



**ΕΛΙΔΕΚ.**  
Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας & Καινοτομίας

**Περιγραφή Χρηματοδοτούμενου Ερευνητικού Έργου**  
**1η Προκήρυξη Ερευνητικών Έργων ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ. για την**  
**ενίσχυση των Μελών ΔΕΠ και Ερευνητών/τριών και την**  
**προμήθεια ερευνητικού εξοπλισμού μεγάλης αξίας**

**Τίτλος Ερευνητικού Έργου:** «Παραγωγή καινοτόμων ανοσοθεραπειών μέσω φαρμακολογικής επιγενετικής τροποποίησης»

**Επιστημονικός/ή Υπεύθυνος/η:** Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης, Καθηγητής Αιματολογίας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Διευθυντής Μονάδας Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών

**Επιστημονική Περιοχή:** Επιστήμες υγείας (ιατρικές και υγειονομικές επιστήμες)

**Φορέας Προέλευσης και Χώρα:** Ινστιτούτο Κυτταρικών Θεραπειών, Ελλάδα

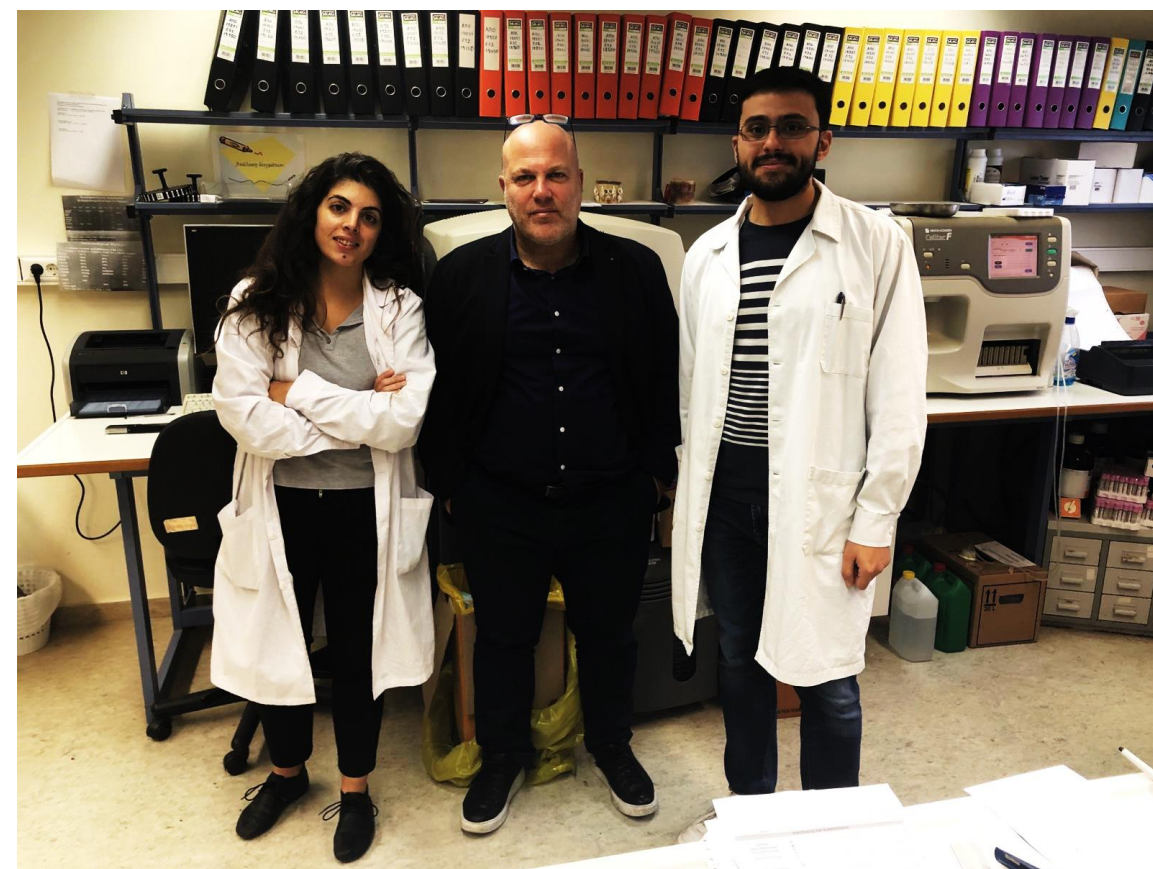
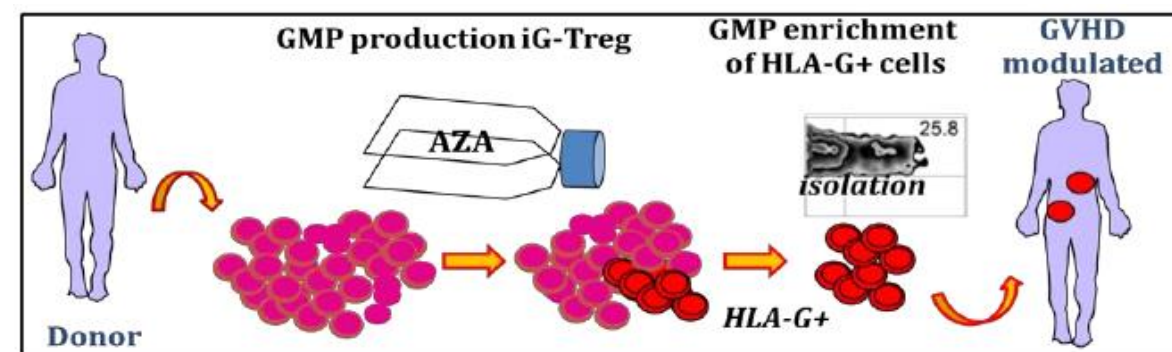
**Φορέας Υποδοχής:** Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής

**Συνεργαζόμενος Φορέας:**

1. Κέντρο Γονιδιακής και Κυτταρικής θεραπείας, Therapy Center, Dpt. of Hematology, Hematopoietic Cell Transplantation Unit, George Papanicolaou Hospital, Thessaloniki, Greece (Δρ. Γιαννάκη)
2. VUmc Cancer Center Amsterdam, Dpt. of Hematology, Amsterdam, Netherlands (Dr. Themeli)

**Ποσό Χρηματοδότησης:** 185.451,11

**Διάρκεια Χρηματοδότησης:** 36 months



Αλέξανδρος Σπυριδωνίδης, Καθηγητής Αιματολογίας  
Διονυσία Κεφάλα, Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος, MSc, Υποψήφια Διδάκτωρ  
Μέμνων Λυσάνδρου, Ιατρός, Υποψήφιος Διδάκτωρ

Το παρόν έργο στοχεύει στην παρακολούθηση της δημοσιευμένης εργασίας (Cytotherapy 2017; 19: 521–530) σχετικά με την «Απλή *in vitro* παραγωγή ρυθμιστικών T κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας HLA-G (human leukocyte antigen-G) μέσω φαρμακολογικής υπομεθυλίωσης για επίκτητη κυτταρική ανοσοθεραπεία κατά της νόσου μωσχέυματος-έναντι-ξενιστή». Εν συντομία, σε αυτή τη μελέτη έγινε μια προσπάθεια ανάπτυξης μιας αποτελεσματικής ανοσοθεραπείας κατά της νόσου Graft-έναντι-ξενιστή (GvHD), μια συχνή και απειλητική για τη ζωή επιπλοκή της αλλογενούς μεταμόσχευσης αιμοποιητικών κυττάρων (άλλο-ΜΑΚ) και για τις οποίες οι τρέχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις απέχουν της αποτελεσματικότητας.

Η προσέγγισή αυτή φιλοδοξούσε να μιμηθεί τον μηχανισμό της επιτυχούς φυσιολογικής ανοσοανεκτικότητας κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, όπου το μόριο HLA-G, ένα γνωστό ανοσορρυθμιστικό μόριο, εκφραζόμενο στον πλακούντα, προστατεύει το «ημι-αλλογενές» έμβρυο από την επίθεση της μητρικής ανοσίας. Δεδομένου ότι το γονίδιο HLA-G καταστέλλεται επιγενετικά μετά την προγεννητική ζωή και η κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή HLA-G ρυθμίζει τη μεταγραφική του δραστηριότητα, αποδείχθηκε σε *in vitro* πειράματα μικρής κλίμακας ότι η έκθεση ανθρώπινων περιφερειακών T-κυττάρων σε απομεθυλιωτικούς παράγοντες (ΑΠ) προκαλεί *de novo* και σταθερή έκφραση του HLA-G και τα μετατρέπει σε ρυθμιστικά κύτταρα (Treg) με *in vitro* ανοσοκατασταλτικές λειτουργίες. Αν και η κατασταλτική δραστηριότητα των Treg που έχουν υποστεί αγωγή με ΑΠ βρίσκεται αποκλειστικά εντός του HLA-G<sup>pos</sup> υποπληθυσμού, η κατασταλτική τους λειτουργία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό, αλλά όχι αποκλειστικά, από το μόριο HLA-G και πιθανώς πρόσθετα ανοσοκατασταλτικά μόρια ρυθμίζονται εκ νέου μέσω απομεθυλιωτικών παραγόντων και συμβάλλουν στην τη ρυθμιστική λειτουργία των HLA-G<sup>pos</sup> Tregs. Δεδομένου ότι το HLA-G δεν εκφράζεται σε ποντίκια, απαιτούνται μελέτες με τη χρήση εξανθρωπισμένων μοντέλων ποντικού για να καταδειχθεί η *in vivo* ανοσοκατασταλτική ικανότητα αυτών των ανθρώπινων HLA-G<sup>pos</sup> Tregs. Ως εκ τούτου το ερευνητικό αυτό έργο προτείνει την *ex vivo* παραγωγή T-κυττάρων που εκφράζουν HLA-G μέσω φαρμακολογικής απομεθυλίωσης ως μια απλή, αποτελεσματική και συμβατή με τους κανόνες Ορθής Παρασκευαστικής Πρακτικής για την παραγωγή ενός σταθερού Treg ποπληθυσμού με καθορισμένο φαινότυπο (HLA-G<sup>pos</sup>), ο οποίος μπορεί εύκολα να απομονωθεί για επίκτητη ανοσοθεραπεία (iG-Tregs).



Μελέτες στοιχεία σε προ-κλινικά μοντέλα έχουν αποδείξει ότι η ανοσοθεραπεία με T-ρυθμιστικά κύτταρα (Treg) μπορεί να καταστέλλει την υπερβολική ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος που προάγει την ανοσολογική ανοχή. Τα Tregs που μπορούν δυνητικά να χρησιμοποιηθούν στην κλινική πρακτική για την πρόληψη και τη θεραπεία της νόσου μοσχεύματος έναντι ξενιστή (GVHD) μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες υποομάδες, συμπεριλαμβανομένων α) των προερχόμενων από το θύμο CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Tregs και β) των επαγωγίμων Tregs (iTregs), που επάγονται στα περιφερειακά λεμφοειδή όργανα *in vivo* ή μπορούν να παραχθούν *in vitro* υπό διάφορες ανοσογόνες συνθήκες. Η χορήγηση Tregs μπορεί να σώσει ποντίκια GVHD που προκαλείται από συντριπτική ενεργοποίηση κυττάρων T δότη εναντίον αντιγόνων ξενιστή μετά από αλλογενή μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων (άλλο-ΜΑΚ).

Αν και μια τέτοια ανοσοθεραπευτική προσέγγιση θα ήταν επιθυμητή, τα πρωτόκολλα ανοσοθεραπείας με Treg έχουν αρκετούς περιορισμούς. Πρώτον, η εισαγωγή των Tregs στην κλινική πρακτική περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τους χαμηλούς αριθμούς κυκλοφορίας τους. Δεύτερον, δεν υπάρχει ειδικός δείκτης επιφάνειας κυττάρου για αποτελεσματική απομόνωση μετά την *ex vivo* έκπτυξή τους. Επιπλέον, ένας άλλος περιορισμός είναι η απώλεια της έκφρασης των μορίων στα Treg, καθώς και η απώλεια της κατασταλτικής λειτουργίας μετά από *in vitro* διέγερση ή σε συνθήκες προ-φλεγμονώδους μικρο-περιβάλλοντος.

Προσπαθώντας να αντιμετωπίσει αυτά τα ζητήματα, το ερευνητικό αυτό έργο προτείνει ένα καινοτόμο και εύκολα εφαρμόσιμο για κλινικούς σκοπούς πρωτόκολλο για την *in vitro* παραγωγή ενός απομονωμένου Treg υποπληθυσμού με καθορισμένο φαινότυπο. Πιο συγκεκριμένα, *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν αναγνωρίσει το HLA-G μόριο ως σημαντικό μεσολαβητή ανοσοποιητικής ανοχής που ασκεί ρυθμιστικές λειτουργίες με τη συμμετοχή ανασταλτικών υποδοχέων (π.χ. ILT2R) σε T κύτταρα. Το HLA-G εκφράζεται κανονικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στον πλακούντα, στη διεπαφή εμβρύου-μητέρας, προστατεύοντας το «ημι-αλλογενές» έμβρυο από την επίθεση της μητρικής ανοσοποίησης, το οποίο αποτελεί το τέλειο παράδειγμα επιτυχούς φυσιολογικής ανοσολογικής ανοχής των ημι-αλλομοσχευμάτων. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι η έκφραση HLA-G ρυθμίζεται έντονα με μεθυλίωση, προτείνουμε την επιγενετική επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης με παράγοντες απομεθυλίωσης κλινικού βαθμού (ΑΠ), όπως η αζακυτιδίνη (Aza) ή η Ντεσιταμπίνη (Dec) στα T κύτταρα. Αυτό το πρωτόκολλο μπορεί να αποδώσει καθαρό πληθυσμό Treg σε κλινική κλίμακα υπό συνθήκες Ορθής Παρασκευαστικής Πρακτικής επιτρέποντας τη χορήγηση των κυττάρων σε ασθενείς αλλο-ΜΑΚ έναντι της GvHD.

Η μεταμόσχευση αλλογενών αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων (άλλο-ΜΑΚ) αποτελεί την καθιερωμένη και μοναδική θεραπευτική προσέγγιση για πολλούς ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες. Περίπου 35.000 άλλο-ΜΑΚ διενεργούνται κάθε χρόνο στην Ευρώπη και 150 στην Ελλάδα, με τον αριθμό τους να αυξάνεται συνεχώς. Μία από τις πιο απειλητικές επιπλοκές της άλλο-ΜΑΚ είναι η ΓνHD, που προκαλείται από άλλο-αντιδραστικά Τ-λεμφοκύτταρα του δότη. Η ΓνHD καθ' εαυτή αλλά και η συμβατική ανοσοκατασταλτική θεραπεία για την πρόληψη και αντιμετώπισή της, αποτελούν τις κύριες αιτίες σημαντικής επιβάρυνσης στην ποιότητα ζωής των ασθενών αλλά και νοσηρότητας (35-50%) και θνητότητας (20-30%) μετά την άλλο-ΜΑΚ, δημιουργώντας ένα σοβαρό θεραπευτικό κενό με ανυπέρβλητο σωματικό, ψυχολογικό και οικονομικό κόστος.

Τα αναμενόμενα αποτελέσματα του προγράμματος αποτελούν μία ρεαλιστική προσέγγιση επίκτητων Τ κυτταρικών ανοσοθεραπειών χορηγώντας έναν πλήρως χαρακτηρισμένο, αποτελεσματικό και χαμηλού κόστους Τ κυτταρικό πληθυσμό που αντιπροσωπεύει μία πρόσφατα αναγνωρισμένη υποκατηγορία ρυθμιστικών κυττάρων. Επιπλέον, η ανοσοθεραπεία που αναμένεται να παραχθεί δυνητικά θα υπερέχει της συνήθους φαρμακοθεραπείας όσον αφορά στη σχέση κόστους-οφέλους και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μονοθεραπεία σε ασθενείς μετά άλλο-ΜΑΚ ή ακόμα και να επεκταθεί σε μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων ή Τ διαμεσολαβούμενα νοσήματα.

Τέλος, στη σύγχρονη ιατρική ακριβείας και της παραγωγής εξατομικευμένων κυτταρικών θεραπειών, ανοσοθεραπείες όμοιες με αυτή που προτείνεται στο EPICELL θα αποτελέσουν πρόσφορο έδαφος για τη σύνδεση μεταξύ έρευνας και παραγωγής αφενός μέσω συνεργασιών με R&D εταιρίες και αφετέρου μέσω προσέλκυσης νέων επιστημόνων στον τομέα της βιοιατρικής έρευνας.

Η χρηματοδότηση του ΕΛ.ΙΔ.ΕΚ δίνει τη δυνατότητα και ανάπτυξη και παραγωγή καινοτόμων ανοσοθεραπευτικών κυτταρικών προϊόντων (Φάρμακα Προηγμένων Θεραπειών) στην Ελλάδα και προωθεί την πρωτοποριακή έρευνα στο Πανεπιστήμιό μας. Ως εκ τούτου, νέοι επιστήμονες και ερευνητές μπορούν να ενταχθούν και να διαμορφώσουν μία στέρεη επιστημονική κοινότητα που να προσδοκά επιστημονική αριστεία. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μπορούν να δημοσιεύονται σε επιστημονικά περιοδικά μετά από ομότιμη αξιολόγηση καθώς και να παρουσιάζονται σε διεθνή συνέδρια υψηλής απήχησης συμβάλλοντας στη διάχυση της γνώσης παγκοσμίως.

Τέλος, ο πλήρης χαρακτηρισμός των κυτταρικών προϊόντων και η ανάπτυξη πρωτοκόλλων GMP κλίμακας μπορεί να οδηγήσει σε μελλοντικές κλινικές μελέτες ευελπιστώντας στην αναβάθμιση της κλινικής πράξης με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της ποιότητας ζωής και της ολικής επιβίωσης των ασθενών μας.



**ΕΛΙΔΕΚ.**  
Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας & Καινοτομίας

## ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ

Λ. Συγγρού 185 & Σάρδεων 2  
ΤΚ. 17121, Νέα Σμύρνη, Ελλάδα  
210 64 12 410, 420  
communication@elidek.gr  
[www.elidek.gr](http://www.elidek.gr)