών για περαιτέρω μελέτη αυτών, ώστε να προσδιοριστεί και πειραματικά η καταλληλότητά τους για χρήση στην κατασκευή εμβολίου.<sup>[1]</sup>

Παραθέτοντας την προσωπική μου οπτική στην παραπάνω εργασία, θεωρώ λανθασμένο τον πειραματικό σχεδιασμό καθώς οι ερευνητές μελέτησαν μόνο επιτόπους της

πρωτεΐνης E και όχι και των υπόλοιπων γνωστών πρωτεϊνών. Το πρόγραμμα Vaxijen είναι ένα ανοσοπληροφορικό εργαλείο που προβλέπει την καταλληλότητα να δράσουν ως αντιγόνα συγκεκριμένες περιοχές σε μια πρωτεΐνη του ιού, με βάση όμως μόνο φυσικοχημικές ιδιότητες. Ο περιορισμός αυτός είναι αρκετά σημαντικός. Ένα τέτοιο πρόγραμμα ενέχει αρκετά υψηλό ποσοστό κινδύνου να παρουσιάσει λανθασμένα αποτελέσματα. Εξαιτίας αυτού, θεωρώ πως θα έπρεπε η ερευνητική ομάδα να πραγματοποιήσει την ανάλυση και των 4 γνωστών πρωτεϊνών με τα υπολογιστικά εργαλεία, καθώς ένας τέτοιος πειραματικός σχεδιασμός δεν καταναλώνει ούτε πόρους ούτε χρήματα.

Μερικούς μήνες αργότερα, μια άλλη ομάδα επιστημόνων κατασκεύασε και χρησιμοποίησε μια βελτιωμένη εκδοχή του προγράμματος αυτού, το VaxiJen-ML.<sup>[3]</sup> Το νέο αυτό πρόγραμμα προέβλεψε ότι η πρωτεΐνη S είναι καταλληλότερη για χρήση στην κατασκευή ενός εμβολίου πεπτιδίων, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί και πειραματικά.

Ύστερα από έναν χρόνο ερευνών, πληθώρα γνώσεων έχει συγκεντρωθεί σχετικά με τις ιικές πρωτεΐνες του SARS-CoV-2. Σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες E δεν είναι πολλά υποσχόμενες να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή εμβολίων καθώς η δομή τους και η χαμηλή ποσότητά τους είναι αδύνατο να προκαλέσουν ανοσοαπόκριση. Η θεώρηση αυτή αντικατοπτρίζεται και στον πίνακα 1, καθώς φαίνεται ότι όλα τα εμβόλια που βρίσκονται αυτή τη στιγμή σε ανάπτυξη είτε χρησιμοποιούν ολόκληρο τον ιό είτε εμπεριέχουν μόνο την πρωτεΐνη S.<sup>[4]</sup> Παρατηρώντας τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα εμβόλια στις μέρες μας, δύο από αυτά, της Pfizer και της Moderna, είναι εμβόλια mRNA της πρωτεΐνης S. Το γεγονός ότι τα μόνα εμβόλια που κατάφεραν να πάρουν έγκριση για τη χρήση τους, είναι εμβόλια της πρωτεΐνης S, επαληθεύει και πειραματικά ότι η καταλληλότερη πρωτεΐνη για χρήση σε ένα εμβόλιο πεπτιδίου είναι η S, σε αντίθεση με την E η οποία δεν φαίνεται να έχει χρησιμοποιηθεί για έως σήμερα.<sup>[5],[6]</sup>

Vaccine form	Antigen	Production
Inactivated virus	Whole virion	Virus particles inactivated by heat, chemicals or by radiation
Live-attenuated virus	Whole virion	Attenuated the virulence keeping it viable
RNA	S protein	Genetically engineered RNA for directly producing an antigen
DNA	S protein	Genetically engineered DNA for directly producing an antigen
Recombinant protein	S protein	Antigenic components produced as a whole or subunit
Viral vector-based vaccine	S protein	Genetically engineered with encoded target gene

**Πίνακας 1.** Διαφορετικές μορφές εμβολίων κατά του ιού SARS-CoV-2, ο αντιγονικός παράγοντας που χρησιμοποιούν και ο τρόπος παραγωγής τους.

Συμπερασματικά, η χρήση των ανοσοπληροφορικών εργαλείων έχει αναμφισβήτητα συνεισφέρει σημαντικά σε πληθώρα ερευνών, αλλά τα αποτελέσματά τους δεν πρέπει να θεωρείται ότι θα είναι πάντα τα σωστά. Ειδικά σε περιπτώσεις όπου μελετάται ένας καινούριος οργανισμός και η γνώση γι' αυτόν είναι περιορισμένη, καλό είναι να ελέγχουμε και πειραματικά τα αποτελέσματα τέτοιων εργαλείων. Οφείλω να τονίσω ότι η έρευνα που

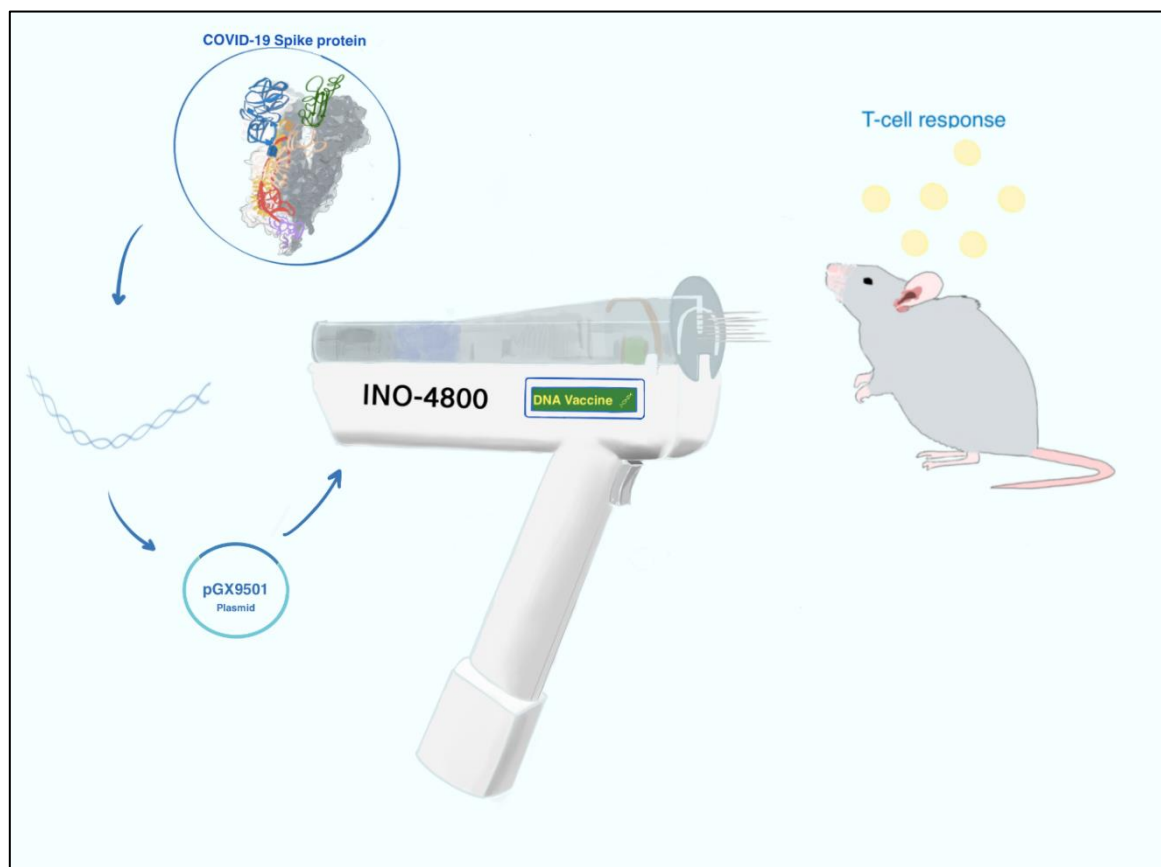
παρουσίασα είχε ορθή συλλογιστική πορεία και τέτοιες σκέψεις είναι καλό να επιβραβεύονται από την επιστημονική κοινότητα, αλλά θα έπρεπε να δοθεί παραπάνω προσοχή ώστε να μην περιορίζεται η έρευνα στα αποτελέσματα που λαμβάνονται μόνο από τα υπολογιστικά συστήματα.

### **Βιβλιογραφία**

1. *Miyssa I. Abdelmageed et. al. Design of a Multi-epitope-Based Peptide Vaccine against the E Protein of Human COVID-19: An Immunoinformatics Approach, Hindawi Volume 2020 (2020)*
2. *Anthony W. Purcell et. al. More than one reason to rethink the use of peptides in vaccine design, Nature Volume 6, 404-414, (2007)*
3. *Ahmed Rakib et. al. Immunoinformatics-guided design of an epitope-based vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike glycoprotein, Computers in Biology, 124, (2020)*
4. *Jee Young Chung et. al. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view, Advanced Drug Delivery Reviews 170, 1-25, (2021)*
5. *L.R. Baden et. al. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine, The New England Journal of Medicine Vol. 384 No. 5, 403-416 (2021)*
6. *Fernando P. Polack et. al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine, The New England Journal of Medicine Vol. 383 No. 27, 2603-2615 (2020)*

## Ανοσολογικές αποκρίσεις του INO-4800: υποψήφιο DNA εμβόλιο κατά της COVID-19

Από την Πλευρίδη Μαρία  
(ΑΜ:2035)



Εικόνα 1: Δημιουργία DNA εμβολίου έναντι της ασθένειας Covid-19 που στοχεύει την ακίδα του ιού.

Το INO-4800 πρόκειται για ένα νέο DNA εμβόλιο έναντι του ιού SARS-CoV-2 ο οποίος είναι υπεύθυνος για την ασθένεια Covid-19. Για την δημιουργία του αξιοποιήθηκε ο τομέας πρόσδεσης του υποδοχέα και συγκεκριμένα η πρωτεΐνη S της ακίδας του ιού. Ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα του DNA εμβολίου είναι η ταχύτητα δημιουργίας του καθώς και η σταθερότητα του ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες. Το εμβόλιο αυτό έδειξε υψηλή ανοσολογική απόκριση σε ορό από πειραματόζωα (ποντίκια και ινδικά χοιρίδια) και επιτυχή αναστολή της δέσμευσης της πρωτεΐνης S στον ACE2 ο οποίος θεωρείται πρωταρχικός υποδοχέας για την κυτταρική είσοδο του SARS-CoV-2. Αυτός ο αποκλεισμός της αλληλεπίδρασης υποδηλώνει ότι όντως προκαλούνται αντισώματα από το INO-4800. Η παρουσία αντισωμάτων στους πνεύμονες (υγρό BAL) που παρατηρήθηκε, θα μπορέσει πιθανότατα να παρέχει προστασία έναντι του της νόσου του κατώτερου αναπνευστικού (LRD) που σχετίζεται με σοβαρές περιπτώσεις Covid-19.

Η επιβεβαιωμένη πλέον μέθοδος δημιουργίας του εμβολίου βασίζεται στην αλληλουχία του ιού. Η αλληλουχία στόχευσης σε αυτή την περίπτωση αποτελεί την ακίδα του ιού, πρωτεΐνη S. Όπως έχει αποδειχτεί και από τους Prompetchara E et al, ολόκληρη η πρωτεΐνη S, δηλαδή S1 και S2 αποτελεί την βέλτιστη περιοχή στόχευσης για την ανοσολογική απόκριση έναντι μόνο της S1 ή μόνο της S2. Έτσι το INO-4800 αποτελείται από ορό με πλασμίδια pGX9501 που κατασκευάστηκαν ως φορείς ολόκληρης της πρωτεΐνης. Στη μελέτη των Smith et al. με τίτλο: «Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19», η ανοσογονικότητα του ελέγχθηκε σε πειραματόζωα, και συγκεκριμένα σε ποντίκια BALB/c και C57BL/6 καθώς και σε ινδικά χοιρίδια. Η χορήγηση του INO-4800 έγινε με ηλεκτροδιάτρηση η οποία ομόφωνα θεωρείται ως η αποδοτικότερη μέθοδος χορήγησης εμβολίου DNA. Οι εμβολιασμοί μεταξύ 2 και 3 επαναλήψεων και με διάστημα 7 μέρες ο καθένας περίπου γίνονται σε μεγάλο εύρος δόσης για την εύρεση της καλύτερης απόκρισης. Σημειώνεται ότι σε ορό ποντικών την 14<sup>η</sup> μέρα έπειτα από 1 δόση ανιχνεύτηκε δυνατότητα δέσμευσης της ανοσοσφαιρίνης G (IgG) στην πρωτεΐνη S της ακίδας του SARS-CoV-2 και στην πρωτεΐνη της ακίδας του SARS COV αν και στη δεύτερη περίπτωση η δέσμευση ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Εξουδετερωτικά αντισώματα μετρήθηκαν μέσω έναντι όπως φαίνεται στον πίνακα 1.

Σε ορό ποντικών με 2 δόσεις INO-4800 μετρήθηκαν, μέσω PRNT, οι τίτλοι εξουδετέρωσης την 21η μέρα και παρατηρήθηκε μέσω ELISA, επιτυχής αναστολή δέσμευσης 2 άγριων τύπων ιού (SARS-CoV-2/Australia/VIC01/2020 και SARS-CoV-2/WH-09/human/2020) και ψευδοϊού στον υποδοχέα ACE2 ο οποίος αποτελεί τον κύριο υποδοχέα για την κυτταρική είσοδο του SARS-CoV-2 στον άνθρωπο. Τα εξουδετερωτικά αντισώματα διέφεραν στα 2 είδη ποντικών όπως φαίνεται στον πίνακα 1. Αντίστοιχες μετρήσεις έγιναν στα ινδικά χοιρίδια (ELISA και PRNT) που εμβολιάστηκαν με 3 δόσεις και μεγαλύτερες δοσολογίες.

Table 1 Sera neutralizing activity after INO-4800 administration to mice and guinea pigs.						
Model	Vaccine	N	Immunization regimen	Sample timepoint	Neutralization assay	Serum ND50 (reciprocal dilution)
BALB/c Mouse	pVAX	4	25 µg Days 0, 14	Day 21	SARS-CoV-2 (WH-09/human/2020)	<20, <20, <20, <20
	INO-4800	4	25 µg Days 0, 14	Day 21	SARS-CoV-2 (WH-09/human/2020)	30, 40, 80, 240
	pVAX	8	25 µg Days 0, 14	Day 21	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	<10, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 24
	INO-4800	8	25 µg Days 0, 14	Day 21	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	27, 46, 91, 108, 130, 161, 221, 241
	pVAX	5	10 µg Days 0, 14	Day 21	SARS-CoV-2 Pseudovirus	8, 8, 8, 8, 8
	INO-4800	5	10 µg Days 0, 14	Day 21	SARS-CoV-2 Pseudovirus	43, 55, 87, 129, 147
C57BL/6 Mouse	pVAX	4	25 µg Days 0, 14	Day 21	SARS-CoV-2 (WH-09/human/2020)	<20, <20, <20, <20
	INO-4800	4	25 µg Days 0, 14	Day 21	SARS-CoV-2 (WH-09/human/2020)	240, 240, 240, 640
Guinea pig	pVAX	5	100 µg Days 0, 14, 28	Day 42	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	<10, 14, 20, 21, 25
	INO-4800	5	100 µg Days 0, 14, 28	Day 42	SARS-CoV-2 (Australia/VIC01/2020)	>320, >320, >320, >320, >320
	pVAX	5	100 µg Days 0, 14, 28	Day 35	SARS-CoV-2 Pseudovirus	<20, <20, <20, <20, <20
	INO-4800	5	100 µg Days 0, 14, 28	Day 35	SARS-CoV-2 Pseudovirus	527, 532, 579, 614, 616

Μεταγενέστερη έρευνα, των Seo et al., ακολουθώντας σχεδόν ταυτόσημη πειραματική πορεία, πραγματοποίησε το πείραμα αυτό σε πρωτεύοντα (μακάκοι) και σε ποντίκια BALB/c. Οι εξουδετερωτικές αποκρίσεις σε αυτό το πείραμα ήταν μεγαλύτερες κάτι που μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές πλασμιδιακού φορέα και δοσολογίας του εμβολιασμού αλλά γενικά τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά των Smith et al.

Στους πνεύμονες των εμβολιασμένων με INO-4800 BALB/c ποντικών και των ινδικών χοιριδίων βρέθηκαν αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2. Μετρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της IgG που δεσμεύει την πρωτεΐνη S του ιού σε υγρό βρογχοκυψελιδικής πλύσης (BAL) σε σύγκριση με τα ζώα που έλαβαν το κοντρόλ. Τα αντισώματα αυτά θα μπορούσαν πιθανότατα να παρέχουν προστασία έναντι του της νόσου του κατώτερου αναπνευστικού (LRD) που σχετίζεται με σοβαρές περίπτωσης Covid-19. Επιπλέον, έγινε προσδιορισμός της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας της κυτταρικής απόκρισης που προκαλείται από το INO-4800 έναντι του SARS-CoV, και του MERS-CoV. Στην πρώτη περίπτωση η αντίδραση των T κυττάρων ήταν χαμηλή αλλά ανιχνεύσιμη, ενώ στην δεύτερη ανύπαρκτη.

Σε γενικότερα πλαίσια τα DNA εμβόλια όπως το INO-4800 φαίνεται να έχουν ένα μεγάλο χρονικό προβάδισμα καθώς μπορούν να κατασκευαστούν πολύ γρήγορα έπειτα από την αλληλούχιση του γονιδιώματος του ιού. Επίσης το συγκεκριμένο εμβόλιο μπορεί να αποθηκευτεί για τουλάχιστον 4,5 χρόνια στους 2-8 ° C, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 έτος και 1 μήνα στους 37 ° C, διατηρώντας παράλληλα την ισχύ σε θερμοκρασίες άνω των 60 ° C. Σε μια πανδημία η ταχύτητα αυτή καθώς και τα χαρακτηριστικά σταθερότητας αποτελούν σημαντικό πλεονέκτημα για λόγους διακίνησης και κατασκευής του εμβολίου αλλά και γρήγορης αντιμετώπισης μιας επείγουσας κατάστασης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ακόμα εγκεκριμένα DNA εμβόλια σε κυκλοφορία.

Μερικές από τις βασικές προκλήσεις των DNA εμβολίων περιλαμβάνουν την παροχή επαρκούς ανοσογονικότητας, που απαιτούν μεγαλύτερους όγκους εμβολίου DNA για χορήγηση σε σύγκριση με τους πιο συμβατικούς τύπους εμβολίων. Αυτός ο τύπος εμβολίου απαιτεί επίσης τη χρήση συσκευής ηλεκτροδιάτρησης, η οποία μπορεί «να είναι άβολη» σε ανθρώπους όπως έχει αναφερθεί από τους Soleimanpour S. et al. Μια ακόμα ανησυχία που αναφέρεται από τους Rauch et al. αποτελεί ο κίνδυνος ενσωμάτωσης του πλασμιδιακού γενετικού υλικού σε ανθρώπινα χρωμοσώματα. Βάση της ανησυχίας αυτής, αποτελεί η παραμονή του πλασμιδιακού DNA για μεγάλο χρονικό διάστημα (πάνω από 60 μέρες) σε μερικά κύτταρα (κυρίως στην περιοχή που έγινε η χορήγηση). Η FDA συνιστά να συμπεριληφθούν μελέτες ενσωμάτωσης κάθε φορά που το πλασμιδιακό DNA παραμένει σε οποιοδήποτε ιστό με τη λήξη της μελέτης και ταυτόχρονα υπερβαίνει τα 30.000 αντίγραφα ανά μg DNA ξενιστή. Ο WHO συμβουλεύει την πραγματοποίηση μελετών ενσωμάτωσης ως μέρος του προκλινικού προγράμματος ασφάλειας των εμβολίων DNA. Παρ' όλα αυτά, από την πρώτη κλινική δοκιμή διαπιστώθηκε ότι το INO-4800 δείχνει ένα άριστο προφίλ ασφάλειας καθώς και ότι η ανοσοποίηση προκαλεί ανοσογονικές και κυτταρικές αποκρίσεις μετά από δύο δόσεις του εμβολίου, υποστηρίζοντας την περαιτέρω ανάπτυξη του, σύμφωνα με τους Tebas et al. Η αναφορά όμως δεν περιλαμβάνει δεδομένα σχετικά με τη διάρκεια της ανοσίας που προκαλείται από το εμβόλιο.

Συμπερασματικά, ο ανοσολογικός ορός INO-4800 επιτυγχάνει λειτουργική εξουδετέρωση χρησιμοποιώντας δοκιμή με ψευδοϊό SARS-CoV-2 και δοκιμή PRNT έναντι δύο στελεχών άγριου τύπου SARS-CoV-2. Επίσης φαίνεται από την δοκιμή ELISA ότι τα επαγόμενα από INO-4800 αντισώματα μπλοκάρουν τη σύνδεση της ακίδας του SARS-CoV-2 στον υποδοχέα του ξενιστή ACE2. Αυτή η μελέτη υπογραμμίζει την ανοσογονικότητα του INO-4800, και περαιτέρω μελέτες σε ζώα θα δοκιμάσουν την προστασία έναντι των λοιμώξεων. Το εάν μια μονή δόση ανοσοποίησης θα είναι επαρκής στους ανθρώπους θα διερευνηθεί σε κλινικές δοκιμές. Το INO-4800 βρίσκεται πλέον στην 3η φάση κλινικών δοκιμών.

### **Βιβλιογραφία**

1. Smith, T.R.F., Patel, A., Ramos, S. et al. *Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. Nat Commun* 11, 2601 (2020). doi:10.1038/s41467-020-16505-0.
2. Rauch, Susanne et al. "New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations." *Frontiers in immunology* vol. 9 1963. 19 Sep. 2018, doi:10.3389/fimmu.2018.01963
3. Soleimanpour, Saman, and Atieh Yaghoubi. "COVID-19 vaccine: where are we now and where should we go?." *Expert review of vaccines* vol. 20,1 (2021): 23-44. doi:10.1080/14760584.2021.1875824.
4. Prompetchara, Eakachai et al. "DNA vaccine candidate encoding SARS-CoV-2 spike proteins elicited potent humoral and Th1 cell-mediated immune responses in mice." *PloS one* vol. 16,3 e0248007. 22 Mar. 2021, doi:10.1371/journal.pone.0248007.
5. Seo, Yong Bok et al. "Soluble Spike DNA Vaccine Provides Long-Term Protective Immunity against SARS-CoV-2 in Mice and Nonhuman Primates." *Vaccines* vol. 9,4 307. 24 Mar. 2021, doi:10.3390/vaccines9040307.
6. Tebas, Pablo et al. "Safety and immunogenicity of INO-4800 DNA vaccine against SARS-CoV-2: A preliminary report of an open-label, Phase 1 clinical trial." *EClinicalMedicine* vol. 31 (2021): 100689. doi:10.1016/j.eclinm.2020.100689.