

ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ Tamavac-TM

Επισκόπηση Μελέτης

Επίσημος τίτλος

Κλινική Μελέτη για τη Θεραπευτική Αποτελεσματικότητα των In-Silico σχεδιασμένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων TAMAVAC-TAAs VACCINE σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο γλοίωμα σε συνδυασμό με Bevacizumab 10mg/kg, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα, αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab

Σύντομη Περίληψη

Οι όγκοι του εγκεφάλου αποτελούν μία ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων των ενηλίκων όπου κάθε υποκατηγορία έχει τη δική της βιολογία, πρόγνωση και θεραπεία. Οι όγκοι της γλοίας αποτελούν το 40% των όγκων του εγκεφάλου στον ενήλικα, ακολουθούμενοι σε συχνότητα από το μηνιγγίωμα, με 28%. Ο ρόλος της χημειοθεραπείας συνεχώς αυξάνει τόσο σε επικουρική χορήγηση όσο και σε μη χειρουργήσιμους όγκους. Οι όγκοι εμβρυικής προέλευσης (μυελοβλάστωμα, όγκοι από γεννητικά κύτταρα) αποτελούν ιδιαίτερη υποκατηγορία, που χρειάζεται συνδυασμένη αντιμετώπιση με χειρουργική εκτομή, χημειο- και ακτινοθεραπεία, κατά προτίμηση σε εξειδικευμένο κέντρο. Τα γλοιοβλαστώματα είναι οι πιο συχνόι πρωτοπαθείς όγκοι εγκεφάλου, δηλαδή όγκοι οι οποίοι προέρχονται από τα ίδια τα κύτταρα του εγκεφάλου και όχι ως μεταστάσεις από κάποιο άλλο σημείο του σώματος. Ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των αστροκυτωμάτων. Τα αστροκυτώματα διακρίνονται σε 4 βαθμούς κακοήθειας:

- **Βαθμού I:** καλοήθεις όγκοι, όπως το πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα
- **Βαθμού II:** όγκοι χαμηλού βαθμού κακοήθειας, όπως το διάχυτο αστροκύτωμα
- **Βαθμού III:** όγκοι υψηλού βαθμού κακοήθειας, όπως το αναπλαστικό αστροκύτωμα ή το αναπλαστικό ολιγοδενδρογλοίωμα
- **Βαθμού IV:** γλοιοβλάστωμα

Τα γλοιοβλαστώματα προκαλούν συμπτώματα λόγω διήθησης του φυσιολογικού εγκεφάλου ή λόγω πίεσης στον περίξ φυσιολογικό εγκεφαλικό ιστό. Τα συμπτώματα των ασθενών εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες οι κυριότεροι από τους οποίους είναι το μέγεθος και η θέση του όγκου. Τα πιο συνηθισμένα συμπτώματα περιλαμβάνουν:

- Γνωστικά συμπτώματα όπως απώλεια μνήμης, αλλαγή προσωπικότητας, σύγχυση, προβλήματα ομιλίας.
- Πονοκέφαλος.
- Επιληπτικές κρίσεις – Οι επιληπτικές κρίσεις εμφανίζονται σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς με γλοίωμα βαθμού III ή βαθμού IV. Οι επιληπτικές κρίσεις προκαλούνται από την αποδιοργανωμένη ηλεκτρική δραστηριότητα στον εγκέφαλο. Τα φάρμακα είναι συνήθως απαραίτητα για τον έλεγχο των επιληπτικών κρίσεων.

A. LOW-GRADE ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΩΜΑΤΑ ΚΑΙ LOW-GRADE ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΓΛΟΙΩΜΑΤΑ Αντιμετωπίζονται με χειρουργική εξαίρεση όπου είναι δυνατόν, και σε περίπτωση πλήρους αφαίρεσης, οι ασυμπτωματικοί ασθενείς υποβάλλονται σε παρακολούθηση. Η ακτινοθεραπεία (Α/Θ), είτε ως κύρια θεραπευτική προσέγγιση σε ανεγχείρητους όγκους είτε ως επικουρική θεραπεία μετά από μη πλήρη εκτομή, και η χημειοθεραπεία (Χ/Θ) δυνατόν να χορηγηθούν σε πολλούς ασθενείς, μολονότι ο βέλτιστος χρόνος και η διαδοχή αυτών των θεραπειών δεν έχουν καθοριστεί με σαφήνεια. Στην υποτροπή, τα low-grade αστροκυτώματα μπορούν να αντιμετωπιστούν με Α/Θ και τα low-grade ολιγοδενδρογλοιώματα με Χ/Θ, με βάση την διαφορετική ευαισθησία τους προς αυτές τις θεραπείες.

B. HIGH-GRADE ΑΣΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ (WHO grade III: Αναπλαστικό αστροκύτωμα και WHO grade IV: Πολύμορφο γλοιοβλάστωμα) Η τρέχουσα θεραπεία εκλογής είναι η μέγιστη χειρουργική αφαίρεση (κυρίως σε νέους ασθενείς με καλή γενική κατάσταση, PS 0-1) και ακολούθως κλασματική Α/Θ με ή χωρίς Χ/Θ. Η συνολική δόση Α/Θ τυπικά φθάνει στα 50-60 Gy με ημερήσια δόση 1,8-2,0 Gy. Ταυτόχρονη χορήγηση τεμοζολομίδης καθώς και επικουρική χορήγηση της για 6 μήνες συνιστάται για ασθενείς ηλικίας 18-70 ετών που είναι κατάλληλοι για ριζική θεραπεία. Ακόμη, η τεμοζολομίδα μπορεί να χορηγηθεί και σε άλλες συνθήκες (PS 2, μετά από βιοψία μόνο, ηλικία >70, ενδιάμεσου βαθμού γλοίωμα). Επιγενετική ανενεργοποίηση του ενζύμου επιδιόρθωσης του DNA methylguanine methyltransferase (MGMT) φαίνεται ότι είναι ισχυρός προβλεπτικός παράγων για την έκβαση. Οι ασθενείς των οποίων οι όγκοι δεν φέρουν μεθυλίωση του προαγωγέα της MGMT (promoter methylation) είναι λιγότερο πιθανό να επωφεληθούν από την τεμοζολομίδα και άλλους αλκυλιωτικούς παράγοντες. Η

μετεγχειρητική τοπική εφαρμογή καρμουστίνης (BCNU) με μορφή αργά αποδεσμευομένων πολυμερών (wafers) δείχνει οριακό όφελος. Στην υποτροπή, το standard of care θεραπευτικής αντιμετώπισης είναι αμφιλεγόμενο. Επαναθεραπεία μπορεί να είναι στερεοτακτική Α/Θ, επανεκτομή, τεμοζολομίδη, συστηματική χ/θ ή εφαρμογή πειραματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στα πλαίσια κλινικών δοκιμών. Μεταξύ των νέων στοχευουσών θεραπειών το bevacizumab έδειξε κλινική δραστηριότητα είτε σαν μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με irinotecan με υποσχόμενο ποσοστό progression free survival στους 6 μήνες.

Γ. ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ ΟΛΙΓΟΔΕΝΔΡΟΓΛΩΙΩΜΑ ΚΑΙ ΟΛΙΓΟΑΣΤΡΟΚΥΤΤΩΜΑ Η χειρουργική εκτομή, η Α/Θ και η Χ/Θ χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση τους. Η συνολική εξαίρεση του όγκου αποτελεί το βασικό βήμα στην αντιμετώπιση τους και ο βαθμός της αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα. Μεγάλες μελέτες φάσης III επικουρικής ΧΜΘ με συνδυασμό procarbazine, lomustine και vincristine έδειξαν ότι βελτιώνει την progression free survival αλλά όχι τη συνολική επιβίωση. Κλινικές μελέτες επίσης υποδεικνύουν χημειοευαισθησία στην temozolomide. Η Χ/Θ ολοένα και περισσότερο υποκαθιστά την Α/Θ σαν αρχική μετεγχειρητική αντιμετώπιση με την Α/Θ να προστίθεται είτε μετά το τέλος της χ/θ είτε κατά την εμφάνιση υποτροπής/επιδείνωσης. Η απώλεια αλληλίου του χρωμοσώματος 1 είναι ένας σημαντικός προβλεπτικός παράγοντας χημειοευαισθησίας, ενώ η συνδυασμένη απώλεια των χρωμοσωμάτων 1p και 19q είναι ισχυρός παράγων χημειο-ευαισθησίας (PCV ή τεμοζολομίδη), progression free survival και συνολικής επιβίωσης.

Άλλα κοινά συμπτώματα των εγκεφαλικών όγκων περιλαμβάνουν μυϊκή αδυναμία, προβλήματα ισορροπίας, οπτικά συμπτώματα και αλλαγές αισθητικότητας. Ο όγκος χαρακτηρίζεται από υψηλή διηθητικότητα, ο κίνδυνος υποτροπής είναι αρκετά υψηλός μετά τη χειρουργική επέμβαση, το φαρμακευτικό σχήμα εμφανίζει περιορισμένη διείσδυση στον όγκο, επίσης αναπτύσσει αντίσταση στη χημειοθεραπεία, οδηγώντας κατ' αυτόν τον τρόπο σε χαμηλά ποσοστά επιβίωσης. Το γλοιοβλάστωμα (Αστροκύττωμα βαθμού 4), είναι ο πιο επιθετικός όγκος εγκεφάλου, με δυσμενή πρόγνωση παρά τις επιθετικές θεραπείες όπως ο συνδυασμός χειρουργικής εξαίρεσης, ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία [π.χ. Τεμοζολομίδη]. Ο όγκος χαρακτηρίζεται από υψηλή διηθητικότητα, ο κίνδυνος υποτροπής είναι αρκετά υψηλός μετά τη χειρουργική επέμβαση, το φαρμακευτικό σχήμα εμφανίζει περιορισμένη διείσδυση στον όγκο, επίσης αναπτύσσει αντίσταση στη χημειοθεραπεία, οδηγώντας κατ' αυτόν τον τρόπο σε χαμηλά ποσοστά επιβίωσης. Παρά τις σημαντικές προόδους στην κατανόηση της ανάπτυξης των γλοιωμάτων (gliomagenesis), οι ακριβείς μοριακές αλλαγές που ευθύνονται για τον διαφοροποιητικό χαρακτήρα των γλοιωμάτων σε διάφορους υποτύπους παραμένουν ανεξερεύνητες. Η μοριακή ομαδοποίηση των όγκων, χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η ανίχνευση των μεταλλάξεων της IDH, η 1p19q-συνδιαγραφή, και η διαγραφή των CDKN2A/B, βοηθά πλέον στην πιο ακριβή κατηγοριοποίηση των γλοιωμάτων, επηρεάζοντας όχι μόνο τα χαρακτηριστικά του φαινοτύπου του όγκου, αλλά και τα κλινικά αποτελέσματα. Επίσης, οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι κρίσιμες στη μετάβαση από υγιή σε κακοήγη κύτταρα, εμπλέκοντας περίπλοκες αλληλεπιδράσεις με γενετικές αλλαγές. Επηρεάζουν κρίσιμες κυτταρικές διαδικασίες που σχετίζονται με την προοδευτική εξέλιξη του γλοιώματος, συμπεριλαμβανομένης της επισκευής του DNA, της απόπτωσης, της διήθησης των κυττάρων και της πρόσληψής τους, όλες αυτές που συνεισφέρουν σημαντικά στην “αναταραχή” που μετατρέπει τα φυσιολογικά κύτταρα σε κύτταρα κακοήθειας (γλοιώματα). Τα δύο βασικά είδη επιγενετικών τροποποιήσεων είναι η μεθυλίωση του DNA και οι αλλαγές των ιστονών. Μία από τις σημαντικότερες ανακαλύψεις που προώθησε αξιοσημείωτα τη μοριακή ταξινόμηση των γλοιωμάτων ήταν η διαπίστωση σημειακών μεταλλάξεων στο γονίδιο IDH1 αρχικά σε ένα υποσύνολο γλοιοβλαστωμάτων από νεότερους ασθενείς και σε δευτερογενή γλοιοβλαστώματα προερχόμενα από εξέλιξη γλοιωμάτων χαμηλότερου βαθμού. Περαιτέρω μελέτες αποκάλυψαν ότι μεταλλάξεις στα γονίδια IDH1 και IDH2 διαχωρίζουν τα γλοιώματα με σαφώς διακριτή βιολογία και κλινική συμπεριφορά. Η αυξημένη συχνότητα των μεταλλάξεων αυτών στα γλοιώματα τόσο αστροκυτταρικής όσο και ολιγοδενδρογλοιακής προέλευσης για πολλούς ερευνητές είναι ίσως ενδεικτικό πως πραγματοποιούνται στα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης των γλοιωμάτων, προτού συμβούν οι περαιτέρω μοριακές αλλαγές που οδηγούν σε συγκεκριμένη ιστολογική διαφοροποίηση. Στα γλοιώματα έχουν περιγραφεί μεταλλάξεις στις ισομορφές 1 και 2 της πρωτεΐνης IDH. Η πιο συχνή μετάλλαξη που απαντάται σε ποσοστό >90% των γλοιωμάτων που φέρουν μετάλλαξη IDH αφορά την ισομορφή IDH1 και είναι μια σημειακή μετάλλαξη στο κωδικόνιο 132 του γονιδίου IDH1 που οδηγεί στην αντικατάσταση της αργινίνης από ιστιδίνη p.(R132H). Το υπόλοιπο 10% αφορά άλλες μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 132 του γονιδίου IDH1 και στο κωδικόνιο 172 του γονιδίου IDH2. Οι σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια IDH1 και IDH2 είναι ετερόζυγες, παρανοηματικές που καταλήγουν σε μία μόνη αντικατάσταση αμινοξέος. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτές οι μεταλλάξεις συμβαίνουν σε εξελικτικά διατηρημένες θέσεις αργινίνης στην ενεργό θέση των ενζύμων IDH που παίζουν ρόλο κλειδί στη δέσμευση του υποστρώματος. Έρευνα-ορόσημο από τους Dang L et al έδειξε ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη IDH1 δεν είναι ένα μη λειτουργικό ένζυμο, αλλά μάλλον ένα ένζυμο με διαφορετική δραστηριότητα, το οποίο μετατρέπει το αKG σε 2-υδροξυ-γλουταρικό οξύ (2-HG) με την ταυτόχρονη κατανάλωση NADPH. Το 2-HG είναι ένα υποπροϊόν στον φυσιολογικό μιτοχονδριακό μεταβολισμό, το οποίο κανονικά βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο κύτταρο και έχει δύο εναντιομερή, τα D-2HG και L-2HG (ή R-2HG και S-2HG, αντίστοιχα). Τα κύτταρα με μετάλλαξη στο γονίδιο IDH1 παράγουν αποκλειστικά D-2HG σε πολύ υψηλά επίπεδα, έως και 100 φορές υψηλότερα από ό,τι στους φυσιολογικούς ιστούς. Κατά τον ίδιο τρόπο, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο IDH2 έχει βρεθεί ότι έχουν ως αποτέλεσμα υψηλά επίπεδα D-2HG εντός του κυτταροπλάσματος. Η συσσώρευση υψηλών επιπέδων D-2HG λαμβάνει χώρα μόνο, όταν εκφράζονται ταυτόχρονα τα δύο αλληλόμορφα του γονιδίου IDH1, το φυσιολογικό και το μεταλλαγμένο. Η απώλεια της έκφρασης του

φυσιολογικού αλληλόμορφου IDH1 σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος που εκφράζουν μόνο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα IDH1 οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα D-2HG. Αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί η απώλεια της ετεροζυγωτίας είναι σπάνια σε γλοιώματα που φέρουν μετάλλαξη στα γονίδια IDH1/2.

ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΑ ΣΧΗΜΑΤΑ: 1. Temozolomide 75mg/m²/ημέρα PO για 6-7 εβδομάδες συνεχώς ταυτόχρονα με A/Θ 2Gy/ημέρα για 5 ημέρες/εβδομάδα για 6-7 εβδομάδες ακολουθούμενη από Temozolomide 150-200mg/m² PO d1-5 κάθε 4εβδομάδες για 6 κύκλους. 2. Temozolomide 150-200mg/m² PO d1-5 κάθε 4εβδομάδες για 6 κύκλους. 3. BCNU (Carmustine) 200mg/m² IV d1 κάθε 8 εβδομάδες για 6 κύκλους μαζί με A/Θ Εμφύτευμα BCNU (carmustine wafer 7,7 mg) : 1-8 εμφυτεύματα (max 61,4 mg) 4. Συνδυασμένη X/Θ PCV: CCNU 110 mg/m² PO d1 Procarbazine 60mg/m² PO d8-21 Vincristine 1.4mg/m²(max 2mg) IV d8+29 Επανάληψη κάθε 6 εβδομάδες Η CCNU 100mg/m² PO d1 Procarbazine 100mg/m² PO d1-10 Vincristine 1.5mg/m²(max 2mg) IV d1 Επανάληψη κάθε 6 εβδομάδες (maximum 12 κύκλοι) 216 5. Bevacizumab 10mg/kg + Irinotecan 180mg/m², κάθε 2 εβδομάδες μέχρι επιδείνωσης της νόσου ή bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες +temozolamide 150 200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες. 6. Συνδυασμοί βασισμένοι στην πλατίνα (cisplatin ή carboplatin).

Βασικές Αρχές και Εφαρμογές της Υγρής Βιοψίας

Τα κύτταρα των όγκων μπορεί να απελευθερώσουν πολλά στοιχεία στην κυκλοφορία τα οποία μπορούν να μεταναστεύσουν σε απομακρυσμένα όργανα σε όλο το σώμα. Αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν ανέπαφα κυτταρικά στοιχεία του όγκου, καθώς και το κυτταρικό DNA και RNA των όγκων, πρωτεΐνες ή εξωσωμάτια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες του όγκου που κυκλοφορούν στο αίμα και μπορεί να μας παρέχουν παρόμοιες πληροφορίες με αυτές που παρέχει η βιοψία του όγκου, εντοπίζοντας την πρωτοπαθή εστία της παθολογίας και παίζοντας έτσι ένα ρόλο κλειδί στην παρακολούθηση της προόδου του όγκου ή της αποτελεσματικότητας της θεραπείας κατά του όγκου (Cohen et al., 2018). Δεδομένης της αυξανόμενης ευαισθησίας των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των νουκλεϊνικών οξέων, είναι σήμερα δυνατό να αναλύσουμε νουκλεϊκά οξέα που απελευθερώνονται από όγκους και κυκλοφορούν στο αίμα. Η γενετική και επιγενετική ανάλυση του κυκλοφορούντος κυτταρικού DNA του όγκου, για παράδειγμα, αποτελεί ένα σημαντικό νέο εργαλείο σχετικά με τη θεραπεία. Χρησιμοποιώντας την υγρή βιοψία (YB), οι κλινικοί μπορούν να λάβουν δεδομένα σχετικά με τον κίνδυνο και τον προγνωστικό χαρακτήρα της νόσου και να προβλέψουν τις πιθανότητες υποτροπής του όγκου (Schilsky & Longo, 2022). Πιο αναλυτικά, η YB είναι μια μέθοδος ελάχιστης επεμβατικότητας (π.χ. φλεβοκέντηση) που επιτρέπει τον εντοπισμό πολλών διαφορετικών αναλυτών (Chen & Zhao, 2019) σε ποικίλα βιολογικά υγρά για την παρακολούθηση της προόδου της νόσου (Eibl & Schneemann, 2021; Poulet et al., 2019). Δεδομένου ότι οι περισσότεροι όγκοι απελευθερώνουν διάφορους αναλύτες στην κυκλοφορία του αίματος, η YB συνήθως περιλαμβάνει την λήψη αίματος. Ωστόσο, άλλα σωματικά υγρά, όπως η βλέννη ή τα πτύελα, το πλευριτικό υγρό, το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και τα ούρα, επίσης μπορούν να αναλυθούν (Bauman et al., 2022; Lone et al., 2022). Επιπλέον, οι επεμβατικές διαδικασίες διέπονται από περιορισμούς στην λήψη του δείγματος του όγκου, ως προς την ποσότητα και την ποιότητα του βιοπτικού υλικού. Τα συνεχή δείγματα βιοψίας ιστού κατά την διάρκεια της θεραπείας και παρακολούθησης του όγκου, καθιστούν δύσκολη διαδικασία τον χαρακτηρισμό του προφίλ του όγκου (Perakis & Speicher, 2017). Η όλη αυτή καθιερωμένη διαδικασία λήψης βιοψιών, περιορίζει την διενέργεια όλων των απαραίτητων μοριακών εξετάσεων που απαιτούνται για μια αξιόπιστη, με βάση τις σύγχρονες κατευθυντήριες οδηγίες (guidelines), διάγνωση. Σε αυτό το πλαίσιο, η ανίχνευση των γενετικών μεταλλάξεων αλλά και των επιγενετικών αλλαγών, δεν είναι πάντα δυνατή. Η βιοψία του ιστού ενδέχεται να μην επιτρέπει την ικανοποιητική ανίχνευση του όγκου σε πρώιμα στάδια ή σε περιπτώσεις υπολειμματικής νόσου και κατά αυτόν τον τρόπο η βιοψία δεν είναι κατάλληλη για έλεγχο (Hirahata et al., 2022). Επιπλέον, η χρονική και χωρική ετερογένεια του όγκου μπορεί να μειώσει την πρακτική χρησιμότητα των ιστών βιοψίας ως εργαλεία, για την παρακολούθηση της προόδου της θεραπείας του όγκου και την σωστή αξιολόγηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία (Cohen et al., 2018). Ειδικότερα, σε πολυεστιακές μορφές όγκων, ενδέχεται να είναι απαραίτητο η διενέργεια λήψης πολλαπλών βιοψιών για να διαπιστωθεί με ακρίβεια η παθολογία του όγκου, καθώς οι όγκοι εξελίσσονται συνεχώς, τόσο χωρικά όσο και χρονικά, κατά ιδίου σκοπού ή και ως αποτέλεσμα ως προς την θεραπεία (Perakis & Speicher, 2017).

Αναλύτες που εντοπίζονται στα βιολογικά υγρά μέσω της υγρής βιοψίας

Το 1996, το National Comprehensive Cancer Network (NCCN) εισήγαγε αρκετούς βιοδείκτες στην κλινική πράξη, βασισμένο σε κλινικούς και/ή τεχνικούς παράγοντες για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς (Hayes et al., 1996). Το 2011, το NCCN ενημέρωσε και θέσπισε συγκεκριμένους βιοδείκτες ως καθιερωμένη αντιμετώπιση (standard of care) σε ορισμένους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων και των γλοιωμάτων (Febbo et al., 2011). Αναλύτες με δυνατότητα βιοδείκτη που μπορούν να ανιχνευθούν μέσω της Υγρής Βιοψίας (Liquid Biopsy) περιλαμβάνουν το κυτταρικό ελεύθερο DNA (cfDNA), το κυτταρικό ελεύθερο RNA (cfRNA), τις κυκλοφορούσες πρωτεΐνες, κυκλοφορόντα κύτταρα του όγκου (CTC) και τα εξωκυττάρια κυστίδια ή εξωσωμάτια (EVs) όπως τα εξωσωμάτια, τα οποία μπορεί να περιέχουν το DNA του όγκου και άλλα νανομόρια όπως τα mRNA/miRNA (εικόνα 5) (Jelski & Mroczko, 2021; Westphal & Lamszus, 2015). Με βάση λοιπόν τα προαναφερθέντα, η ελάχιστα επεμβατική διαδικασία της υγρής βιοψίας, αποτελεί λύση σε αυτά τα προβλήματα, και ως μια συνεχώς εξελισσόμενη

διαδικασία που θα επιτρέψει την πρώτη διάγνωση του όγκου και φυσικά θα δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο, την πρόγνωση αλλά και την πιθανότητα υποτροπής της παθολογίας.

Ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA), Ελεύθερο κυτταρικό RNA (cfRNA), και κυκλοφορόντες πρωτεΐνες

Το κυκλοφορούν cfDNA αφορά σε θραύσματα DNA των κυττάρων του όγκου που μπορούν να ανιχνευθούν στην κυκλοφορία. Τα κύτταρα του όγκου που υπόκεινται νέκρωση και/ή υποβάλλονται σε απόπτωση απελευθερώνουν cfDNA στην κυκλοφορία του αίματος, το οποίο περαιτέρω μεταβολίζεται από την DNase ή άλλα ένζυμα (Aarthy et al., 2015). Βασιζόμενοι σε αυτά τα στοιχεία, το αίμα του ασθενούς μπορεί να περιέχει cfDNA που φέρει θραύσματα του κυκλοφορόντος DNA του όγκου προερχόμενο από τα κύτταρα του όγκου. Αυτό μπορεί να εξεταστεί περαιτέρω σε μοριακό επίπεδο για να αποκαλυφθεί πλήρως το μοριακό προφίλ του όγκου (Rykova et al., 2012). Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του cfDNA, έχει χρόνο ημίσειας ζωής σχεδόν δύο ώρες και μπορεί να ανιχνευθεί κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου μετά την λήψη και απομόνωση του δείγματος (Roth et al., 2011). Βασιζόμενοι στα προαναφερθέντα δεδομένα, το cfDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένδειξη των μοριακών δυναμικών του όγκου σε πραγματικό χρόνο (Aarthy et al., 2015). Σε ασθενείς με γλοίωμα, η πλειονότητα του cfDNA που δεν είναι προερχόμενη από τον όγκο αποτελείται από cfDNA το οποίο προέρχεται από διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, της νέκρωσης και άλλων κυτταρικών εκκριτικών διαδικασιών (Carpenter & Bagley, 2022). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός απελευθέρωσης του cfDNA εξαρτάται από βιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας, του φύλου, του δείκτη μάζας σώματος, της υγείας του εκάστοτε οργανισμού και της παρουσίας λοιμώξεων ή συστηματικών φλεγμονωδών καταστάσεων (Aucamp et al., 2018; Bronkhorst et al., 2019). Η ανάλυση του κυκλοφορόντος DNA του όγκου (ctDNA) περιλαμβάνει τον εντοπισμό και την ανάλυση θραυσμάτων DNA που εκκρίνονται από τα κύτταρα του όγκου στην κυκλοφορία του αίματος. Με την απομόνωση και την ανάλυση των αλληλουχιών του ctDNA, μπορούν να αναγνωριστούν και να αναλυθούν συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές που συσχετίζονται με τον εγκεφαλικό όγκο. Οι τεχνολογίες cfDNA μπορούν να ανιχνεύσουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο ctDNA που είναι ενδεικτικές ενός όγκου εγκεφάλου. Αυτές οι μεταλλάξεις μπορεί να περιλαμβάνουν μονονουκλεοτιδικές μεταβολές (SNVs = single nucleotide variants), εισαγωγές/διαγραφές (indels), ή μεγαλύτερες δομικές μεταβολές, όπως συγχωνεύσεις γονιδίων ή χρωμοσωμικών ανακατατάξεων (Mair & Mouliere, 2022). Η ανάλυση της ποικιλίας του αριθμού αντιγράφων (Copy number variation- CNV) του cfDNA επιτρέπει τον εντοπισμό αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων του DNA, όπως ενισχύσεις ή διαγραφές, οι οποίες μπορούν να παρέχουν δεδομένα στο γενωμικό τοπίο των όγκων του εγκεφάλου (Mouliere et al., 2018; Sun et al., 2019). Αυτές οι προηγμένες τεχνολογίες επιτρέπουν σε πραγματικό χρόνο (real-time) την παρακολούθηση της δυναμικής του όγκου και της ανταπόκρισης του στη θεραπεία μέσω της ανάλυσης του ctDNA σε διάφορες στιγμές κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Αυτό επιτρέπει τον εντοπισμό νεοεμφανιζόμενων γενετικών αλλαγών και μηχανισμών αντοχής, καθοδηγώντας έτσι τις αποφάσεις σχετικά με τη θεραπεία (Euskirchen et al., 2017). Το ENY έχει προταθεί ως το πιο κατάλληλο βιολογικό δείγμα για την αξιολόγηση του cfDNA σε όγκους εγκεφάλου. Η συλλογή του, ωστόσο, απαιτεί μια επεμβατική διαδικασία που δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί τακτικά για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης του όγκου στην θεραπεία (Y. Wang et al., 2015). Συνεπώς, υπάρχει αυξανόμενη ανάγκη για τη χρήση εναλλακτικών βιολογικών υγρών, όπως αίμα, πύελα και ούρα, τα οποία μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν σε συγκεκριμένα σωληνάρια συλλογής με σταθεροποιητικά διαλύματα (buffer), όπως το EDTA. Το σάλιο, από την άλλη πλευρά, λειτουργεί ως ένα ζωτικό βιολογικό υγρό που διαθέτει πλεονεκτήματα έναντι του αίματος, κυρίως επειδή δεν πηχίζει. Αυτό το χαρακτηριστικό το καθιστά πιο εύκολο στη συλλογή του, να μεταφερθεί αλλά και να αποθηκευτεί. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι το σάλιο αποτελείται κυρίως από νερό, γλυκοπρωτεΐνες, ένζυμα και πρωτεΐνες, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν την ανάλυση του δείγματος. Επιπλέον, πρέπει να σημειωθεί ότι πρωτεΐνες των πτυέλων, τα cfDNA και cfRNA βρίσκονται σε κυστίδια (ενδοκυστίδια) μέσα σε δομές εξωσωματίων, μπορεί να υποστούν γρήγορη διάσπαση όταν εκτίθενται σε ξένο περιβάλλον εκτός του φυσικού τους περιβάλλοντος (Helmerhorst & Oppenheim, 2007). Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι το σάλιο έχει έναν παχύρευστο χαρακτήρα και μπορεί να περιέχει κατόλπιτα τροφής ή άλλα σωματίδια, τα οποία μπορεί να αποτελούν πρόκληση κατά την ανάλυση των cfDNA, cfRNA ή των εξωσωμάτων. Ωστόσο, είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψη ότι τα εξωσώματα, καθώς είναι μεγαλύτερα από τις πρωτεΐνες, μπορεί να χαθούν απρόθυμα κατά τη διαδικασία φιλτραρίσματος (Hyun et al., 2018). Επιπλέον, ενώ τα ούρα ως βιολογικό υγρό είναι πολλά υποσχόμενα, η κατανόησή μας για το cfDNA των ούρων και τις μεθόδους επεξεργασίας τους παραμένει περιορισμένη. Το cfDNA που μπορεί να εντοπιστεί στα ούρα, αντίθετα από το cfDNA που προέρχεται από το αίμα, εμφανίζει μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής (Yao et al., 2016), λόγω αυξημένης δραστηριότητας των DNase I και II (Bryzgunova et al., 2015; Nadano et al., 1993). Είναι σημαντικό να ανασταλεί η λειτουργικότητα των DNases για να αποτραπεί η αποσύνθεση και να διατηρηθεί η ακεραιότητα του cfDNA που προέρχεται από τα ούρα. Μία αποτελεσματική προσέγγιση αποτελεί η προηγούμενη επεξεργασία των δειγμάτων των ούρων με EDTA και η αποθήκευσή τους στους -70 °C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες για μακροχρόνια διατήρηση. Τέλος, οι κυκλοφορούντες πρωτεΐνες, που συχνά μεταφέρονται από εξωσωμάτια και εξωκυττάρια κυστίδια, είναι συνήθως μεμβρανικοί υποδοχείς, σύμπλοκα υποδοχέων, παράγοντες ανάπτυξης ή κυτοκίνες (Kalluri & LeBleu, 2020). Ενώ πολλές μελέτες έχουν εντοπίσει με επιτυχία μια ποικιλία φορτίου πρωτεΐνης που υπάρχει σε εξωκυττάρια κυστίδια (EVs), που προέρχεται από κάποιο

γλοιοβλάστωμα (GB), η πλήρης και λεπτομερής κατανόηση του προφίλ των πρωτεϊνών που μεταφέρουν τα EVs εξερευνάτε ακόμη (Schey et al., 2015).

Κυκλοφορόντα κύτταρα του όγκου (CTCs)

Τα CTCs είναι κύτταρα που προέρχονται από έναν πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή (μεταστατικό) όγκο. Τα CTCs μπορεί να συμμετέχουν στη μεταστατική διαδικασία. Ωστόσο, η κυτταρική μετακίνηση είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και οι παθογενετικοί της μηχανισμοί πρέπει να διασαφηνιστούν πλήρως. Επίσης, παραμένει ασαφές εάν τα CTCs προέρχονται από κεντρικούς υποπληθυσμούς του όγκου ή αν αντιπροσωπεύουν το σύνολο του όγκου (Massagué & Obenauf, 2016). Αυτά τα κύτταρα εισέρχονται στη ροή των διαφόρων βιολογικών υγρών, όπως το αίμα, το ENY (κεντρικό νευρικό σύστημα) και τα ούρα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι, στην περίπτωση των εγκεφαλικών όγκων, τα CTCs συλλέγονται πιο εύκολα από το ENY παρά από το αίμα. Επιπλέον, η παρακέντηση δεξαμενής (Cisternal puncture) φαίνεται ότι παρέχει πιο ακριβή αποτελέσματα σε σύγκριση με την οσφυονωτιαία παρακέντηση, αν και η οσφυονωτιαία παρακέντηση φαίνεται να είναι λιγότερο επεμβατική και λιγότερο επικίνδυνη όσον αφορά τις πιθανές επιπλοκές από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Επίσης, πρέπει να σημειώσουμε ότι το ENY ανακυκλώνεται και ανταλλάσσεται πλήρως κάθε τρεις έως πέντε ημέρες (Sullivan et al., 2014). Συνεπώς, χρειάζεται να ανακαλυφθεί μία καθολικά αποδεκτή μέθοδος για την αναγνώριση και την συλλογή των CTCs (Perryman & Erler, 2014). Σε αυτό το πλαίσιο, είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι κυκλοφορούντα καλοήγη επιθηλιακά κύτταρα μπορεί επίσης να βρεθούν σε φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, το οποίο υποδεικνύει την ανάγκη για χαρακτηρισμό των μοριακών δοκιμών των CTCs (Pantel et al., 2012). Σε μια ευρεία γκάμα μελετών, φαίνεται ότι τα CTCs φαίνονται χρήσιμα ως δείκτες για την πρόγνωση διάφορων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα, το μελάνωμα κλπ. (Keup et al., 2018). Όσον αφορά τους όγκους εγκεφάλου, και ιδιαίτερα το GB, έχει δείξει ότι τα CTCs μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα των ασθενών σε ποσοστό 20% έως 40% (Gao et al., 2016; Krol et al., 2018).

Εξωκυττάρια κυστίδια/ Εξωσωμάτια (Extracellular Vesicles, EVs/Exosomes) και μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα (micro-ribonucleic acids, miRNAs)

Αρχικά, τα εξωσώματα θεωρούνταν ως απόβλητα των κυττάρων, αλλά τώρα γνωρίζουμε ότι λειτουργούν ως κυστίδια σήματος μεταξύ των κυττάρων και αποτελούν συντονιστές της κυτταρικής επικοινωνίας μέσω της μεταφοράς πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων (Théry, 2011). Η μεταφορά των εξωσωμάτων εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου-αποδέκτη και συμβαίνει κυρίως μέσω φαγο- ή ενδοκυττάρωσης (Christianson et al., 2013; Cocucci & Meldolesi, 2015). Τα εξωσώματα παίζουν κύριο ρόλο στην παθοφυσιολογία των ασθενειών, καθώς και στην κυτταρική ανάπτυξη, την ομοιοστάση και την ανοσοαντίδραση (De Toro et al., 2015; Skouras, Gargalionis, et al., 2023). Τα κύτταρα του όγκου εκπέμπουν έναν υψηλό αριθμό εξωσωμάτων στον εξωκυτταρικό χώρο, τα περισσότερα από τα οποία είναι δομημένα από λειτουργικά βιομόρια (Romano et al., 2020). Σε αυτό το πλαίσιο, τα εξωσώματα ερευνήθηκαν αρχικά ως μη-κυτταρικά θεραπευτικά αντιγόνα για την ανάπτυξη εμβολίων κατά των όγκων ή των μολυσματικών ασθενειών (André et al., 2002; Chaput et al., 2004). Ωστόσο, τα εξωσώματα μπορεί επίσης να περιλαμβάνουν miRNAs και άλλες ενώσεις που μπορούν να αντικατοπτρίσουν την πρόοδο διάφορων ασθενειών του εγκεφάλου, και κατ' επέκταση ότι τα εξωσωμάτια μπορούν να χρησιμεύσουν ως αντιπροσωπευτικά εργαλεία για το μοριακό προφίλ του αντίστοιχου όγκου (M. Shi et al., 2019; Skouras, Gargalionis, et al., 2023). Οι κύριοι αναλύτες που μπορούν να απομονωθούν μέσω της υγρής βιοψίας και οι τεχνικές απομόνωσής τους MS PCR—methylation-specific PCR; NGS—next generation sequencing; TAS—targeted analysis sequencing; WES—whole exome sequencing; WGS—whole genome sequencing, ddPCR—droplet digital PCR; MAF—mutant allelic frequency; EpCAM—epithelial cell adhesion molecule; FISH—fluorescence in situ hybridization; qPCR—quantitative polymerase chain reaction.

Βιοδείκτες που εντοπίζονται μέσω της ανάλυσης της Υγρής Βιοψίας για την διάγνωση των Γλοιωμάτων

Η δυνατότητα της υγρής βιοψίας να αναλύει παράγωγα του όγκου που βρίσκονται στα διάφορα σωματικά υγρά έχει οδηγήσει στην αυξανόμενη χρήση της σε διάφορους τύπους όγκων. Αυτή η τεχνική παρέχει ζωτικής σημασίας διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες, καθώς και αναγνώριση της κατάστασης του όγκου σε πραγματικό χρόνο. Στην περίπτωση των γλοιωμάτων, η χρήση της υγρής βιοψίας είναι εξαιρετικά υποσχόμενη (Jones et al., 2021). Παρακάτω, αναλύονται οι επιπλέον cfDNA βιοδείκτες, που ανιχνεύονται σε διάφορες μελέτες ανάλυσης υγρής βιοψίας για τη διάγνωση των γλοιωμάτων.

cfDNA, cfRNA, και Κυκλοφορόντες πρωτεΐνες στην διάγνωση των Γλοιωμάτων

cfDNA

Η ΥΒ έχει επιτρέψει τον εντοπισμό του cfDNA σε ασθενείς με όγκους εγκεφάλου, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, δημιουργώντας τη δυνατότητα να ενσωματωθεί στην κλινική πράξη, με στόχο τον εντοπισμό τόσο γενετικών όσο και επιγενετικών αλλαγών στους όγκους. Το cfDNA μπορεί να αποτελέσει κατάλληλο βιοδείκτη, που υποδεικνύει την κατάσταση του όγκου, προκειμένου

να διευκολύνει την παρακολούθηση της νόσου και τη διάκριση μεταξύ ατόμων χωρίς όγκο και ασθενών με όγκους εγκεφάλου (Faria et al., 2018). Μια μελέτη επέδειξε ότι ο ορός των υγιών μαρτύρων χαρακτηρίζεται συνεχώς από χαμηλά επίπεδα cfDNA, αντίθετα με τους ασθενείς με γλοιώμα που είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις cfDNA. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει ότι το cfDNA θα μπορούσε να λειτουργήσει ως χρήσιμος βιοδείκτης για τη διάκριση των ασθενών με γλοιώματα από τα υγιή άτομα αλλά να χρησιμοποιηθεί και ως ένδειξη για την πρόοδο του όγκου (Roth et al., 2011). Το cfDNA μπορεί επίσης να βοηθήσει στην ποσοτική μέτρηση γενετικών (π.χ., μεταλλάξεις του γονιδίου IDH) ή επιγενετικών αλλαγών (μεθυλίωση του γονιδίου MGMT) (Faria et al., 2018; Mathios & Phallen, 2022). Στο cfDNA που προέρχεται από ασθενείς με γλοιώμα, υπάρχουν διάφορα γονίδια και επιγενετικές αλλαγές που μπορούν να ανιχνευθούν και να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση και παρακολούθηση της νόσου. Ένα εξαιρετικό παράδειγμα είναι η μετάλλαξη H3K27M χαρακτηριστική των διάχυτων διηθητικών γλοιωμάτων γέφυρας [Diffuse midline gliomas (DMGs)]. Στη μελέτη της Daphne Li και των συνεργατών της, το cfDNA απομονώθηκε από δύο τύπους δειγμάτων: ένας τύπος με μετάλλαξη H3.3K27M και ο άλλος τύπος H3 wildtype (H3WT). Τα δείγματα περιλάμβαναν ιστούς όγκου H3.3K27M (τέσσερα δείγματα), ENY (έξι δείγματα), πλάσμα (τέσσερα δείγματα) και ανθρώπινα πρωτογενή παιδιατρικά κύτταρα γλοιωμάτων. Οι ερευνητές παρατήρησαν ευαισθησία και ειδικότητα 100% στην ανίχνευση μεταλλάξεων τόσο στους αντίστοιχους ιστούς DMG όσο και στα δείγματα του ENY (D. Li et al., 2021). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η μετάλλαξη H3K27M ανιχνεύθηκε στο ENY και το πλάσμα στο 88% των ασθενών με DMG. Μεταξύ των δύο, το ENY εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση ctDNA (Panditharatna et al., 2018). Η γενική μεθυλίωση του DNA (global DNA methylation) μέσω της μεθυλίωσης του μεταθετού στοιχείου LINE-1 (L1) παίζει καθοριστικό ρόλο όσον αφορά τις επιγενετικές αλλαγές στα κύτταρα ενός γλοιώματος, επιτρέποντας τη διάγνωση μέσω της ανάλυσης του cfDNA. Η προσθήκη μιας μεθυλομάδας στην κυτοσίνη, προκαλεί τον σχηματισμό 5 μεθυλοκυτοσίνης, ο οποίος αποτελεί τον πιο γνωστό μηχανισμό τροποποίησης του DNA μέσω επιγενετικών διεργασιών, και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την πρόοδο των όγκων και, ειδικότερα, των γλοιωμάτων (Lander et al., 2001; Markouli et al., 2021). Η ανεπάρκεια ρύθμισης των κυττάρων σε συστημικό επίπεδο, συχνά συνδέεται με την ανάπτυξη όγκων, μπορεί να προκύψει είτε από υπομεθυλίωση του DNA είτε από αυξημένη δραστηριότητα των LINE-1 τρανσποζιονίων (transposons) (Pfeifer, 2018). Η πλειοψηφία των φαινομένων αντιμεταθέσεων που συμβαίνουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα πραγματοποιούνται από non-LTR (long-terminal repeat) ρετροτρανσποζόνια (retrotransposons), με τα LINEs (long interspersed elements) να είναι τα πιο κυρίαρχα. Από όλα τα LINEs, το LINE-1 αποτελεί περίπου ένα έκτο της γενωμικής αντιμετάθεσης (genomic transposition) και μπορεί να ανευρεθεί σε πολλαπλά αντίγραφα σε ελεύθερα κύτταρα, σε δείγματα αίματος. Λόγω της αφθονίας του και των μοναδικών χαρακτηριστικών του, όπως η κατάσταση μεθυλίωσης, το LINE-1 έχει τη δυνατότητα να λειτουργήσει ως πολύτιμος επιγενετικός βιοδείκτης για τον εντοπισμό νεοπλασιών σε δείγματα υγρής βιοψίας (Lander et al., 2001). Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στην ανίχνευση των φαινομένων αντιμετάθεσης (retrotransposition) του LINE-1 σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως στα NPCs κύτταρα (neural precursor cells) που προέρχονται τόσο από ανθρώπινα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) όσο και από εμβρυικά εγκεφαλικά βλαστικά κύτταρα. Μελέτες με φαινόμενα αντιμετάθεσης που πραγματοποιήθηκαν σε αυτούς τους τύπους κυττάρων επιβεβαίωσαν την ύπαρξη δραστηριότητας του LINE-1 και στις δύο συνθήκες (Coufal et al., 2009). Επιπλέον, η ανάλυση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) ανέδειξε ένα σημαντικό αυξημένο αριθμό αντιγράφων του LINE-1 ORF2 σε πολλές περιοχές δειγμάτων υγιούς ενήλικου ανθρώπινου εγκεφάλου, υποδεικνύοντας την παρουσία δραστηριότητας του LINE-1 μέσα στον εγκέφαλο. Η χρήση της RC-Seq (retrotransposon capture sequencing) επέτρεψε επίσης στους ερευνητές να εντοπίσουν σωματικές LINE-1 επιδράσεις σε γονίδια κωδικοποίησης πρωτεϊνών με διαφορετική έκφραση και ήταν ενεργά εντός του εγκεφάλου (Baillie et al., 2011). Μια μελέτη αξιολόγησε τα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 μέσω της ποσοτικής bisulfite pyrosequencing τεσσάρων CpG τοποθεσιών σε υγιή δείγματα εγκεφάλου, καθώς και σε κατεψυγμένους ιστούς όγκων όπως αστροκυτώματα βαθμού 2/3, πρωτοπαθές/δευτεροπαθές GB και ολιγοδενδρογλοιώματα βαθμού 2/3. Παρατηρήθηκε ένα σχετικά υψηλότερο επίπεδο μεθυλίωσης του LINE-1 σε δείγματα αστροκυτώματος, ολιγοδενδρογλοιώματος και ολιγοαστροκυτώματος, ενώ τα δείγματα του γλοιωβλαστώματος έδειξαν τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα στα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 και τα χαμηλότερα σκορ του LINE-1 (υποδεικνύοντας γενική (global) υπομεθυλίωση) σε σύγκριση με άλλους υποτύπους. Επιπλέον, τα γλοιώματα που ταξινομήθηκαν ως έχοντα κλάση 1 πρότυπο μεθυλίωσης γονιδίων εμφάνισαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 (Zheng et al., 2011). Επίσης, τα δείγματα φυσιολογικού εγκεφαλικού ιστού και οι ιστοί χαμηλού βαθμού γλοιωμάτων, εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 σε σύγκριση με τα πρωτοπαθή/δευτεροπαθή γλοιοβλαστώματα καθώς και η αυξημένη δραστηριότητα μεθυλίωσης του LINE-1 λειτούργησε ως θετικός προγνωστικός δείκτης στα πρωτοπαθή γλοιοβλαστώματα. Τέλος, η μεθυλίωση του LINE-1 διαπιστώθηκε να υπάρχει σε όλα τα δείγματα, συμπεριλαμβανομένων υγιούς εγκεφαλικού ιστού, χαμηλόβαθμων γλοιωμάτων και πρωτοπαθών/δευτεροπαθών γλοιοβλαστωμάτων (Ohka et al., 2011) γεγονός που υποδεικνύει ότι το LINE-1 παίζει ρόλο στη διάγνωση και/ή την πρόγνωση των γλοιωμάτων. Σε μία άλλη μελέτη του Sabedot και των συν ερευνητών του, χρησιμοποίησαν genome-wide DNA methylation profiling σε πανομοιότυπα γονιδιώματα για τον εντοπισμό μοναδικών μοτίβων μεθυλίωσης σε ιστολογικό υλικό και cfDNA από γλοιώματα ασθενών. Χρησιμοποίησαν ένα μετρήσιμο σύστημα βαθμολόγησης και ονομάσανε GeLB (glioma epigenetic liquid biopsy score), για να αξιολογήσουν την μεθυλίωση του cfDNA και να διαγνώσουν την νόσο. Αυτή η μη επεμβατική τεχνική αποκάλυψε μια δραστηριότητα μεθυλίωσης του cfDNA που σχετίζεται με την παρουσία γλοιώματος και κάποιων ανοσοτροποποιήσεων. Ανεξάρτητες δοκιμές σε συγκριτικές ομάδες (Independent cohort testing) επιβεβαίωσαν το GeLB ως ένα υψηλά αποτελεσματικό εργαλείο, με 100% ευαισθησία και

97,78% ειδικότητα για τον διαχωρισμό ασθενών σε γλοιώμα-θετικών ή γλοιώμα-αρνητικών. Οι αλλαγές στη βαθμολογία GeLB κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης αντικατοπτρίζουν τις κλινικοπαθολογικές συνθήκες και τις επιδράσεις της θεραπείας στην νόσο, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα του εργαλείου αυτού για τη διάγνωση και την παρακολούθηση ασθενών με γλοιώματα (Sabadot et al., 2021). Επιπλέον, ο Nassiri και οι συνεργάτες του, ανέδειξαν ότι τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA στο πλάσμα, εμφάνιζαν χαρακτηριστικά τοπότητα, ικανά να ανιχνεύουν και να διακρίνουν με ακρίβεια μεταξύ κοινών πρωτοπαθών ενδοκράνιων όγκων. Αυτοί οι όγκοι συχνά μοιράζονταν γενεές κυττάρων-καταγωγής (cell-of-origin lineages), κάτι το οποίο αποτελεί πρόκληση για να μπορεί να γίνει διάκριση χρησιμοποιώντας τις κανονικές μεθόδους απεικόνισης. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια τεχνική που ονομάζεται cfMeDIP-seq (cell-free methylated DNA immunoprecipitation and high-throughput sequencing) για να ανιχνεύσουν με επιτυχία cfDNA προερχόμενο από όγκους εγκεφάλου (Nassiri et al., 2020). Σε μια άλλη μελέτη, που πραγματοποιήθηκε από τους Martínez-Ricarte και συνεργάτες τους, αναλύθηκε το γονιδίωμα ασθενών με DMG. Η ανάλυση αυτή περιλάμβανε την εξέταση μεταλλάξεων σε επτά γονίδια: IDH1, IDH2, TP53, TERT, ATRX, H3F3A, και HIST1H3B. Η μελέτη ανέλυσε το cfDNA που προερχόταν από το ENY και οι ερευνητές έθεσαν με επιτυχία την διάγνωση του DMG, προσφέροντας έτσι πολύτιμη βοήθεια σε κλινικές και χειρουργικές θεραπευτικές αποφάσεις (Martínez-Ricarte et al., 2018). Μια επιπλέον μελέτη υπογράμμισε τη σημασία της υγρής βιοψίας στην διάγνωση και την παρακολούθηση του εξελισσόμενου μοριακού τοπίου των όγκων κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Η μελέτη είχε ως στόχο τον εντοπισμό μεταλλάξεων στον εκκινητή (promoter) TERT (C228T και C250T), στο cfDNA των ασθενών με γλοιώματα, παρέχοντας στοιχεία για τις πρακτικές εφαρμογές της ανίχνευσης των κυκλοφορούντων μεταλλάξεων εκκινητή TERT στο cfDNA σε ασθενείς με γλοιώματα, επιδεικνύοντας κλινικά σημαντική ευαισθησία και ειδικότητα (Muralidharan et al., 2021). Η μελέτη του Husain και των συνεργατών του εξέτασε τα επίπεδα προ ακτινοθεραπείας του cfDNA χρησιμοποιώντας αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS, Next generation sequencing) και συνέκριναν τα αποτελέσματα με ανοσοιστοχημική (IHC) ανάλυση, εμφανίζοντας υψηλό βαθμό αντιστοιχίας. Αυτή η προσέγγιση μπορεί να αποδειχθεί ωφέλιμη σε περιπτώσεις όπου η χειρουργική επέμβαση δεν είναι δυνατή ή σε περιπτώσεις υποτροπής ενός διάχυτου διηθητικού γλοιώματος (Husain et al., 2022). Τέλος, στη μελέτη του Palande και των συνεργατών του εντοπίστηκαν μεταλλάξεις γονιδίων και συγχωνεύσεις (gene-gene fusions) γονιδίων στο cfDNA ασθενών με GB. Αυτή η μελέτη χρησιμοποίησε τη βάση δεδομένων ChiTaRS (chimeric transcript repository) 5.0 για τον εντοπισμό συγχωνεύσεων γονιδίων σε δείγματα cfDNA. Βρέθηκαν συγχωνεύσεις που εμπλέκουν το PDGFRA σε 44% των δειγμάτων GB, τα οποία μπορούν να στοχευτούν αποτελεσματικά με τη χρήση αναστολέων τυροσινικής κινάσης. Άλλες συγχωνεύσεις γονιδίων, όπως BCR-ABL1, COL1A1-PDGFB, NIN-PDGFRB και FGFR1-BCR, εντοπίστηκαν επίσης σε cfDNA που θα μπορούσαν να στοχευτούν με ανάλογα του imatinib. Επιπλέον, εντοπίστηκαν συγχωνεύσεις ROS1 σε 8% των δειγμάτων cfDNA και θα μπορούσαν πιθανώς να στοχευτούν επίσης με τα συγκεκριμένα φάρμακα (Palande et al., 2022).

cfRNA

Όσον αφορά τα cfRNAs και τη χρήση τους στα γλοιώματα, ο Dong και οι συνεργάτες τους ανακάλυψαν ότι ο ορός ασθενών με GB εμφάνισε σημαντική μείωση σε 24 miRNAs και σημαντική αύξηση σε 115 miRNAs, πράγμα που δεν παρατηρήθηκε στον ορό των υγιών μαρτύρων (Dong et al., 2014). Επιπλέον, ο Wang και οι συνεργάτες του εντόπισαν τρία miRNAs που ήταν υπορυθμισμένα, συγκεκριμένα τα miR-128, miR-485-3p και miR-342 3p, σε ασθενείς, σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Αυτά τα miRNAs έδειξαν συσχέτιση με τους βαθμούς του GB και χρησιμοποιήθηκαν ως βιοδείκτες για τον προσδιορισμό του βαθμού του όγκου και την παρακολούθηση στην ανταπόκριση της θεραπείας (Q. Wang et al., 2012). Το miRNA-21 είναι το πιο εκτενώς μελετημένο miRNA στον καρκίνο και η υπερέκφραση του παρατηρείται τόσο στον ιστό όσο και στο πλάσμα των ασθενών με GB. Αυτή η υψηλή έκφραση συνδέεται στενά με χαμηλότερα ποσοστά συνολικής επιβίωσης και υψηλότερο βαθμό κακοήθειας (Wu et al., 2013). Το miR-21 λειτουργεί ως αντι-αποπτωτικός παράγοντας σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος εκτελώντας τα αποτελέσματά του μέσω της αναστολής της κασπάσης. Η καταστολή της δραστηριότητας του miR-21 επομένως εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων, ενισχύει την αποπτωτική διαδικασία και μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων GB (Ilhan-Mutlu et al., 2012; Wu et al., 2013). Αξίζει να σημειωθεί μια μελέτη που εντόπισε το TP73-AS1 ως κλινικά σημαντικό lncRNA στο GB. Οι ερευνητές παρατήρησαν μια σημαντική υπερέκφραση του TP73-AS1 σε πρωτοπαθή δείγματα GB. Παρείχαν αποδείξεις ότι το TP73-AS1 λειτουργεί ως αξιόπιστος προγνωστικός βιοδείκτης, καθώς αυτό το lncRNA προάγει την επιθετικότητα του όγκου και παρέχει αντίσταση στη θεραπεία με TMZ στα κύτταρα του GB (Mazor et al., 2019). Στη μελέτη του Shen και των συνεργατών του, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του μακρο-μη κωδικοποιητικού RNA HOTAIR (HOX transcript antisense intergenic RNA) και μειωμένα επίπεδα του GAS5 στον ορό των ασθενών με γλοιοβλάστωμα. Αυτά τα μοτίβα έκφρασης συνδέονταν με μειωμένη πιθανότητα επιβίωσης 2 ετών (Shen et al., 2018). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι η μεταφορά του μακρο-μη κωδικοποιητικού RNA HOTAIR μέσω εξωσωμάτων στον ορό εμφανίζει ελπιδοφόρα διαγνωστική αξία στο GB (Yuan et al., 2020).

Κυκλοφορούντες πρωτεΐνες

Λαμβάνοντας υπόψιν την εντυπωσιακή ετερογένεια των ασθενών και της νόσου, καθώς και την ευρεία εμπλοκή των πρωτεϊνών σε πολλές διαδικασίες, είναι δύσκολο να βρεθούν διαγνωστικοί δείκτες πλάσματος/ορού για το γλοιοβλάστωμα με επαρκή

κλινική αξία. Ωστόσο, η εκτενής έρευνα έχει εντοπίσει τα επίπεδα πολλών κυκλοφορούντων πρωτεϊνών να συσχετίζονται με την παρουσία του γλοιοβλαστώματος. Ένα παράδειγμα είναι η πλασματική γλυκοπρωτεΐνη (haptoglobin), η οποία αποτελεί πρωτεΐνη οξείας φάσης που συμμετέχει στην προστασία των ιστών από το οξειδωτικό στρες (Naryzhny et al., 2021). Τα επίπεδα της απτοσφαιρίνης (haptoglobin) μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια παθολογιών, αν και η μονομερής εκτίμησή της ενδέχεται να μην είναι επαρκώς ειδική και ευαίσθητη, έχουν ανιχνευθεί πολλαπλές πρωτεΐνες της (α_2 και β -αλυσίδα) που εκφράζονται αυξημένα στο πλάσμα των ασθενών με γλοιοβλάστωμα, υποδεικνύοντας τη δυνητική της χρήση ως βιοδείκτης του αίματος που είναι ειδικός για το γλοιοβλάστωμα (Naryzhny et al., 2021). Επιπλέον, μια ποσοτική πρωτεομική ανάλυση έδειξε ότι πολλές πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως η CNDP1 που ρυθμίζει τα επίπεδα καρνοσίνης, ο φλεγμονώδης δείκτης φερριτίνης ελαφράς αλυσίδας (FTL) και η πρωτεΐνη σήματος Ca^{2+} S100A9, βρέθηκαν να είναι τροποποιημένες στους ιστούς του γλοιοβλαστώματος, με την CNDP1 να προτείνεται ως δυνητικός στόχος φαρμάκου. Αυτό επιβεβαιώνει ότι οι εξετάσεις βάσει πλάσματος για την αρχική διάγνωση ή την παρακολούθηση πιθανής υποτροπής της νόσου, μπορούν να είναι εξαιρετικά χρήσιμες για την νόσο (Bellia et al., 2014; Gautam et al., 2012). Επιπλέον, στη μελέτη του Pérez-Larraya και των συνεργατών του, πραγματοποιήθηκε μια ολοκληρωμένη ανάλυση των επιπέδων της IGFBP-2, της πρωτεΐνης (IF) III GFAP και της γλυκοπρωτεΐνης YKL-40 στο πλάσμα, ως επιπλέον εργαλείο διάγνωσης και πρόγνωσης. Αυτή η προσέγγιση είναι πολλά υποσχόμενη, ιδιαίτερα για ασθενείς με μη χειρουργήσιμες βλάβες (Gállego Pérez-Larraya et al., 2014). Επίσης, αποκαλύφθηκε η παρουσία αντισωμάτων φετουίνης-A, μιας γλυκοπρωτεΐνης που λειτουργεί ως δείκτης εξέλιξης της νόσου του γλοιοβλαστώματος. Έχει προταθεί ότι έκτοπα επίπεδα της φετουίνης-A μπορούν να παίξουν ρόλο στην πρόοδο του γλοιοβλαστώματος. Επομένως, προτάθηκε η αξιολόγηση των αυτοαντισωμάτων φετουίνης-A στον ορό των ασθενών με γλοιοβλάστωμα να λειτουργεί πιθανώς ως εργαλείο screening, καθιστώντας την ως έναν από τους πιο πρώιμους ενδεικτικούς δείκτες για την ανάπτυξη της νόσου (Ochieng et al., 2018). Ο Naryzhny και συνεργάτες είχαν ως στόχο την εντοπισμό κοινών πρωτεϊνών σε εξωσώματα σε διάφορες κυτταρικές σειρές και την έρευνα πιθανών βιοδεικτών για το γλοιοβλάστωμα. Μέσω πρωτεομικής ανάλυσης των εξωσωμάτων, εντόπισαν 133 πρωτεΐνες, όπως η πυρουβική κινάση PKM [pyruvate kinase PKM (KPYM)], η αννεξίνη A1 [annexin 37 A1 (ANXA1)], η μεταβατική ενδοπλασματική ATPase [transitional endoplasmic reticulum ATPase (TERA)], η αλφα-ενολάση [alpha-enolase (ENO)], η νουκλεοφοσμίνη [nucleophosmin (NPM)] και η κοφιλίνη [cofilin (COF1)], οι οποίες βρέθηκαν σε όλα τα δείγματα. Η μελέτη ανέδειξε μία συσχέτιση μεταξύ ορισμένων πρωτεϊνών που υπερεκφράζονταν σε κύτταρα της γλοίας και της ανίχνευσής τους σε εξωσώματα, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη πολλαπλών δυνητικών πρωτεϊνικών βιοδεικτών σε εξωσώματα γλοιοβλαστώματος (Naryzhny et al., 2020). Μια άλλη έρευνα που περιλάμβανε τη φασματομετρία μάζας SWATH και την πρωτεομική αναλυτική προσέγγιση με στόχο την απόλυτη ποσοτική πρωτεομική προσέγγιση, μελετήθηκαν ασθενείς με γλοιοβλάστωμα και υγιείς μάρτυρες. Τα ευρήματα αποκάλυψαν σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων της λευκίνης-πλούσιας αλφα-2-γλυκοπρωτεΐνης [leucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG1)], του συμπληρωματικού στοιχείου C9 και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης [C-reactive protein (CRP)] και του μεγέθους του όγκου (Miyauchi et al., 2018). Σε μια μετα-ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τον Qin και τους συνεργάτες του, ανακαλύφθηκε μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της υψηλής έκφρασης της YKL-40 και της μη ικανοποιητικής συνολικής επιβίωσης μεταξύ ασθενών με γλοιοβλάστωμα, θέτοντας την YKL-40 ως έναν υποσχόμενο προγνωστικό βιοδείκτη για την νόσο (Qin et al., 2017).

Τα CTCs στην διάγνωση των Γλοιωμάτων

Πολλές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει το σημαντικό ρόλο των κυκλοφορούντων κυττάρων του όγκου (CTCs) σε όγκους του ΚΝΣ. Τα CTCs παρέχουν ένα λιγότερο επεμβατικό τρόπο λήψης δειγμάτων όγκου· ορισμένα είδη CTC μπορεί να υποδεικνύουν την πρόοδο του πρωτοπαθούς όγκου και τις αλλαγές στην κακοήγη γενετική πληροφορία κατά την υποτροπή της νόσου. Έχει αναφερθεί ότι τα CTCs του γλοιοβλαστώματος εμφανίζουν υψηλό επιπολασμό, που εκτιμάται να είναι περίπου 75% (Müller et al., 2014). Οι συγκεντρώσεις των CTC έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διάφορων παθήσεων. Σύμφωνα με τον Santos και άλλων συνεργατών του, τα CTCs παρουσιάζουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα στον πρόωρο εντοπισμό του καρκίνου του παχέος εντέρου, καθώς μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα των ασθενών που πρόσφατα έχουν αναπτύξει τη νόσο. Ως εκ τούτου, η ανίχνευση των CTC θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τον διάγνωση του καρκίνου του παχέος εντέρου (Sastre et al., 2008). Όσον αφορά τα γλοιώματα, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός μπορεί να περιορίσει τον αριθμό των CTCs που βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος. Παρόλα αυτά, έχουν εντοπιστεί κυκλοφορούντα κύτταρα στο αίμα των ασθενών με γλοίωμα και αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει τον εντοπισμό των CTCs στο αίμα των ασθενών με γλοίωμα μέσω της χρήσης διάφορων τεχνικών απομόνωσης. Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CTC-iChip για τον εμπλουτισμό των CTCs και τον χρωματισμό τους με αντισώματα όπως το SOX2, το EGFR, η tubulin b-3, το c-MET και το A2B5, ο Sullivan και άλλοι εντόπισαν CTCs στο αίμα ασθενών με γλοίωμα σε συχνότητα 39%. Ανακάλυψαν επίσης ότι τα CTCs εμφανίζουν ένα μεσεγχυματικό μοριακό χαρακτηριστικό (Sullivan et al., 2014). Ο Muller κ.ά. πραγματοποίησαν μια μελέτη όπου χρησιμοποίησαν κλίμακες Ficoll-Paque μέσω διαφορικής φυγοκέντρισης, ακολουθούμενες από GFAP χρωματισμό, προκειμένου να εντοπίσουν το 20,6% των CTCs (Sastre et al., 2008). Επιπλέον, ο Gao και οι συνεργάτες του κατέδειξαν ότι τα CTCs ανευρίσκονταν σε 77% των δειγμάτων αίματος από ασθενείς με όγκο εγκεφάλου και σε 82% των ασθενών με GB (Gao et al., 2016). Μια ενδιαφέρουσα μελέτη από τον MacArthur και συνεργάτες έδειξε ότι τα CTCs θα μπορούσαν επίσης να λειτουργήσουν ως προγνωστικός παράγοντας.

Χρησιμοποιώντας γραμμικής πυκνότητας φυγοκέντρωση (density gradient centrifugation), απομονώθηκαν CTCs και αναλύθηκε η δραστηριότητα του ενζύμου τελομεράσης σε ασθενείς με όγκο εγκεφάλου. Η μελέτη απέδειξε ότι πριν τη θεραπεία με ακτινοθεραπεία, τα CTCs απομονώθηκαν σε 72% των ασθενών έναντι μόλις 8% μετά τη θεραπεία (Macarthur et al., 2014). Επιπλέον, τα αντι-γλοιοματικά απταμερή (aptamers) Gli-233 και Gli-55 έχουν χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό των CTCs σε υγρές βιοψίες με σκοπό την αύξηση της διαγνωστικής ειδικότητας (Kichkailo et al., 2023). Τα απταμερή είναι μόρια νουκλεϊκών οξέων που συνδέονται αποκλειστικά με τους στόχους τους, όπως πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον όγκο, με υψηλή συγγένεια και εκλεκτικότητα (Ni et al., n.d.). Έτσι, έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί σε biosensing, βιορύθμιση (bioregulation) και βιοαπεικόνιση (bioimaging) ως αξιόπιστα σύμπλοκα αναγνώρισης (Song et al., 2019, p. 20). Επιπλέον, ο Kichkailo και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα απταμερή μπορούν να συνδέονται ειδικά με τα κύτταρα της γλοίας για τον εντοπισμό όγκων στο ΚΝΣ (Kichkailo et al., 2023). Παρόλο που απαιτείται περισσότερη έρευνα για να αναδειχθεί η πλήρης δυναμική των CTCs στη διάγνωση των γλοιομάτων και του GB, η χρήση τους ως προγνωστικοί παράγοντες για τα γλοιώματα είναι πολύ ελπιδοφόρα.

Τα Εξωσώματα στην διάγνωση των Γλοιομάτων

Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων του GB είναι η ικανότητά τους να χρησιμοποιούν τα invadopodia, μέσω των οποίων είναι σε θέση να εισβάλλουν σε γειτονικά κύτταρα, ειδικότερα σε αστροκύτταρα. Τα invadopodia είναι επεκτάσεις προερχόμενες από την κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου του GB, που προσκολλώνται σε γειτονικούς ιστούς και προάγουν την πρωτεολυτική αποσύνθεση του κυτταροσκελετού, επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω διήθηση (Gourlay et al., 2017; Mallawaarachy et al., 2017). Πολλές πρωτεΐνες που εκκρίνονται από τα εξωσώματα του GB, παίζουν ρόλο στον σχηματισμό των invadopodia, μεταξύ των οποίων η ANXA1, η πρωτεΐνη σχετιζόμενη με την ακτίνη 3 [actin related protein 3 (ACTR3)], η integrin β1 (ITGB1), η καλρετικουλίνη [calreticulin (CALR)] και η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον προγραμματισμένο κύτταρο θανάτου 6 [programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6IP)] (Mallawaarachy et al., 2017). Οι Hallal και συνεργάτες παρατήρησαν επίσης τον σχηματισμό ποδοσωμάτων σε αστροκύτταρα και την αποσύνθεση του πλέγματος μετά την αλληλεπίδρασή τους με εξωσώματα που προέρχονταν από GB κύτταρα, μία διαδικασία που φαίνεται να υποστηρίζεται από τη μείωση των επιπέδων p53. Έτσι, τα εξωσώματα αποκτούν καρκινογόνο χαρακτήρα και προάγουν τα γειτονικά αστροκύτταρα σε ογκογένεση (H Rashed et al., 2017). Σε αυτό το πλαίσιο, τα εξωσώματα GB μπορούν να ανιχνευθούν τόσο στο αίμα όσο και στο ENY με χρήση της της υγρής βιοψίας. Αυξημένος αριθμός εξωσωμάτων που προέρχονται από έναν όγκο μπορούν να βρεθούν στο ENY. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το ENY δεν είναι μολυσμένο με εξωσώματα που σχετίζονται με το αίμα, όπως για παράδειγμα, εξωσώματα που προέρχονται από τα αιμοπετάλια του αίματος. Ωστόσο, από την άλλη πλευρά, τα δείγματα αίματος συλλέγονται πιο εύκολα και λιγότερο επεμβατικά σε σύγκριση με το ENY (Gourlay et al., 2017; Klekner et al., 2019). Επιπλέον, ο Shao και άλλοι περιέγραψαν πώς ένα σύστημα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού μπορεί να ανιχνεύσει μικροκυστίδια που εκκρίνονται από τον όγκο στο αίμα (Shao et al., 2012). Έρευνες έχουν δείξει ότι μόρια που μεταφέρονται από εξωσώματα μπορεί να προωθήσουν την ανάπτυξη του όγκου και την αντίσταση στη θεραπεία μέσω του σχηματισμού ενός φιλικού προς τον όγκο μικροπεριβάλλοντος. Συνεπώς, τα εξωσώματα έχουν προταθεί ως υποσχόμενα εργαλεία στη διάγνωση και την πρόγνωση ενός γλοιοβλαστώματος, δίνοντας τη δυνατότητα να χαρακτηριστεί ο όγκος με μεγαλύτερη ακρίβεια (Gatto et al., 2021; Whitehead et al., 2019). Παρά το γεγονός ότι λειτουργούν ως φορείς πολλών τύπων miRNA, συμπεριλαμβανομένων των miR-21/-29a/-221/-222, κ.ά., όπως αποδεικνύεται σε αρκετές μελέτες (in vitro και αναλύσεις microarray) τα εξωσώματα παίζουν επίσης καίριο ρόλο στην ενίσχυση του πολλαπλασιασμού και της αναστολής της απόπτωσης των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος (Quezada et al., 2018; Skouras, Gargalionis, et al., 2023). Μπορούν, επομένως, να χρησιμοποιηθούν ως υποσχόμενα μέσα παράδοσης για miRNA που καταπολεμούν τον όγκο και στοχεύουν τα γλοιώματα (Hagiwara et al., 2014). Περίπου 1000 πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί στα GB εξωσώματα χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία μάζας: συνήθως λειτουργούν ως προ-αγγειογόνοι παράγοντες σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου, όπως η αγγειογενίνη, IL-6/-8 και τα TIMP-1 και TIMP-2, τα οποία είναι ικανά να ενισχύσουν την κακοήθεια προκαλώντας υποξία (Jaiswal & Sedger, 2019; Skog et al., 2008). Τα εξωσώματα μπορεί επίσης να μεταφέρουν υποδοχείς με χαρακτηριστικά ογκογένεσης, όπως ο EGFRvIII, ο HER2, και ο PDGFR, οι οποίοι προωθούν την πολλαπλασιαστικότητα του γλοιοβλαστώματος προς τα υγιή στρωματικά κύτταρα (Skog et al., 2008). Επιπλέον, τα εξωσώματα μεταφέρουν PTEN, το οποίο βρίσκεται στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα και η απουσία του συνδέεται με την ογκογένεση (Putz et al., 2012). Η πρωτεΐνη Ndfip1 παίζει κυρίαρχο ρόλο στην εσωτερικοποίηση (ενδοκύττωση) των εξωσωμάτων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Ndfip1 είναι κατεσταλμένη στα γλοιοβλαστώματα. Συνεπώς, η ενδοπυρηνική συγκέντρωση του PTEN μειώνεται, επιτρέποντας στα κύτταρα του όγκου να πολλαπλασιαστούν και να επιβιώσουν (Putz et al., 2012).

Συνδυασμός Ακτινογενωμικής και Υγρής Βιοψίας για την διάγνωση των Γλοιομάτων

Η ακτινογενωμική είναι ένα πεδίο που ενσωματώνει μεγάλο αριθμό ποσοτικών δεδομένων που προέρχονται από ιατρικές εικόνες με το γενωμικό φαινότυπο ενός ατόμου και χρησιμοποιεί τεχνικές deep learning για την ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης. Αυτό το μοντέλο είναι χρήσιμο για την ταξινόμηση των ασθενών, την καθοδήγηση θεραπευτικών στρατηγικών και την αξιολόγηση κλινικών αποτελεσμάτων (Shui et al., 2021). Η συνδυασμένη χρήση της υγρής βιοψίας και της ακτινογενωμικής

μπορεί να προσφέρει μια ελπιδοφόρα προοπτική για τη μη επεμβατική διάγνωση ασθενειών και να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τον σχεδιασμό της θεραπείας. Και οι δύο προσεγγίσεις έχουν ξεχωριστά μεγάλη δυναμική, αλλά ο συνδυασμός τους μπορεί να οδηγήσει σε ακόμη πιο ακριβείς και εμπεριστατωμένες διαγνώσεις. Η μελέτη εικόνων με χρήση της τεχνητής νοημοσύνης (AI) και βαθιάς μηχανικής μάθησης (machine και deep learning), έχει εξελιχθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν μια όλο και πιο πολύπλοκη ανάλυση υπολογιστικών διεργασιών και χαρακτηριστικών από εικόνες, με τη δυνατότητα να προβλέπουν ακριβώς τις μοριακές αλλαγές που απαιτούνται για την διάγνωση της νόσου. Ως αποτέλεσμα, αποτελούν μια ελπιδοφόρα προσέγγιση για τη βελτίωση της ακρίβειας και της εύστοχης διάγνωσης των γλοιωμάτων (Gore et al., 2021; Jian et al., 2021). Πιο συγκεκριμένα, το πεδίο της ακτινογενωμικής προσφέρει μια μοναδική ευκαιρία για την πρόβλεψη γενετικών μεταλλάξεων, την κατάσταση μοριακών δεικτών και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών μέσω της ανάλυσης χαρακτηριστικών από εικόνες. Αυτή η προσέγγιση χρησιμοποιεί δεδομένα εικόνας ως αντικαταστάτη της παρουσίας γενετικών αλλοιώσεων, παρέχοντας έναν μη επεμβατικό και αποτελεσματικό τρόπο διάγνωσης και παρακολούθησης των γλοιωμάτων (Jain & Chi, 2021). Η ακτινογενωμική έχει ήδη χρησιμοποιηθεί σε άλλες μορφές καρκίνου, όπως στον καρκίνο του μαστού (Matsutani et al., 2020) και τον καρκίνο του πνεύμονα (Lafata et al., 2021). Αυτές οι μελέτες έχουν αναδείξει τις δυνατότητες της ακτινογενωμικής να προβλέπει με ακρίβεια τα γενετικά χαρακτηριστικά των όγκων μέσω της ανάλυσης δεδομένων απεικόνισης. Η εφαρμογή της ακτινογενωμικής στα γλοιώματα αποτελεί ευκαιρία για τη βελτίωση της ακρίβειας και της αποτελεσματικότητας της μη επεμβατικής διάγνωσης και παρακολούθησης της νόσου. Στη μελέτη του Li Y και άλλων, χρησιμοποιήθηκαν MRI radiomics (machine learning) και κατάφεραν να προβλέψουν μεταλλάξεις ATRX (Alpha-thalassemia mental retardation syndrome) σε χαμηλόβαθμα γλοιώματα (Y. Li et al., 2018). Σε μια άλλη μελέτη, οι ίδιες μεταλλάξεις αναγνωρίστηκαν με ML (machine learning) σε γλοιώματα, με 94% ευαισθησία και 92% ειδικότητα (Calabrese et al., 2020). Τα DMG με H3F3A μεταλλάξεις στις ιστόνες έχουν μεγαλύτερη ενίσχυση του σήματος στις ακολουθίες T2 μαγνητικού τομογράφου, ενώ οι όγκοι χωρίς τη μετάλλαξη έχουν φτωχή αναγνώριση του NCET (non-contrast-enhancing tumor) περιθωρίου. Επιπλέον, οι όγκοι χωρίς μετάλλαξη παρουσιάζουν έντονο οίδημα και παρουσιάζουν διήθηση του φλοιού (Q. Li et al., 2021). Μια μελέτη ανάλυσης radiomics (πολυπαραμετρική MRI) κατάφερε να εντοπίσει ότι οι όγκοι που φιλοξενούν μεταλλάξεις TERT έχουν περισσότερες νεκρωτικές περιοχές, δεδομένου ότι οι μεταλλάξεις TERT υποδηλώνουν υψηλόβαθμο προφίλ (Tian et al., 2020). Η μελέτη των Moon και συνεργατών εντόπισαν αρκετά χαρακτηριστικά των υψηλόβαθμων γλοιωμάτων σε σχέση με τη μεθυλίωση του εκκινητή του MGMT (Moon et al., 2012). Όσον αφορά άλλους όγκους του εγκεφάλου και, ιδιαίτερα, τα ολιγοδενδρογλοιώματα, υπο-κατηγοριοποιούνται σε IDH-μεταλλαγμένα και με συνδιαγραφή στο 1p/19q (Louis et al., 2021), κάποιες μελέτες κατάφεραν να προβλέψουν την συνδιαγραφή 1p/19q με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία, χρησιμοποιώντας, για παράδειγμα, ανάλυση μιας εικόνας ακολουθίας T2 (Brown et al., 2008; Casale et al., 2021; Kong et al., 2020). Ο συνδυασμός της υγρής βιοψίας με γενωμικά στοιχεία του ακτινογενωμικού προφίλ, αντιπροσωπεύει μια ελπιδοφόρα προσέγγιση που θα φέρει επανάσταση στον τρόπο αντιμετώπισης της νόσου. Αυτός ο συνδυασμός μπορεί να διευκολύνει την πρόωπη διάγνωση, να παρέχει πιο ακριβή εκτίμηση της πρόγνωσης της νόσου, και να επιτρέπει την παρακολούθηση της νόσου σε πραγματικό χρόνο, και όλα αυτά με ελάχιστη επεμβατικότητα. Επιπλέον, αυτή η εξατομικευμένη προσέγγιση (personalized medicine) στην μη επεμβατική διάγνωση των όγκων εγκεφάλου μπορεί να ανοίξει τον δρόμο για την ιατρική ακριβείας (precision medicine), προσαρμοσμένη στις ατομικές ανάγκες του κάθε ασθενούς/ανθρώπου (personalized medicine).

Επίδραση της ακτινογενωμικής στη διάγνωση όγκων εγκεφάλου.

Η ακτινογενωμική ενσωματώνει μεγάλο αριθμό ποσοτικών δεδομένων που προέρχονται από ακτινολογικές εικόνες με γενωμικούς φαινότυπους διαφόρων ατόμων από την ανάλυση υγρών βιοψιών, προκειμένου να διευκολύνει την διάγνωση των γλοιωμάτων.

Τα δενδριτικά κύτταρα (DC)

Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) περιγράφονται ως μια συλλογή κυττάρων του φυσικού ανοσοποιητικού που διεισδύουν στους όγκους και παρουσιάζουν αντιγόνα που προέρχονται από όγκους σε κύτταρα T μετά τη διαδικασία. Τα δενδριτικά κύτταρα περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Ralph Steinman σχεδόν τριάντα χρόνια πριν, με την εύρεση ενός πληθυσμού κυττάρων δενδριτικού σχήματος στο σπλήνα. Λίγο αργότερα έγινε σαφές ότι δενδριτικά κύτταρα υπάρχουν σε όλους τους λεμφοειδείς και τους περισσότερους μη λεμφοειδείς ιστούς. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970, οι περισσότεροι ανοσολόγοι θεωρούσαν ότι τα μακροφάγα είναι ο κύριος τύπος ΑΠΚ στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σε σύγκριση με τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα ήταν πιο άφθονα, πιο ομοιόμορφα κατανομημένα σε όλο το σώμα ενώ ήταν είναι γνωστό ότι έχουν ικανότητα παρουσίασης αντιγόνου (ΑΠΚ). Δεδομένου ότι τα δενδριτικά κύτταρα ήταν τόσο σπάνια, οι αρχικές μελέτες ήταν δύσκολες μέχρι το 1980 που έγινε ευρέως αποδεκτό ότι αποτελούν «επαγγελματικά-εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ)» (Wieder E., 2003). Το εμβόλιο με δενδριτικά κύτταρα παίζει ένα ζωτικό ρόλο στην προϋπόθεση της ανοσίας των κυττάρων T κατά των όγκων και αποτελεί έναν πρωταρχικό στόχο θεραπείας για την πλειονότητα της ανοσοθεραπείας του καρκίνου. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αναγνώριση και η καταπολέμηση των αντιγόνων με χυμικές και κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις, με στόχο την εξάλειψη των ξένων ερεθισμάτων και την ανάπτυξη ειδικής μνήμης. Η ανάπτυξη

ανοσοαπόκρισης έναντι ενός αντιγόνου έχει αξιοποιηθεί στο πλαίσιο των εμβολίων, τα οποία θα αποτελέσουν αντικείμενο ανάπτυξης για την πρόληψη ή βελτίωση των αποτελεσμάτων μελλοντικών παθογόνων μολύνσεων. Προκειμένου να αποφευχθεί η μολυσματικότητα, τα εμβόλια δεύτερης γενιάς κατασκευάστηκαν από καθορισμένα αντιγονικά πεπτίδια ή ανασυνδιασμένες υπομονάδες πρωτεϊνών, τα οποία όμως χρειάζονται ταυτόχρονη χορήγηση ανοσοενισχυτικού για την επαγωγή της ανοσοαπόκρισης. Η θεραπεία με δένδριτικά κύτταρα είναι ένα είδος ανοσοθεραπείας για ασθενείς με καρκίνο. Η θεραπεία με δένδριτικά κύτταρα (DCT) παίζει ένα ουσιαστικό ρόλο στην αρχή και τον έλεγχο της ανοσοθεραπείας κατά του καρκίνου. Περίπου 6.000 κύτταρα καρκίνου υποτίθεται ότι εμφανίζονται καθημερινά ακόμα και στο σώμα των υγιών ανθρώπων. Ωστόσο, ο καρκίνος δεν πλησιάζει όλους επειδή το ανοσοποιητικό μας σύστημα επιτίθεται στα κύτταρα του καρκίνου. Το 2011, ο Ralph Steinman κέρδισε το Βραβείο Nobel για την αποκάλυψη της θεραπευτικής δύναμης των δένδριτικών κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα. Η θεραπεία με δένδριτικά κύτταρα (DCV) είναι γνωστή ως μία από τις επαναστατικές μεθόδους για την καταπολέμηση του καρκίνου, αφού χρησιμοποιεί τους πόρους του οργανισμού μας για την αντίσταση στα κακοήγη κύτταρα. Η ανοσοθεραπεία με δένδριτικά κύτταρα είναι ασφαλής και μπορεί να προωθήσει ανοσοαντικαρκινικές αντιδράσεις και επίμονη επιβίωση ασθενών με καρκίνο. Η θεραπεία με DC έχει χρησιμοποιηθεί στην ιατρική από το 2010. Πάνω από 4.500 άνθρωποι έχουν περάσει από αυτήν από τότε. Χρησιμοποιείται αποτελεσματικά στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του σαρκώματος, του μελανώματος, του γλίομα και άλλων καρκίνων. Ωστόσο, τα ανοσοενισχυτικά είναι υπεύθυνα για πολλές παρενέργειες και επιπλέον, λόγω του εκτεταμένου πολυμορφισμού των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, η επιλογή συγκεκριμένων μη λοιμωδών αντιγονικών επιτόπων μπορεί να μην είναι εξίσου αποτελεσματική για όλα τα άτομα. Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη ενός συστήματος που να επιτρέπει τη φυσική "φόρτωση" και παρουσίαση αντιγόνων *in vitro* και την περαιτέρω ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης *in vivo*. Μια τέτοια τεχνολογία οδηγεί σε εξατομικευμένα εμφυτεύσιμα εμβόλια, όπου μακροφάγα εμβολιάζονται με το αντιγόνο με φυσικό τρόπο και αφού ενεργοποιηθούν, προσκολλώνται σε εμφυτεύσιμες επιφάνειες και είναι σε θέση να ενισχύσουν την έναρξη ανοσολογικής απόκρισης. Μια τέτοια προσέγγιση εξαλείφει τις παρενέργειες που οφείλονται στη μη ειδική διέγερση των ανοσοενισχυτικών, αφήνοντας το φυσικό μηχανισμό επιλογής "φόρτωσης" αντιγόνου στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ώστε να επιλεγεί ο κατάλληλος αντιγονικός επίτοπος για κάθε άτομο. Οι εμφυτεύσιμες επιφάνειες θα αποτελέσουνται από ικρίωματα πυριτίου με τρισδιάστατη μικρο- και νανο- υφή και κατασκευάζονται με τη χρήση λέιζερ υπερταχών παλμών. Η εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής σε ανθρώπους θα είναι μεγάλης σημασίας για το άνοιγμα νέων τομέων στην έρευνα και τη θεραπεία. Η περιορισμένη εύρεση δένδριτικών κυττάρων αποτελούσε μεγάλο πρόβλημα στη μελέτη των κυττάρων αυτών έως το 1990. Τη χρονιά αυτή οι ερευνητές κατάφεραν να παράγουν μεγάλους αριθμούς δένδριτικά κύτταρα από CD34+ πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών ή από CD14+ μονοκύτταρα *in vitro*. Η ικανότητα παραγωγής των δένδριτικών κυττάρων *in vitro* έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα να μελετήσουν τα κύτταρα αυτά, να κατανοήσουν τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασής τους με το ανοσοποιητικό σύστημα και να αρχίσουν τις πιλοτικές εφαρμογές των δένδριτικών κυττάρων για θεραπεία στην κλινική πράξη (Kindt T, 2007).

Ανοσοφαινοτυπική ταυτοποίηση δένδριτικών κυττάρων

Τα ώριμα δένδριτικά κύτταρα ορίζονται από βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά καθώς και από την παρουσία ή την απουσία διαφόρων μορίων στην κυτταρική τους επιφάνεια. Το βασικό μορφολογικό χαρακτηριστικό τους είναι οι προεκβολές σε μορφή δένδριτών ή νευρώνων. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό τους είναι ότι περιέχουν άφθονες ενδοκυτταρικές δομές που σχετίζονται με την επεξεργασία αντιγόνου συμπεριλαμβανομένων ενδοσωμάτων, λυσοσωμάτων και κοκκίων Birbeck. Εμπόδιο στην ανίχνευση των δένδριτικών κυττάρων είναι ότι δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί κάποιος δείκτης κυτταρικής επιφάνειας που εκφράζεται επιλεκτικά και εξειδικευμένα σε αυτά. Παρόλα αυτά ένας συνδυασμός μορίων που εμφανίζονται ή απουσιάζουν απ' την κυτταρική επιφάνεια των δένδριτικών κυττάρων συμβάλλουν στη διαδικασία ταυτοποίησής τους. Σε αυτά περιλαμβάνεται η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων μορίων MHC τάξης II και η απουσία δεικτών όπως οι CD3 (T-λεμφοκύτταρα), CD14 (μονοκύτταρα), CD19 (B λεμφοκύτταρα), CD56 (NK κύτταρα) και CD66b (ουδετερόφιλα). Τα δένδριτικά κύτταρα εκφράζουν επίσης μία μεγάλη ποικιλία μορίων προσκόλλησης όπως τα CD11a (LFA-1), CD11c, CD50(ICAM-2), CD54(ICAM-1), CD58(LFA-3) και CD102(ICAM-3). Μόρια όπως τα CD80(B7.1) και CD86(B7.2) υπερεκφράζονται κατά την ενεργοποίηση των δένδριτικών κυττάρων, ενώ το CD86 χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης της πρώιμης ωρίμανσής τους σε αντίθεση με τον δείκτη των ώριμων κυττάρων CD80. Στα ανθρώπινα δένδριτικά κύτταρα δύο επιπλέον δείκτες είναι ο CD83, που εκφράζεται και από τα B κύτταρα και ο CMRF 44 που εμφανίζεται εξίσου στα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα. Δεδομένης αυτής της τεράστιας ποικιλομορφίας δεικτών, το θέμα της ταυτοποίησης φαίνεται να είναι δύσκολη υπόθεση. Στην πράξη ωστόσο η ταυτοποίηση περιορίζεται στην ανίχνευση μορίων MHC τάξης II και CD80 ή την απουσία CD3 και CD14. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την απουσία ή παρουσία αντίστοιχα δύο εκ των παραπάνω δεικτών είναι τις περισσότερες φορές αρκετή. Ωστόσο ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση είναι πιθανό να απαιτούνται περισσότερες αναλύσεις. Η έκφραση χαρακτηριστικών υποδοχέων TLRs συμβάλλει εν μέρει στην ανοσοφαινοτυπική ταυτοποίηση των δύο βασικότερων τύπων δένδριτικών κυττάρων. Έτσι τα μυελοειδή δένδριτικά κύτταρα (δένδριτικά κύτταρα1) χαρακτηρίζονται από την έκφραση των TLR-2,-3,-4 και-7 ώστε να διαφοροποιούνται και να ωριμάζουν κατά την αντιγονοπαρουσίαση όπου και εκκρίνουν κυτοκίνες επάγοντας Th1 ή Th2 ανοσολογική απόκριση. Τα λεμφοειδή ή πλασματοειδή δένδριτικά κύτταρα (δένδριτικά κύτταρα2) αντίστοιχα, εκφράζουν μόνο τους TLR-7 και-9 υποδοχείς,

δίνοντας το έναυσμα παραγωγής ιντερφερόνης-α (INF-α) μετά την εισβολή ιών στα κύτταρα. Οι δύο αυτοί υποπληθυσμοί δενδριτικών κυττάρων δενδριτικά διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη σύνδεση της έμφυτης με την ειδική ανοσία μέσω μοναδικών μοτιβών έκφρασης TLRs και έκκρισης κυτοκινών (Wieder E., 2003) - IFN-γ- Λύση καρκινικών κυττάρων- IFN-γ- Έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων (περφορίνη κ.ά) - IFN-γ- T και B ανοσία- Λύση μέσω συμπληρώματος- Αντιγονοπαρουσίαση μέσω MHC-II Στόχευση καρκινικών και διαμολυσμένων με ιούς κυττάρων.

Οι βασικές λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων

Οι βασικές λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων θα μπορούσαν να ταξινομηθούν σε τρεις βασικές κατηγορίες με την κάθε μία να περιλαμβάνει ένα είδος αντιγονοπαρουσίασης. Στην πρώτη κατηγορία περιλαμβάνεται ο ρόλος των δενδριτικών κυττάρων στην αντιγονοπαρουσίαση και μετέπειτα ενεργοποίηση των T κυττάρων. Στη δεύτερη ο ρόλος τους δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως αλλά έχει προταθεί ότι υποπληθυσμοί δενδριτικά κύτταρα συμβάλλουν στη διατήρηση της ανοσοποιητικής ανοχής. Στην τρίτη κατηγορία περιλαμβάνονται τα θυλακιακά δενδριτικά κύτταρα τα οποία φαίνεται πως ρυθμίζουν σε μεγάλο βαθμό τη χυμική ανοσία και συμβάλλουν στην απόθεση B κυττάρων μνήμης. Πιο αναλυτικά:

Ενεργοποίηση T κυττάρων

Τα δενδριτικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την επεξεργασία και παρουσίαση του εκάστοτε αντιγόνου για ενεργοποίηση των CD4+ και CD8+ T κυττάρων. Αυτός είναι και ο πιο σημαντικός ρόλος των δενδριτικών κυττάρων δεδομένου ότι είναι τα μοναδικά κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν «μη έμπειρα» (naïve) T-λεμφοκύτταρα. Τα ανώριμα δενδριτικά κύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών και μεταναστεύουν σε όλο το σώμα όπου παραμένουν αδρανή μέχρι να αλληλεπιδράσουν με «ξένους εισβολείς». Στη φάση αυτή η πρωτογενής λειτουργία των ανώριμων δενδριτικών κυττάρων είναι να συλλαμβάνουν αντιγόνα. Μετά τη λήψη το αντιγόνο υποβάλλεται σε επεξεργασία μέσω μιας εξωγενούς ή ενδοσωμικής οδού ή διαμέσου των πρωτεολυτικών αντιδράσεων σε πρωτεασώματα. Για αντιγονοπαρουσίαση μέσω MHC τάξης II προς ενεργοποίηση CD8+ Tc λεμφοκυττάρων, το αντιγόνο ή η πρωτεΐνη παραλαμβάνεται είτε μέσω φαγοκυττάρωσης είτε με διαμεσολάβηση υποδοχέα ενδοκύττωσης στο κυτοσόλιο. Τα κατακερματισμένα αντιγόνα εισάγονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου και προσδένονται σε νεοσυντιθέμενα μόρια MHC II για παρουσίαση στην κυτταρική επιφάνεια. Αντίστοιχα για αντιγονοπαρουσίαση μέσω MHC τάξης II προς ενεργοποίηση CD4+ Th λεμφοκυττάρων το αντιγόνο παραλαμβάνεται είτε μέσω φαγοκυττάρωσης είτε με διαμεσολάβηση υποδοχέα ενδοκύττωσης στα ενδοσώματα όπου γίνεται πρωτεόλυση. Πέρα από τη λήψη, επεξεργασία και παρουσίαση του αντιγόνου εξίσου σημαντική για τη δράση των δενδριτικών κυττάρων είναι και η παρουσία συνδιεγερτικών μορίων. Τα δενδριτικά κύτταρα διατηρούν στην κυτταρική τους επιφάνεια συνδιεγερτικά μόρια, τα οποία αποτελούν μέλη των πρωτεϊνών της B7 οικογένειας, της οικογένειας των TNF πρωτεϊνών καθώς και μόρια ενδοκυτταρικής προσκόλλησης καταλυτικά τόσο για την ενεργοποίηση των T κυττάρων όσο και για τη θέση εναπόθεσης των δενδριτικών κυττάρων πριν αλλά και μετά τη λήψη του αντιγόνου.

Ανοσοποιητική ανοχή

Ως ανοχή ορίζεται η ανικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να ανταποκριθεί σε συγκεκριμένα αντιγόνα. Η βασική ανοχή συμβαίνει στο θύμο αδένα για τα T και στο μυελό των οστών για τα B κύτταρα. Στους πρωτογενείς μηχανισμούς ανοχής περιλαμβάνεται η επαγωγή του θανάτου των T κυττάρων. Τα δενδριτικά κύτταρα υπάρχουν σε αφθονία στο θύμο αδένα, όπου νέα παραγόμενα T κύτταρα εκπαιδεύονται ώστε να γίνουν λειτουργικά Th και Tc κύτταρα και να υποβληθούν σε διαδικασία επιλογής προκειμένου να εξαλειφθεί η ανοσία έναντι «εαυτών» κυττάρων. Έτσι, χαμηλής συγγένειας T κύτταρα επιλέγονται θετικά, επιβιώνουν και μεταφέρονται στην περιφέρεια. Τα T κύτταρα που απαντούν στη δράση δενδριτικών κυττάρων, τα οποία παρουσιάζουν εαυτά πεπτιδία, καταστρέφονται στο θύμο μέσω αρνητικής επιλογής. Παράλληλα τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να συνεισφέρουν στην ανοχή μέσω απόπτωσης των T κυττάρων, έκκρισης IL-10 επάγοντας τη δράση των Treg ή οδηγώντας σε ανεργία αποκριτικά T κύτταρα.

Ενεργοποίηση B κυττάρων

Τα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να συμβάλλουν επίσης στην ενεργοποίηση B κυττάρων, τόσο στα βλαστικά κέντρα όσο και περιοχές των λεμφαδένων πλούσιες σε T κύτταρα. Ο μεγάλος αριθμός κυτοκινών και λοιπών παραγόντων που εκκρίνουν τα δενδριτικά κύτταρα τα καθιστούν αναγκαία στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των B κυττάρων. Ο ρόλος των θυλακιακών δενδριτικών κυττάρων, που απαρτίζουν τα βλαστικά κέντρα των λεμφαδένων, είναι αναγκαίος για τη διατήρηση της B κυτταρικής μνήμης αν και τα συγκεκριμένα δενδριτικά κύτταρα δεν ενέχονται στην αρχική απάντηση του αντισώματος στο ξένο αντιγόνο. Θεωρείται πως δρουν σαν πηγές «αντισωμάτων» και σαν πηγή συνεχούς διέγερσης για τα B κύτταρα που αναλαμβάνουν από το σημείο αυτό και μετά να παρουσιάσουν το αντιγόνο σε T κύτταρα.

Αναστολείς σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος (anti-CTLA4, anti-PD1 / PDL1)

Η σημαντική πρόοδος των αναστολέων σημείων ελέγχου (anti-CTLA4, anti-PD1 / PDL1) έχει αποτελέσει μια ελπιδοφόρα θεραπευτική επιλογή σε αρκετούς συμπαγείς όγκους. Τα αντισώματα CTLA4, όπως το ipilimumab και το tremelimumab, αναστέλουν τον υποδοχέα CTLA4 να ενωθεί με το B7 και ενισχύουν την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Η έκφραση του CTLA-4 σε όγκους έχει συνδεθεί με την κακή επιβίωση στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα (Huang et al., 2016) και την αυξημένη επιβίωση στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) (Salvi et al., 2012). Όταν τα PD1 / PDL1 που εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων. Τα υψηλά επίπεδα PD-1 / PDL1 μπορεί να συσχετιστούν με κακή πρόγνωση σε μερικούς καρκίνους (μελάνωμα, οισοφάγο, καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων, καρκίνο ωοθηκών) και με καλύτερη πρόγνωση σε άλλους (π.χ. αγγειοσάρκωμα και γαστρικό καρκίνο) (Seidel, Otsuka and Kabashima, 2018). Τα αντισώματα PD1 (όπως το nivolumab και pembrolizumab) και το PDL1 (όπως το atezolizumab) διακόπτουν την αλληλεπίδραση του PD1 με το PDL1. Την τελευταία δεκαετία, πολλοί αναστολείς σημείων ελέγχου (π.χ. ipilimumab, nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab) έχουν λάβει έγκριση σε διάφορους συμπαγείς όγκους όπως το μελάνωμα, τον πνεύμονα, τον νεφρό και την ουροδόχο κύστη (Soliman, 2017). Ειδικότερα, το 2011, το ipilimumab ήταν ο πρώτος εγκεκριμένος αναστολέας σημείων ελέγχου, σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα που έδωσε μεγαλύτερη επιβίωση. Το pembrolizumab και το nivolumab ήταν επίσης μεταξύ των εγκεκριμένων αναστολέων PD1 για προχωρημένο μελάνωμα. Η συνεργική θεραπεία με ipilimumab και nivolumab οδήγησε σε μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς την επανεμφάνιση της νόσου, σε σύγκριση με κάθε φάρμακο που χορηγήθηκε χωριστά (11,5 έναντι 2,9 μήνες μόνο με ipilimumab και 6,9 μήνες μόνο με nivolumab) (Valsecchi, 2015). Η πρώτη ανοσοθεραπεία που επιτράπηκε (2015) ήταν το Nivolumab για τη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό NSCLC. Μεταξύ ασθενών με προχωρημένο μηπλακώδες NSCLC που είχαν πρόοδο νόσου κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνη, η επιβίωση ήταν καλύτερη κατά 41% (nivolumab έναντι docetaxel). Επιπλέον, η θεραπεία πρώτης γραμμής με το nivolumab μαζί με ipilimumab είχε ως αποτέλεσμα την μεγαλύτερη επιβίωση από ό,τι μόνο η χημειοθεραπεία, σε ασθενείς με NSCLC, ανεξάρτητα από την έκφραση PD-L1 (Borghaei et al., 2015). Επιπλέον, ο συνδυασμός του nivolumab και του ipilimumab έναντι του sunitinib έδωσε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης σε θεραπεία 1ης γραμμής, ασθενών με προχωρημένο νεφροκυτταρικό καρκίνωμα (Motzer et al., 2019). Το pembrolizumab χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη θεραπεία δεύτερης γραμμής, ασθενών με NSCLC που εκφράζουν PDL1. Επιπρόσθετα, έχει λάβει έγκριση για την αντιμετώπιση ασθενών με προχωρημένο NSCLC και υψηλή έκφραση PDL1, ασθενών με μεταστατικό μελάνωμα και ασθενών με μεταστατικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου (Soliman, 2017). Το atezolizumab (αναστολέας PDL1), που επιτρέπεται για τη θεραπεία ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνωμα του ουροθηλίου λόγω του ευνοϊκού προφίλ ασφάλειας σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία (Powles et al., 2018). Επιπλέον, η χορήγηση του atezolizumab έναντι του bevacizumab μαζί με χημειοθεραπεία βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση μεταξύ ασθενών με μεταστατικό μη-πλακώδες NSCLC, ανεξάρτητα από την έκφραση PD-L1 (Socinski et al., 2018). Παρά τις ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τις προαναφερθείσες μελέτες, αυτές οι θεραπείες παρουσίασαν μικρή αποτελεσματικότητα στον καρκίνο του παγκρέατος όταν χορηγήθηκε μόνη της η ανοσοθεραπεία. Σε μια μελέτη φάσης II, το ipilimumab δεν ήταν σε θέση να επάγει ανταπόκριση όγκου σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παγκρέατος και το μονοκλωνικό αντίσωμα BMS-93655 (αντι-PD-L1) δεν είχε αποτελεσματικότητα σε μία μελέτη φάσης I (Winograd et al., 2015) (Foley et al., 2016). Η αδυναμία αυτών να προκαλέσουν αναστολή της ανάπτυξης του όγκου οφειλόταν πιθανότατα στην ανοσοποιητική διακοπή, στην υπερβολική δεσμοπλασία και στην έλλειψη έκφρασης του PD-L1 σε αυτόν τον τύπο καρκίνου. Συνεπώς, η ενσωμάτωση πρόσθετων θεραπειών για τη χορήγηση συνδυαστικών στρατηγικών φαίνεται να είναι η ιδανική προσέγγιση για την επίτευξη της πιο αποτελεσματικής απόκρισης. Ένα ευρύ φάσμα κλινικών δοκιμών στον καρκίνο του παγκρέατος έχει ολοκληρωθεί ή βρίσκεται σε εξέλιξη χρησιμοποιώντας μονοθεραπείες ανοσολογικού ελέγχου, συνδυασμούς θεραπειών και αναστολείς σημείων ελέγχου σε συνδυασμό με εμβόλια, κυτταροτοξική χημειοθεραπεία και άλλους ανασταλτικούς παράγοντες.

Pembrolizumab

Το Pembrolizumab, προηγουμένως γνωστό ως Lambrolizumab, είναι ένα πολύ υψηλής συγγένειας ανθρωποποιημένο αντίσωμα IgG4 που στρέφεται κατά του ανθρώπινου PD-1 (Bardhan et al., 2016; Ohaegbulam et al., 2015). Είναι επίσης το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει το PD-1 στο οποίο έχει χορηγηθεί επιταχυνόμενη έγκριση από τον FDA (Ohaegbulam et al., 2015). Στη δοκιμή KEYNOTE-001 Φάσης I, η οποία ξεκίνησε το 2008 και δημοσιεύτηκε το 2015 (Cohen et al., 2019; Garon et al., 2019), πήραν μέρος 495 ασθενείς με προχωρημένο μη εγχειρίσιμο ή μεταστατικό MKKΠ, οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με pembrolizumab. Οι περισσότεροι ασθενείς έλαβαν pembrolizumab σε 10 mg / kg κάθε 2 ή 3 εβδομάδες (N = 489) και πολύ λίγοι σε δόση 2 mg / kg κάθε 3 εβδομάδες (N = 6). Το ORR ήταν 19,4% και η διάμεση διάρκεια ανταπόκρισης ήταν 12,5 μήνες. Η διάμεση PFS ήταν 3,7 μήνες για όλους τους ασθενείς και η διάμεση OS ήταν 12 μήνες. Μετά από διερευνητική ανάλυση στην ομάδα που λάμβανε τη θεραπεία, επικυρώθηκε μια αποκοπή θετικότητας PDL1 $\geq 50\%$ σε 204 ασθενείς ως δυνητικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη των αποκρίσεων στο pembrolizumab. Για ασθενείς με όγκους που εμφανίζουν $\geq 50\%$ κύτταρα θετικά σε PDL1, 1–49% κύτταρα θετικά σε PDL1 και 50% των κυττάρων, η μέση επιβίωση ήταν 14,9 μήνες για το pembrolizumab 2mg / kg και 17,3 μήνες για το pembrolizumab 10mg / kg. Η μελέτη αυτή έδωσε την έγκριση στο pembrolizumab για χρήση ως θεραπεία 2ης

γραμμής, σε ασθενείς που είναι θετικοί για το PD-L1 >1% (D. Cortinovis et al., 2017). Στη μελέτη KEYNOTE-024 το pembrolizumab αξιολογήθηκε ως μονοθεραπεία πρώτης γραμμής σε καρκινοπαθείς με προχωρημένο ΜΚΚΠ με έκφραση του PD-L1 $\geq 50\%$ έναντι της επιλογής με χημειοθεραπεία με βασικό συστατικό την πλατίνα. Στην ομάδα του pembrolizumab, τόσο η μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) όσο και η 6 μηνών συνολική επιβίωση βελτιώθηκαν σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία, οδηγώντας στην έγκριση του FDA για το pembrolizumab για αυτόν τον πληθυσμό. Η ανάλυση εντόπισε όφελος στους ασθενείς στην ομάδα του pembrolizumab σε αντίθεση με εκείνους της ομάδας χημειοθεραπείας (διάμεση OS 30,0 έναντι 14,2 μηνών) (Doroshov et al., 2019). Επεκτείνοντας τον ίδιο σχεδιασμό σε ασθενείς με έκφραση του PD-L1 $\geq 1\%$, η μελέτη KEYNOTE-042 βρήκε ένα συνολικό όφελος επιβίωσης σε όλους τους ασθενείς, με διάμεση OS 16,7 έναντι 12,1 μηνών. Ωστόσο, μια διερευνητική ανάλυση καρκινοπαθών ασθενών με PD-L1 $\geq 1-49\%$ δεν βρήκε σημαντικές διαφορές στο OS σε αυτόν τον πληθυσμό, υποδηλώνοντας ότι η θεραπεία πρώτης γραμμής με μοναδικό φάρμακο το pembrolizumab θα πρέπει να περιορίζεται σε ασθενείς με έκφραση του PD-L1 $\geq 50\%$ ή περισσότερο. Ωστόσο, σε ασθενείς που δεν είναι υποψήφιοι για χημειοθεραπεία με βάση την κατάσταση απόδοσης τους ή με άλλες συννοσηρότητες, το pembrolizumab από μόνο του μπορεί να είναι μια λογική επιλογή ανοσοθεραπείας (Doroshov et al., 2019). Συμπερασματικά, το pembrolizumab έχει δείξει σημαντική αποτελεσματικότητα για το ΜΚΚΠ ανθεκτικό στη συμβατική χημειοθεραπεία, μια κακοήθεια όπου πριν υπήρχαν λίγες επιλογές θεραπείας. Τον Οκτώβριο του 2015, ο FDA των ΗΠΑ ενέκρινε το pembrolizumab για τη θεραπεία των μεταστατικών ΜΚΚΠ που εκφράζουν το PD-L1, τα οποία δείχνουν εξέλιξη της νόσου κατά ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα (Kwok et al., 2016). Το pembrolizumab έχει επιδειξει πολλά υποσχόμενη κλινική δράση σε κλινικές μελέτες πρώιμης φάσης για τη θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό SCLC που είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε δύο ή περισσότερες σειρές θεραπειών. Στη φάση Ib, της μελέτης πολυκοόρτης KEYNOTE-028, έλαβαν μέρος ασθενείς που προηγουμένως είχαν υποβληθεί σε θεραπεία για θετικό PD-L1 υποτροπιάζον ή μεταστατικό SCLC, που έλαβαν μονοθεραπεία με pembrolizumab. Στη φάση II, ανοικτής μελέτης KEYNOTE-158, έλαβαν μέρος ασθενείς με υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό SCLC ανεξάρτητα από την κατάσταση PD-L1 τους, οι οποίοι έλαβαν μονοθεραπεία με pembrolizumab. Και στις δύο μελέτες, το pembrolizumab επέδειξε ένα ευνοϊκό προφίλ ασφαλείας, σύμφωνο με αυτό που παρατηρήθηκε για μονοθεραπεία με pembrolizumab σε άλλους τύπους όγκων. Οι ασθενείς έλαβαν pembrolizumab (10 mg / kg κάθε 2 εβδομάδες στην KEYNOTE-028 και 200 mg κάθε 3 εβδομάδες στην KEYNOTE-158) για έως και 2 χρόνια ή έως ότου τεκμηριωθεί η εξέλιξη της νόσου, η μη αποδεκτή τοξικότητα, η παροδική ασθένεια που εμποδίζει την περαιτέρω θεραπεία της μελέτης ή την απόσυρση από τη μελέτη (Chung et al., 2020). Η μονοθεραπεία με pembrolizumab παρέχει μια θεραπευτική επιλογή που είναι καλύτερα ανεκτή από τη χημειοθεραπεία στο πλαίσιο της τρίτης γραμμής σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε ισχυρή προθεραπεία. Με βάση τα αποτελέσματα των μελετών KEYNOTE-028 και KEYNOTE-158, το pembrolizumab εγκρίθηκε πρόσφατα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ για τη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό SCLC με εξέλιξη της νόσου κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα και τουλάχιστον μία άλλη προηγούμενη γραμμή θεραπείας (Chung et al., 2020). Οι αναστολείς PD-(L) 1 έχει επίσης αποδειχθεί ότι βελτιώνουν τα αποτελέσματα σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία στο μεταστατικό πλακώδες ΜΚΚΠ σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Η κλινική μελέτη KEYNOTE-407, περιλάμβανε ασθενείς με μεταστατικό πλακώδες ΜΚΚΠ που δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν 4 κύκλους θεραπείας με carboplatin και με taxane με ή χωρίς pembrolizumab. Οι ασθενείς στην ομάδα που περιείχε pembrolizumab είχαν σημαντική βελτιωμένη διάμεση OS σε σύγκριση με εκείνους που έλαβαν χημειοθεραπεία μόνο (15,9 έναντι 11,3 μηνών). Το όφελος παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες PD-L1 TPS. Το γεγονός αυτό, οδήγησε στην έγκριση του FDA και στην καθιέρωση αυτής της τριπλέτας ως ένα καινούριο πρότυπο φροντίδας για αυτή την πληθυσμιακή ομάδα ασθενών. Ανεπιθύμητες ενέργειες βαθμού ≥ 3 παρατηρήθηκαν στο 69,8% των ασθενών που έλαβαν pembrolizumab έναντι του 68,2% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία μόνο με 128 χημειοθεραπεία, γεγονός που υποδηλώνει ότι η προσθήκη pembrolizumab δεν αύξησε σημαντικά την τοξικότητα (Doroshov et al., 2019; Jotte et al., 2020).

Εξατομικευμένα εμφυτεύσιμα εμβόλια με αντιγονικά προενεργοποιημένα μακροφάγα

Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αναγνώριση και η καταπολέμηση των αντιγόνων με χυμικές και κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις, με στόχο την εξάλειψη των ξένων ερεθισμάτων και την ανάπτυξη ειδικής μνήμης. Η ανάπτυξη ανοσοαπόκρισης έναντι ενός αντιγόνου έχει αξιοποιηθεί στο πλαίσιο των εμβολίων, τα οποία αποτελούν αντικείμενο ανάπτυξης για την πρόληψη ή βελτίωση των αποτελεσμάτων μελλοντικών παθογόνων μολύνσεων. Προκειμένου να αποφευχθεί η μολυσματικότητα, τα εμβόλια δεύτερης γενιάς κατασκευάστηκαν από καθορισμένα αντιγονικά πεπτίδια ή ανασυνδυασμένες υπομονάδες πρωτεϊνών, τα οποία όμως χρειάζονται ταυτόχρονη χορήγηση ανοσοενισχυτικού για την επαγωγή της ανοσοαπόκρισης. Ωστόσο, τα ανοσοενισχυτικά είναι υπεύθυνα για πολλές παρενέργειες και επιπλέον, λόγω του εκτεταμένου πολυμορφισμού των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, η επιλογή συγκεκριμένων μη λοιμωδών αντιγονικών επιτόπων μπορεί να μην είναι εξίσου αποτελεσματική για όλα τα άτομα. Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη ενός συστήματος που να επιτρέπει τη φυσική "φόρτωση" και παρουσίαση αντιγόνων in vitro και την περαιτέρω ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης in vivo. Μια τέτοια τεχνολογία οδηγεί σε εξατομικευμένα εμφυτεύσιμα εμβόλια, όπου μακροφάγα εμβολιάζονται με το αντιγόνο με φυσικό τρόπο και αφού ενεργοποιηθούν, προσκολλώνται σε εμφυτεύσιμες επιφάνειες και είναι σε θέση να ενισχύσουν την έναρξη ανοσολογικής απόκρισης. Μια τέτοια προσέγγιση εξαλείφει τις παρενέργειες που οφείλονται στη μη ειδική διέγερση των ανοσοενισχυτικών, αφήνοντας το φυσικό μηχανισμό επιλογής "φόρτωσης" αντιγόνου στα

αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ώστε να επιλεγεί ο κατάλληλος αντιγονικός επίτοπος για κάθε άτομο. Οι εμφυτεύσιμες επιφάνειες αποτελούνται από ικρίωματα πυριτίου με τρισδιάστατη μικρο- και νανο- υφή και κατασκευάζονται με τη χρήση λείζερ υπερταχών παλμών. Η εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής σε ανθρώπους θα είναι μεγάλης σημασίας για το άνοιγμα νέων τομέων στην έρευνα και τη θεραπεία.

Εμβόλια

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει συστηματική έρευνα για την καλύτερη κατανόηση των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανάπτυξη των γλοιομάτων με στόχο την ανεύρεση μοριακών δεικτών με προγνωστική και προβλεπτική σημασία.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι θεραπευτικών εμβολίων κατά του καρκίνου, τα αυτόλογα και τα αλλογενή εμβόλια:

□ Ο πρώτος τύπος είναι ένα εξατομικευμένο εμβόλιο κατά του καρκίνου που παρασκευάζεται από τα κύτταρα του ίδιου του ασθενούς και βασίζεται είτε σε καρκινικά κύτταρα είτε σε υγιή κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα κύτταρα λαμβάνονται από το άτομο, επεξεργάζονται και πολλαπλασιάζονται στο εργαστήριο και στη συνέχεια εγχέονται ξανά στην κυκλοφορία του ασθενούς. Τα επεξεργασμένα κύτταρα αναγνωρίζουν τα καρκινικά κύτταρα και ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση κατά του καρκίνου. Αυτός ο τύπος θεραπείας θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μαζί με άλλες θεραπείες καρκίνου, όπως χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία, προκειμένου να εξαλειφθούν ίχνη καρκινικών κυττάρων που επιμένουν. Στην ιδανική περίπτωση, ορισμένα κύτταρα μνήμης θα παρέμεναν στο σύστημα του ασθενούς με την προϋπόθεση ότι θα μπορούσαν να ανταποκριθούν αμέσως, εάν εμφανιστούν ξανά καρκινικά κύτταρα.

□ Ο δεύτερος τύπος εμβολίων κατά του καρκίνου, τα αλλογενή εμβόλια, βασίζονται σε κύτταρα που αναπτύσσονται αποκλειστικά στο εργαστήριο (μη εαυτά κύτταρα). Αυτός ο τύπος εμβολίου είναι πιο δύσκολο να αναπτυχθεί αλλά πιο ελκυστικός επειδή είναι δυνητικά λιγότερο δαπανηρή η κατασκευή του. Ο στόχος είναι να ενεργοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα αντί να επιτευχθεί σε ένα συγκεκριμένο καρκινικό κύτταρο, έτσι ώστε αυτή η μορφή θεραπείας να έχει δυνατότητες ενάντια σε κάθε τύπο καρκίνου. Παρά τη σημαντική ερευνητική προσπάθεια μέσω των κλινικών δοκιμών, κανένα δεν έχει ακόμη αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματικό για την έγκριση του FDA (Dobosz & Dzieciatkowski, 2019). Τα εμβόλια κατά του καρκίνου χρησιμοποιούν ειδικά αντιγόνα όγκου για να πυροδοτήσουν αντικαρκινικές ανοσοαποκρίσεις που προκαλούνται από T-κύτταρα. Οι βασικές μελέτες προήλθαν από την ταυτοποίηση των MZ2-E και MZ2-D, τα οποία είναι αντιγόνα που προέρχονται από κύτταρα μελανώματος και κωδικοποιούνται από την οικογένεια γονιδίων MAGE (Melanoma-associated antigen) και μπορούν να αναγνωριστούν από τα κυτταροτοξικά T κύτταρα για να πυροδοτήσουν αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Ταυτόχρονα, ένα άλλο αντιγόνο ανθρώπινου μελανώματος, το gp100, αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με την απόρριψη όγκου in vivo επάγοντας ανοσολογικές αποκρίσεις που προκαλούνται από διηθητικά λεμφοκύτταρα (Tumor-Infiltrating Lymphocytes- TILs) σε ασθενείς με μελάνωμα. Αυτά τα ευρήματα άνοιξαν το δρόμο για τη χρήση αντιγόνων προερχόμενα από όγκους ως εμβόλια στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου (Y. Zhang & Zhang, 2020). Εκτός από τα αντιγόνα όγκου, ο Εμβολιασμός με βάση τα δενδριτικά κύτταρα έδειξε επίσης σημαντικά κλινικά αποτελέσματα. Τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) είναι τα καλύτερα εξοπλισμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρόκληση αντικαρκινικής ανοσίας. Συγκεκριμένα, μετά την ενεργοποίηση από αντιγόνα όγκου, τα DCs μπορούν να εσωτερικεύσουν, να επεξεργαστούν και στη συνέχεια να παρουσιάσουν τους επεξεργασμένους επίτοπους στα T κύτταρα και να επάγουν κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL) (Y. Zhang & Zhang, 2020). Το 2010 ο FDA ενέκρινε το Provenge ως το πρώτο αυτόλογο εμβόλιο κατά του καρκίνου, γνωστό και ως sipuleucel-T, για τη θεραπεία του ανθεκτικού καρκίνου του προστάτη, μια ανοσοθεραπεία με βάση τα δενδριτικά κύτταρα (Igarashi & Sasada, 2020). Μια άλλη πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου περιλαμβάνει τη χρήση εξατομικευμένων εμβολίων που έχουν σχεδιαστεί για να πυροδοτούν de novo αποκρίσεις T-λεμφοκυττάρων έναντι των νεοαντιγόνων που προσδίδουν υψηλή εξειδίκευση στον ασθενή. Τα νεοαντιγόνα είναι αντιγόνα που κωδικοποιούνται από μεταλλαγμένα γονίδια που υπάρχουν στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων (termed tumour-associated antigens – TAAs). Επομένως εδώ και αρκετά χρόνια έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω του πρωταρχικού τους ρόλου στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Ως αποτέλεσμα σωματικών μεταλλάξεων ειδικών για τον όγκο, τα νεοαντιγόνα δεν υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων του φυσιολογικού ιστού. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως μπορεί να εκφραστούν και σε μη κακοήθεις ιστούς, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο αυτοάνοσων τοξικοτήτων που προκαλούνται από το εμβόλιο. Όντας εξαιρετικά ανοσογονικά, μπορούν να ενεργοποιήσουν την ανοσολογική απόκριση των CD8+ T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, παρέχοντας έναν τέλειο στόχο για ανοσοθεραπείες καρκίνου με βάση τα T κύτταρα. Η παρουσίαση και το φορτίο των νεοαντιγόνων έχουν συσχετιστεί θετικά με την πρόγνωση σε ασθενείς, σε ποικίλους τύπους καρκίνων και με το όφελος από τους αναστολείς του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου (ICIs), σε ασθενείς με μελάνωμα, μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (MKKΠ) ή καρκίνο του παχέος εντέρου να αυξάνεται (Blass & Ott, 2021).

Η χρησιμοποίηση πεπτιδικών εμβολίων με σκοπό την επαγωγή αντικαρκινικής T-κυτταρικής απόκρισης πλεονεκτεί ως προς το ότι είναι δυνατόν να επιτευχθεί η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεαστούν οι φυσιολογικοί ιστοί. Επίσης, η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός τους είναι σχετικά εύκολος και όπως φαίνεται από κλινικές μελέτες που έγιναν τα εμβόλια αυτά

είναι ασφαλή. Η συνύπαρξη τάξης I και τάξης II επιτόπων που προέρχονται από το ίδιο καρκινικό αντιγόνο έχει βρεθεί ότι ενισχύει την ποιότητα της ανοσολογικής απόκρισης, προκαλεί μακράς διάρκειας ανοσία και ενδυναμώνει την αντικαρκινική δράση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα CD4 T κύτταρα ενεργοποιούν τα αντιγονοπαρουσιαστικά (δενδριτικά) κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης των CD40 και των προσδετών τους και με τη σειρά τους τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να παρουσιάσουν το αντιγόνο στα CD8 T κύτταρα. Πιθανόν να μην υπάρχει άλλη ιατρική καινοτομία που να έχει πιο σημαντικό αντίκτυπο στην ιατρική και στην παγκόσμια υγεία από την εφεύρεση και την ανάπτυξη των εμβολίων. Ακριβώς όπως το ανοσοποιητικό μας σύστημα εργάζεται ασταμάτητα για την πρόληψη των λοιμώξεων και μας προστατεύει από δυνητικά επιβλαβή παράσιτα, ιούς, και βακτήρια έτσι παίζει επίσης κεντρικό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου. Είναι δυνατό να ενισχυθεί αυτή η ικανότητά του, είτε αποτρέποντας τη μόλυνση, είτε «διδάσκοντας» στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος πως να αναγνωρίζουν και να σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα μόλις αυτά εμφανιστούν στο σώμα. Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, έχει γίνει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που εξετάζουν θεραπευτικές και προφυλακτικές στρατηγικές εμβολιασμού που εκθέτουν το ανοσοποιητικό σύστημα σε μοριακό επίπεδο ώστε να θεραπεύσει ή να αποτρέψει διάφορους τύπους καρκίνων. Οι ανοσοθεραπευτικές στρατηγικές γίνονται τώρα αποδεκτές λόγω της εξειδίκευσης που προσφέρουν στη στόχευση μόνο των καρκινικών κυττάρων σε αντιδιαστολή με την υπάρχουσα χημειοθεραπεία ή την ακτινοβολία που είναι λιγότερο εξειδικευμένες και σχετίζονται με πολλές παρενέργειες. Η αρχή στην οποία βασίζονται τα αντικαρκινικά εμβόλια είναι ότι το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να επάγει αντικαρκινική απόκριση και να ενεργοποιεί μια σειρά αμυντικών μηχανισμών ενάντια στα καρκινικά κύτταρα. Ενίσχυση της ικανότητας του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει η καρκινικά κύτταρα ως ξένα, είτε με ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω της αύξησης της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων. Γενικά, ο στόχος των αντικαρκινικών εμβολίων είναι να εισάγουν το αντιγόνο ανοσογόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και να επάγουν μακράς διάρκειας ανοσία. Ο σχεδιασμός πεπτιδικών εμβολίων για την επαγωγή αντικαρκινικής κυτταρικής απόκρισης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Είναι δυνατή η σύνδεση διαφορετικών πεπτιδίων στο ίδιο μόριο φορέα επιτρέποντας έτσι την παρασκευή πολυδύναμων συνθετικών εμβολίων. Επίσης, υπάρχει περιορισμός στην ανάπτυξη μη ειδικών αντισωμάτων από αντιγόνα προσμίξεις λόγω της υψηλής καθαρότητας των συνθετικών πεπτιδίων. Επιπλέον, τα εμβόλια αυτά έχουν ενδογενή ανοσοενισχυτική δράση. Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης πεπτιδίων που να ξεπερνά γενετικούς περιορισμούς στην παραγωγή αντισωμάτων. Το σκεπτικό της ανοσοθεραπείας του καρκίνου εισήχθηκε πρώτη φορά από τον William Coley πριν ένα αιώνα περίπου. Παρόλα αυτά χρειάστηκε να περάσουν πολλά χρόνια ώστε να γίνει εφικτή η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος με τα καρκινικά κύτταρα. Πρόσφατες ανακαλύψεις στην κυτταρική και μοριακή ανοσολογία έφεραν στην επιφάνεια σημαντικές ενδείξεις για την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει τα καρκινικά κύτταρα ως ξένα να επάγει ανοσολογική απόκριση που οδηγεί στη μείωσή τους. Τα αντικαρκινικά εμβόλια λειτουργούν στέλνοντας μία οδηγία ή ένα ειδικό σήμα στα κύτταρα του ασθενούς προκειμένου να παράξει αντιγόνα ή πρωτεΐνη που θα διαχωρίσει τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά. Τα εμβόλια ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ώστε να ενεργήσει το ανοσοποιητικό σύστημα διεγείροντας την ειδική για τον όγκο αντιδραστικότητα T-κυττάρων που οδηγεί στην ενίσχυση της στόχευσης του όγκου. Από τη στιγμή που το σώμα του ασθενή έχει δημιουργήσει αρκετά <<αντιβιοτικά>> μπορεί να αναγνωρίσει τότε και αν θα επιστέψει η νόσος. Οι επιστήμονες μελετούν πολλά διαφορετικά είδη αντικαρκινικών εμβολίων και πώς αυτά θα μπορέσουν να λειτουργήσουν σε διαφορετικές μορφές καρκίνου. Ωστόσο απαιτείται ακόμα περισσότερη έρευνα για να πουν πόσο καλά λειτουργούν τα εμβόλια και ποιες μορφές καρκίνου μπορούν να αντιμετωπίσουν. Οι ειδικοί ωστόσο θεωρούν ότι τα εξατομικευμένα εμβόλια μπορούν να είναι αποτελεσματικά σε μία ευρεία κλίμακα καρκίνων, μεταξύ αυτών του καρκίνου του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος και των νεφρών. Η εφαρμογή της πανγενωμικής ανάλυσης με μεθόδους αλληλούχισης νέας γενιάς (next generation sequencing, NGS) έχει αποδώσει πληθώρα πληροφοριών για τη γενωμική κατάσταση των γλοιομάτων υψηλής και, πρόσφατα, χαμηλής κακοήθειας. Η έρευνα αυτή οδήγησε σε μια «έκρηξη» πληροφορίας στον τομέα των νεοπλασμάτων του ΚΝΣ και ειδικότερα των γλοιομάτων, καθώς ξεδιάλυσε σημαντικά μοριακά μονοπάτια της καρκινογένεσης στα γλοιώματα. Αποτέλεσμα αυτής της γνώσης ήταν η αναθεώρηση της ταξινόμησης των νεοπλασμάτων του ΚΝΣ από τον ΠΟΥ στις πιο πρόσφατες εκδόσεις, αυτή του 2016 και πρόσφατα του 2021. Στρατηγικές εμβολιασμού έχουν δοκιμαστεί στο γλοιοβλάστωμα εδώ και πολλά χρόνια. Τρεις τρέχουσες μελέτες χρησιμοποιούν νέες στρατηγικές εμβολιασμού κατά πιο ισχυρών αντιγόνων του γλοιοβλαστώματος σε συνδυασμό με αναστολείς σημείων ελέγχου (Checkpoint inhibitors) του ανοσοποιητικού. Η πολυκεντρική, διεθνής μελέτη ROSALIE (NCT04116658) συνδυάζει ομάδες πεπτιδίων που προέρχονται από το γλοιοβλάστωμα και μοιάζουν με πεπτίδια από τη φυσιολογική εντερική χλωρίδα, με τη λογική ότι τα T κύτταρα (δηλαδή τα κύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος) αντιδρούν σε αυτά τα πεπτίδια ήδη και ως εκ τούτου είναι ικανά να βελτιώσουν την καταστροφή του όγκου. Αυτό το πολυπεπτιδικό εμβόλιο συνδυάζεται με τον αντι-PD-1 παράγοντα nivolumab (που είδαμε παραπάνω) με ή χωρίς τον αντιαγγειογενετικό παράγοντα bevacizumab (Avastin). Τα εμβόλια κατά του καρκίνου είναι μία μορφή ανοσοθεραπείας. Σε αντίθεση με τα άλλα εμβόλια που προστατεύουν από την μόλυνση, όπως είναι αυτό κατά του κορονοϊού για παράδειγμα, τα εμβόλια κατά του καρκίνου θεραπεύουν τους ανθρώπους που ήδη νοσούν. Είναι σχεδιασμένα ώστε να βοηθούν το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή να αναγνωρίζει και να σκοτώνει τα καρκινικά κύτταρα αλλά και να εμποδίζει την επανεμφάνισή τους. Τα αντικαρκινικά εμβόλια λειτουργούν στέλνοντας μία οδηγία ή ένα ειδικό σήμα στα κύτταρα του ασθενούς προκειμένου να παράξει αντιγόνα ή πρωτεΐνη που θα διαχωρίσει τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά. Τα εμβόλια ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό

σύστημα του οργανισμού ώστε να ενεργήσει το ανοσοποιητικό σύστημα διεγείροντας την ειδική για τον όγκο αντιδραστικότητα Τ-κυττάρων που οδηγεί στην ενίσχυση της στόχευσης του όγκου. Από τη στιγμή που το σώμα του ασθενή έχει δημιουργήσει αρκετά <<αντιβιοτικά>> μπορεί να αναγνωρίσει τότε και αν θα επιστέψει η νόσος. Οι επιστήμονες μελετούν πολλά διαφορετικά είδη αντικαρκινικών εμβολίων και πώς αυτά θα μπορέσουν να λειτουργήσουν σε διαφορετικές μορφές καρκίνου. Ωστόσο απαιτείται ακόμα περισσότερη έρευνα για να πουν πόσο καλά λειτουργούν τα εμβόλια και ποιες μορφές καρκίνου μπορούν να αντιμετωπίσουν. Οι ειδικοί ωστόσο θεωρούν ότι τα εξατομικευμένα εμβόλια μπορούν να είναι αποτελεσματικά σε μία ευρεία κλίμακα καρκίνων, μεταξύ αυτών του καρκίνου του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος και των νεφρών. Οι γιατροί έχουν ξεκινήσει ήδη δοκιμές και για το πρώτο εξατομικευμένο εμβόλιο mRNA για το μελάνωμα, με την ελπίδα της μόνιμης θεραπείας του καρκίνου του δέρματος. Κατά τη φάση 2 των δοκιμών αποδείχθηκε πως τα εμβόλια μειώνουν σημαντικά το ρίσκο του καρκίνου που επανεμφανίζεται σε ασθενείς με μελάνωμα. Αρκετές πλατφόρμες εμβολίων νεοαντιγόνων αξιολογούνται σε κλινικές δοκιμές για κακοήθειες όπως το μελάνωμα, ο καρκίνος του παγκρέατος, ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του πνεύμονα και το γλοιοβλάστωμα, μεταξύ άλλων. Από τις πολλές προσεγγίσεις που διερευνώνται, τα προγράμματα εμβολίων κατά του καρκίνου υφίστανται αναγέννηση λόγω της τεχνολογικής προόδου και της εξατομικευμένης φύσης του σύγχρονου σχεδιασμού τους. Τα εμβόλια νεοαντιγόνων είναι μια μορφή ανοσοθεραπείας που περιλαμβάνει τη χρήση DNA, mRNA και πρωτεϊνών που προέρχονται από μεταλλάξεις που ανιχνεύονται σε δείγματα ιστού όγκου ασθενών για να διεγείρουν την ειδική για τον όγκο αντιδραστικότητα Τ-κυττάρων που οδηγεί στην ενίσχυση της στόχευσης του όγκου. Το γλοιοβλάστωμα (GBM) παραμένει ένας από τους πιο δύσκολους καρκίνους για θεραπεία. Υπάρχουν περίπου 13.000 νέες περιπτώσεις που διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο με μέση επιβίωση λιγότερο από 15 μήνες, καθιστώντας το GBM τον πιο κοινό και θανατηφόρο πρωτοπαθή καρκίνο του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) στους ενήλικες. Η παρούσα κλινική μελέτη TAMAVAC αφορά τη μελέτη των νεοαντιγόνων ως θεραπευτικών στόχων η οποία έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, με τη συνήθη εφαρμογή εργαλείων τεχνητής νοημοσύνης (AI) που θα βελτιστοποιούν τις αλληλουχίες αμινοξέων που θα βρίσκονται στα εμβόλια TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Ra2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) VACCINE ως μια εναλλακτική λύση λήψης αποφάσεων για την εξαγωγή πολύτιμων πληροφοριών από κλινικά δεδομένα για τη δημιουργία εμβολίων με μεγαλύτερη ισχύ και σταθερότητα, που θα μπορούσαν να φτάσουν σε όλο τον κόσμο. Σε αυτήν την κλινική μελέτη, θα εξετάσουμε λεπτομερώς την ταυτοποίηση των νεοαντιγόνων, MS PCR—methylation-specific PCR; NGS—next generation sequencing; TAS—targeted analysis sequencing; WES—whole exome sequencing; WGS—whole genome sequencing, ddPCR—droplet digital PCR; MAF—mutant allelic frequency; EpCAM—epithelial cell adhesion molecule; FISH—fluorescence in situ hybridization; qPCR—quantitative polymerase chain reaction τις πρώιμες εμπειρίες που στοχεύουν αυτούς τους επιτόπους σε κλινικές μελέτες εμβολίων TAMAVAC και μερικές από τις μελλοντικές κατευθύνσεις που είναι απαραίτητες για την επιτάχυνση της περαιτέρω ανάπτυξης αυτού του τομέα. Ο πρωταρχικός στόχος αυτής της κλινικής μελέτης είναι να αξιολογήσει την ασφάλεια, την ανεκτικότητα και την αποτελεσματικότητα των Εμβολίων TAMAVAC σε ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα (GB) που χρησιμοποιούν προσεγγίσεις ανοσογονιδιοματικής καρκίνου στο γλοιοβλάστωμα, διερευνώντας τα ειδικά για τη νόσο αντιγόνα όγκου του ιδίου του ασθενή (όπως τα νεοαντιγόνα), δηλαδή τα μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και διακρίνονται από τα φυσιολογικά κύτταρα για το σχεδιασμό αποτελεσματικών και εξατομικευμένων στρατηγικών εμβολιασμού κατά του καρκίνου. Αυτό το φαρμακευτικό προϊόν θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο από έμπειρους νευροχειρουργούς ειδικούς στις επεμβάσεις κακοήθων γλοιωμάτων και με εις βάθος γνώση της λειτουργικής ανατομίας του εγκεφάλου οι οποίοι έχουν παρακολουθήσει και συμπληρώσει εκπαίδευση στη χειρουργική με φθορίζουσα καθοδήγηση. Η εργασία περιλαμβάνει το πειραματικό μέρος, στο οποίο παρατίθενται η σύνθεση των In-Silico σχεδιασμένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων των (TAMAVAC-TM) -TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Ra2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) πεπτιδικών αναλόγων και τα βιολογικά αποτελέσματα των κλινικο-εργαστηριακών συσχετίσεων των επιπέδων της κλινικής ανταπόκρισης μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των MTOR, JAK1, FUBP1, JAK3, AKT2, CIC, H3F3A, ACVR1, IDH1, PDGFRA, TERTp, EGFR, CDK6, BRAF, FGFR1, CDKN2A/2B, PTEN, CCND1, ATM, CDK4, MDM2, RB1, IDH2, TP53, MAP2K4, NF1, CDK12, ATRX όπως και των επιπέδων της διαφορετικής έκφρασης των miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210 στον ιστό και το πλάσμα αυτών των ασθενών με νεοδιαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα. Σε αυτή την κλινική μελέτη γίνεται αναφορά στη μοριακή βάση της ανοσίας, δηλαδή στην ικανότητα του οργανισμού να αμύνεται στην επίδραση διαφόρων αντιγόνων. Αυτή η κλινική μελέτη αυτό αναφέρεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στην ανοσολογική απόκριση που ελέγχεται από την ενεργοποίησή τους. Επισημαίνεται η σημαντικότητα του καθορισμού πολλών αντιγόνων καρκινικών κυττάρων που αναγνωρίζονται από Τ κύτταρα και συγκεκριμένα των καρκινικών αντιγόνων των MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Ra2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8. Επίσης, γίνεται αναφορά στην ασθένεια του **νεοδιαγνωσμένου γλοιοβλαστώματος** και στην καταπολέμηση αυτού μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς επίσης και στα νεοαντιγονικά αντικαρκινικά πεπτιδικά εμβόλια. Σε αυτή την κλινική μελέτη περιγράφονται οι μέθοδοι ενίσχυσης της αντιγονικότητας / ανοσογονικότητας των **ανανεμιγμένων** νεοεπιτοπικών πεπτιδίων του εξατομικευμένου νεοαντιγονικού εμβολίου του TAMAVAC-TM με τα TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2,

105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8). Ιδιαίτερη αναφορά γίνεται στη χρήση γενετικών αλγορίθμων ελεύθερης ενέργειας μοριακής πρόσδεσης, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για να προβλεφθεί και να ελεγχθεί η ενίσχυση της αντιγονικότητας / ανοσογονικότητας των νεοαντιγονικών επιτόπων TAMAVAC-TM.

Υπολογιστικές μελέτες πρόβλεψης και ανάπτυξης νέων εργαλείων και μεθοδολογιών σχεδιασμού νέων δραστικών ανοσογονικών νεοαντιγονικών πεπτιδικών μορίων

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας που αντιμετωπίζουν οι ανεπτυγμένες χώρες είναι ο καρκίνος. Η πολυπλοκότητα της ασθένειας καθιστά πολύ δύσκολη την αντικαρκινική θεραπεία και κυρίως τη χημειοθεραπεία καθώς, τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα αντιμετωπίζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Επιπλέον η διαδικασία εύρεσης νέων φαρμάκων είναι κοστοβόρα και χρονοβόρα με αποτέλεσμα να έχει στραφεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σε διαφορετικές προσεγγίσεις. Η Κλινική αυτή μελέτη έχει ως βασικό αντικείμενο την ανάπτυξη νέων υπολογιστικών μεθόδων και αλγορίθμων με στόχο το σχεδιασμό νέων πεπτιδικών μοριακών δομών με βελτιωμένα ανοσογονικά χαρακτηριστικά (δραστικότητα / ιδιότητες) εστιάζοντας κυρίως στην κατανόηση της συσχέτισης μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών και της δραστηριότητας / ιδιοτήτων που εμφανίζουν τα νέα συνθετικά πεπτιδικά μόρια, πληροφορίες οι οποίες δε θα πρέπει να αγνοούνται κατά το στάδιο του σχεδιασμού νέων εμβολίων-φαρμάκων. Η ανάπτυξη νέων εργαλείων και μεθοδολογιών σχεδιασμού νέων δραστικών πεπτιδικών μορίων και συμπλόκων μέσω ηλεκτρονικών υπολογιστών (Computer Aided Molecular Design- CAMD), που θα ελαχιστοποιήσουν τον παράγοντα τύχη και τα χρονοβόρα και δαπανηρά πειράματα της σύνθεσης και του βιολογικού ελέγχου νέων ουσιών, αποτελεί έναν από τους ουσιαστικούς στόχους της προσπάθειας αυτής. Σε αυτό το μέρος της κλινικής μελέτης θα γίνεται μια κβαντομοριακή ποσοτικοποίηση των σχέσεων μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών και της δραστηριότητας / ιδιοτήτων των μορίων, παρουσιάζονται οι βασικότεροι δείκτες που χρησιμοποιούνται ως μεταβλητές στις ποσοτικές αναλύσεις και επιπλέον παρουσιάζονται μεθοδολογίες επιλογής μεταβλητών, μοντελοποίησης και εικονικού βιολογικού ελέγχου. Στο ίδιο μέρος θα παρουσιάζεται η αντιμετώπιση συγκεκριμένων προβλημάτων μοντελοποίησης, πρόβλεψης και εικονικού ελέγχου. Κατά την αναζήτηση της βέλτιστης μεθοδολογίας σε κάθε περίπτωση θα αναλυθούν και θα αξιολογηθούν όλα τα διαθέσιμα δεδομένα με στόχο την εύρεση της καταλληλότερης υπολογιστικής προσέγγισης για την επίλυση ενός συγκεκριμένου προβλήματος, του σχεδιασμού ενός σύμπλοκου αντιγονο-παρασυστατικών TAMAVAC-TM πεπτιδίων **ανανεμιγμένων** με-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) σε συνδυασμό με Bevacizumab 10mg/kg, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα, αυτόλογη δενδριτική ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Συγκεκριμένα θα αναπτυχθούν και θα δημοσιευτούν ποσοτικές σχέσεις δομής- τοξικότητας (QSTR, Quantitative Structure Toxicity Relationships) για την τοξικότητα της αλληλεπίδρασης των νεο-αντιγονικών πεπτιδίων με τα φάρμακα της Bevacizumab 10mg/kg, της Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα, και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab, ποσοτικές σχέσεις δομής-δραστικότητας (QSAR, Quantitative Structure Activity Relationships), και εικονικού βιολογικού ελέγχου για την αναστολή της πρόσδεσης έπι των υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των AKT1, ALK, APC, AR, ARAF, ATM, ATRX, BARD1, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, CIC, CTNNB1, DDR2, DICER1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FLT3, FOXA1, FOXL2, FUBP1, GATA3, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, IDH1, IDH2, JAK2, KEAP1, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MTOR, NBN, NF1, NPM1, NRAS, NTRK1, PALB2, PDGFRA, PIK3CA, PIK3CB, PMS2, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RAF1, RET, RUNX1, SMAD4, SPOP, STK11, TERT και TP53 όπως και των επιπέδων διαφορικής έκφρασης των miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210 μικρο-γονιδίων στόχων. Σε όλες τις περιπτώσεις θα παρουσιάσει η διαδικασία αξιολόγησης του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Επίσης, βασικό σκοπός αυτής της κλινικής μελέτης είναι να εξαχθούν συμπεράσματα για τους μηχανισμούς με τους οποίους οι χημικές ουσίες που εμπεριέχονται στα Νεοαντιγονικά Εμβόλια TAMAVAC-TM-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) VACCINE σε συνδυασμό με Bevacizumab 10mg/kg, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα, αυτόλογη δενδριτική ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab θα μπορούν να τροποποιούν τη λειτουργία των πρωτεϊνών των TERC, TERT, EGFR, CCDC26, CDKN2B, PHLDB1, TP53 και RTEL1 όπως και των RRM1 και RRM2 σε κυτταρολογικά παρασκευασματα ογκών ασθενών με νεοδιαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα, δημιουργώντας ένα ρόλο ανοσο-φαρμακευτικής δράσης. Στην παρούσα κλινική μελέτη θα γίνει χρήση ενός επιλεγμένου δείγματος τριδιάστατων δομών από την PDB (Protein Data Bank) με σκοπό να διερευνηθεί η παρουσία γενικών κανόνων και σχέσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε in silico σχεδιασμό εμβολίων-φαρμάκων. Θα γίνει συνδυασμός μιας μεγάλης ποικιλίας τεχνικών όπως: νευρωνικών δικτύων, στατιστικής ανάλυσης, περιγραφικής ανάλυσης τριδιάστατων δομών **ανανεμιγμένων** πεπτιδίων TAMAVAC-TM, μοριακών προσομοιώσεων, ενεργειακών υπολογισμών (που συνήθως χρησιμοποιούνται μεμονωμένες). Στα πλαίσια της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να δοκιμαστεί ένα μεγάλο εύρος υπολογισμών που παλινδρομήθηκαν με τα θερμοδυναμικά κατώφλια (που προέκυψαν μετά από προσομοίωση και μετά από

προσομοίωση και ενεργειακή ελαχιστοποίηση) προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο διάφορων μηχανισμών που ενδεχομένως ερμηνεύουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών στόχων TERC, TERT, EGFR, CCDC26, CDKN2B, PHLDB1, TP53 και RTEL1 με τις χημικές δομές των συνθετικών TAMAVAC-TM υποκαταστάτων και του φαρμακού της Τεμοζολομίδης. Στα πλαίσια της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται θα επισημανθούν κάποιοι ισχυροί μηχανισμοί στον σχηματισμό των παρατηρούμενων ενεργειακών κατωφλίων όπως είναι το μέγεθος του θύλακα σε σχέση με το αριθμό ατόμων του υποκαταστάτη και των μορίων νερού, η αναλογία υδρόφοβων αμινοξέων προς πολικά, οι αναλογίες των διάφορων τύπων ατόμων του υποκαταστάτη, η αναλογία ατόμων νερού προς άτομα υποκαταστάτη στο θύλακα και η παρουσία ακινητοποιημένων μορίων νερού. Στα πλαίσια της πορείας της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να συνδεθεί η σημασία των ακινητοποιημένων μορίων νερού με τη διαμερισματοποίηση του θύλακα κατά την αλληλεπίδραση με τον υποκαταστάτη σε περιοχές ισχυρής και μη ισχυρής πρόσδεσης (ή ακόμη και απώθησης) και έτσι θα εξεταστεί η συμβολή των ακινητοποιημένων μορίων νερού στη διαφοροποίηση του μηχανισμού αγωνιστή – ανταγωνιστή των μοριακών υποδοχέων και γονιδιακών στόχων των TERC, TERT, EGFR, CCDC26, CDKN2B, PHLDB1, TP53 και RTEL1. Τα αποτελέσματα αναμένεται να παρουσιάζουν ισχυρή στατιστική σημαντικότητα παρά το μικρό σχετικά δείγμα. Κατόπιν τα αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νευρωνικού δικτύου με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο είναι ικανά να προβλέψουν τη σύσταση και την ανοσογονική δράση του υποκαταστάτη νεοαντιγονικού πεπτιδίου TAMAVAC-TM. Για αυτό τον λόγο περιπτώσεις από τους υποκαταστάτες **ανανεμιγμένων** νεοαντιγονικών πεπτιδίων TAMAVAC-TM με TAAs θα τεθούν εκτός των ομάδων προπόνησης (training) και αξιολόγησης (validating) του νευρωνικού δικτύου, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η ανοσογονική πρόβλεψη πλησιάζει την πραγματική σύσταση των υποκαταστατών των **ανανεμιγμένων** νεοαντιγονικών πεπτιδίων TAMAVAC-TM με TAAs με τη μέγιστη αντιγόνο-παρουσιαστική δράση και φαίνεται ότι τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Στο τέλος θα εξεταστούν προοπτικές επέκτασης των ανοσογονικών προβλέψεων με νευρωνικά δίκτυα, με σκοπό την πρόβλεψη αν ένας υποκαταστάτης νεοαντιγονικών πεπτιδίων TAMAVAC-TM αποτελεί αγωνιστή ή ανταγωνιστή υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των AKT1, ALK, APC, AR, ARAF, ATM, ATRX, BARD1, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, CIC, CTNNB1, DDR2, DICER1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FLT3, FOXA1, FOXL2, FUBP1, GATA3, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, IDH1, IDH2, JAK2, KEAP1, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MTOR, NBN, NF1, NPM1, NRAS, NTRK1, PALB2, PDGFRA, PIK3CA, PIK3CB, PMS2, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RAF1, RET, RUNX1, SMAD4, SPOP, STK11, TERT και TP53 αλλά και των miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210 στοχεύοντας ταυτόχρονα τα πρωτεϊνικά μοριακά μονοπάτια των 1p/19q co-deletion, AR, CDKN2A, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KIT, KRAS, MET, MYC, MYCN, PIK3CA, PTEN, RB1, TP53, ALK, BRAF, FGFR3, NTRK1, NTRK2, NTRK3, RET, ROS1, TERC, TERT, EGFR, CCDC26, CDKN2B, PHLDB1, TP53, RTEL1, και TMPRSS2 τα οποία ανιχνεύθηκαν στον ιστό και το πλάσμα ασθενών με γλοιοβλάστωμα Βαθμού IV λαμβάνοντας υπόψιν και την παράμετρο των ακινητοποιημένων μορίων νερού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το εμβόλιο νεοαντιγόνου, βασισμένο σε εξατομικευμένες μεταλλάξεις DNA όγκου, θα μπορούσε να προκαλέσει ειδική διήθηση Τ κυττάρων όγκου στο σημείο του όγκου, ασκώντας ισχυρή αποτελεσματικότητα κατά του όγκου. Σε αυτή την κλινική μελέτη θα αξιολογηθεί η σκοπιμότητα και η ασφάλεια μιας νέας στρατηγικής συνδυαστικής αντικαρκινικής θεραπείας προσθέτοντας εμβόλιο νεοαντιγόνου στο σχήμα του bevacizumab και του αντισώματος αντι-PD-1. Πρώτον, 15-27 νέο-ανοσογονικά νέο-επιτοπικά συνθετικά πεπτιδία νεοαντιγόνου εντοπίστηκαν και αναπτύχθηκαν για το εμβόλιο νεοαντιγόνου (TAMAVAC-TM), το οποίο μπορεί να προκαλέσει ισχυρή αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση in vivo. Η κλινική μελέτη περιλαμβάνει επίσης βιολογικά πειράματα (FACS ανάλυση και ELISA) για τη μελέτη της ενεργοποίησης Τ κυττάρων με αυτόλογα δενδριτικά κύτταρα που έχουν προεπωασθεί με τα (TAMAVAC-TM) -παράγωγα. Μετά τη χειρουργική επέμβαση, οι ασθενείς θα λάβουν συμβατική ακτινοθεραπεία που θα χορηγείται στα 180–200 cGy ανά κλάσμα ημερησίως για πέντε ημέρες την εβδομάδα σε ένα σύνολο περίπου 60 Gy. Εξατομικευμένα εμβόλια νεοαντιγόνου TAMAVAC VACCINE θα παρασκευαστούν χρησιμοποιώντας πληροφορίες από φρέσκο όγκο ή από εγκλεισθέντα σε κύβους παραφίνης (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) που λαμβάνονται κατά τη στιγμή της διαγνωστικής εκτομής, όπως περιγράφεται παρακάτω. Το εμβόλιο θα χορηγηθεί υποδορίως τουλάχιστον επτά έως δώδεκα εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της εξωτερικής ακτινοθεραπείας. Το εμβόλιο TAMAVAC VACCINE θα εφαρμοστεί κατά τη διάρκεια των κύκλων χορήγησης Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας χημειοακτινοβολίας (CRT) σε συνδυασμό με γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές, με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, και αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία με tumor-lysate pulsed DCs. Ξεκινώντας την ημέρα 14 πριν από τον πρώτο κύκλο χορήγησης των Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, οι ασθενείς από την **Ομάδα μελέτης Ασθενών (Group 29 Ασθενών) Ομάδα μελέτης Ασθενών (Group 29 Ασθενών)** θα λάβουν 7 εμβολιασμούς με εμβόλια TAMAVAC VACCINE για 7 εβδομάδες. Θα χρησιμοποιηθούν 900 μg ανά πεπτιδίο, ακολουθούμενα από δύο αναμνηστικές δόσεις οκτώ και δεκαέξι εβδομάδες αργότερα. Για κάθε δόση, οι δεξαμενές εμβολίων θα χορηγούνται εντός έξι ωρών από την απόψυξη σε ένα από τα τέσσερα έως και τέσσερα άκρα. Οι ασθενείς θα εμβολιαστούν επανειλημμένα με τα

εμβόλια TAMAVAC VACCINE σε κάθε κύκλο χορήγησης με Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες σε συνδυασμό με γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, και αυτόλογη δενδριτική **DCTs** ανοσοθεραπεία με tumor-lysate pulsed DCs. Θα επιτρέπονται ταυτόχρονα φάρμακα που κρίνονται απαραίτητα για την επαρκή φροντίδα του ασθενούς, συμπεριλαμβανομένων των ταυτόχρονων κορτικοστεροειδών για συμπτώματα που σχετίζονται με εγκεφαλικό οίδημα. Τα εμβόλια της μελέτης θα χορηγηθούν ακόμα και σε ασθενείς που χρειάζονται περισσότερα από 4 mg δεξαμεθαζόνης την ημέρα εντός επτά ημερών από την έναρξη της χορήγησης των εμβολίων TAMAVAC VACCINE. Η κλινική αξιολόγηση και παρακολούθηση θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τα κριτήρια RANO για την Αξιολόγηση Ανοσοθεραπείας Απόκρισης Νευρο-Ογκολογικού Ασθενή.

Σχεδιασμός της μελέτης-Δοσολογία

Οι ασθενείς θα λάβουν:

□7 (επτά) κύκλους ανανεμιγμένων TAAs πεπτιδίων με In-Silico σχεδιασμένα και κβαντομοριακώς κατηγοριοποιημένα νεοαντιγονικά και εξατομικευμένα Εμβόλια, τα TAMAVAC-TM, σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, DCTs / (CD8+ / CD4+) TILs και Pembrolizumab (TAMAVAC-TM / Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, και Pembrolizumab, ομάδα Α) ,

Η μελέτη θα πραγματοποιηθεί σε ένα στάδιο:

- Στο στάδιο αυτό θα ενταχθούν 29 ασθενείς οι οποίοι θα αποτελούν την **Ομάδα μελέτης Ασθενών (Group 29 Ασθενών)** και θα εμβολιασθούν με 7 (επτά) κύκλους TAMAVAC-TM σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, **DCTs** και με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, και πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών με βάση τη μοριακή υπογραφή του όγκου του κάθε ασθενή. Από την Ομάδα αυτή βιοπτικό υλικό (FFPE) κατάλληλο για ανάλυση με NGS και η γονοτυπική ανάλυση θα πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr χρησιμοποιώντας το ειδικά σχεδιασμένο για GB πάνελ της illumina.

Στα πλαίσια διενέργειας της παρούσας κλινικής μελέτης το TAMAVAC-TM σε περαιτέρω συνδυασμό με bevacizumab και αντίσωμα αντι-PD-1 αναμένεται να ασκήσει ισχυρότερη αντικαρκινική δράση, παρουσιάζοντας σημαντική μείωση του όγκου του όγκου χωρίς προφανή τοξικότητα. Επιπλέον, η αξιολόγηση του ανοσοποιητικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου αναμένεται να αποδείξει επίσης ότι η αναλογία των ειδικών για το νεοαντιγόνο T κυττάρων στο αίμα θα μπορούσε να προκληθεί δραματικά από τη συνδυασμένη θεραπεία. Η έκφραση συγκεκριμένων βιοδεικτών από τα καρκινικά κύτταρα αποτελεί βασική προϋπόθεση στην αποτελεσματική εφαρμογή των ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αξίας της ανίχνευσης των βιοδεικτών PD-1 και PD-L1 στην αποτελεσματική εφαρμογή της ανοσοθεραπείας σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα μέσω των βιβλιογραφικών αναφορών. Στο πλαίσιο αυτό, γίνεται εκτεταμένη αναφορά στον καρκίνο του γλοιοβλαστώματος και στους μηχανισμούς με τους οποίους τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ανοσία και διαφεύγουν από τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος. Ακόμα, τονίζεται η σπουδαιότητα της ανακάλυψης και της κατανόησης της λειτουργίας των μορίων PD 1 και PD-L1, στην εξέλιξη του τομέα της ανοσοθεραπείας. Ο αποκλεισμός των μορίων αυτών, μέσω ειδικά σχεδιασμένων ανασταλτικών φαρμάκων, αποτελεί μία από τις βασικές μεθόδους ανοσοθεραπείας που χρησιμοποιείται σήμερα στην κλινική πράξη. Η παρουσία των βιοδεικτών PD-1 και PD-L1 χρησιμοποιείται σε πολλές κλινικές μελέτες, ως κατευθυντήριος οδηγός για την χορήγηση ποικίλων ανασταλτικών φαρμάκων, σε ασθενείς με καρκίνο προχωρημένου σταδίου.

Στόχος αυτής της μελέτης είναι η σύγκριση κάθε στοχευμένης θεραπείας ξεχωριστά (Pembrolizumab, TAMAVAC-TM& DCTs) συγχωρηγούμενη με την κλασική χημειοθεραπεία των Bevacizumab 10mg/kg και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα, με το συνδυασμό τους και σε σύγκριση με την κυτταροτοξική χημειοθεραπεία μόνη της σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα, μετά από χορήγηση αυτών των παραγόντων και ως θεραπεία συντήρησης. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, θα αξιολογηθεί ο ρόλος της ακτινολογικής απάντησης των ασθενών στη συνδυαστική χημειοθεραπεία / ανοσοθεραπεία ως προγνωστικός παράγοντας. Τέλος, θα διενεργηθεί προσδιορισμός των επιπέδων της κλινικής ανταπόκρισης με τη χρήση της μεθόδου ενζυμο-συνδεδεμένης ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για την αξιολόγηση και διερεύνηση της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας των ασθενών που εμβολιάστηκαν με TAMAVAC VACCINES αλλά και μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των MTOR, JAK1, FUBP1, JAK3, AKT2, CIC, H3F3A, ACVR1, IDH1, PDGFRA, TERTp, EGFR, CDK6, BRAF, FGFR1, CDKN2A/2B, PTEN, CCND1, ATM, CDK4, MDM2, RB1, IDH2, TP53, MAP2K4, NF1, CDK12, ATRX όπως και των επιπέδων της διαφορικής έκφρασης των miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210 στον ιστό και το πλάσμα αυτών των ασθενών με νεοδιαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα. Στόχος της παρούσας Κλινικής Μελέτης θα αποτελεί η κλινική αξιολόγηση της Θεραπευτικής Αποτελεσματικότητας των In-Silico σχεδιασμένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων TAMAVAC-TM-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Ra2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) VACCINE σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα σε συνδυασμό με Bevacizumab 10mg/kg, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα, αυτόλογη

δενδριτική ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab, όπως και η κλινική συσχέτιση αυτών με το διάστημα επιβίωσης χωρίς υποτροπή της νόσου και την συνολική επιβίωση των ασθενών με νεοδιαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα. Δεδομένων των παραπάνω, ο στόχος της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να είναι η ανάλυση της έκφρασης και η διαλεύκανση του ρόλου των AKT1, ALK, APC, AR, ARAF, ATM, ATRX, BARD1, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, CIC, CTNNB1, DDR2, DICER1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FLT3, FOXA1, FOXL2, FUBP1, GATA3, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, IDH1, IDH2, JAK2, KEAP1, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MTOR, NBN, NF1, NPM1, NRAS, NTRK1, PALB2, PDGFRA, PIK3CA, PIK3CB, PMS2, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RAF1, RET, RUNX1, SMAD4, SPOP, STK11, TERT και TP53 όπως και των κυκλοφορούντων miRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης σε ασθενείς με νεοδιαγνωσμένο γλοιοβλάστωμα που τους χορηγήθηκαν εξατομικευμένα νεοαντιγονικά εμβολία TAMAVAC-TM-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Ra2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) VACCINE σε συνδυασμό με bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δενδριτική ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Η συλλογή και επεξεργασία των κύβων παραφίνης θα διενεργηθούν στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr και για τις τρεις Ομάδες μελέτης. Όλα τα παραπάνω θα πραγματοποιηθούν από συνεργαζόμενο με την Ογκολογική Ομάδα που θα συμμετέχει στην παρούσα κλινική μελέτη παθολογοανατόμο. Η ανάλυση του γονιδίου MGMT θα πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr (Θεσσαλονίκη, Ελλάδα). Η μελέτη θα λάβει έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος των Ογκολογικών Κλινικών της παρούσας κλινικής μελέτης που συνεργάζονται με Ογκολογικές Ομάδες της Ελλάδας ή και του εξωτερικού και θα πραγματοποιηθεί με βάση τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Όλοι οι ασθενείς που θα συμμετέχουν στη μελέτη θα λάβουν και θα υπέγραψουν ειδικό έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης για τη χρήση βιολογικού υλικού και τη χρησιμοποίησή του σε μελλοντικές μελέτες (informed consent).

Αναλυτική Περιγραφή

Λεπτομέρειες σχεδίασης

ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Στην παρούσα μελέτη θα ενταχθούν συνολικά 29 ασθενείς με διάγνωση γλοιώματος υψηλού βαθμού κακοήθειας (βαθμού 3 και 4), οι οποίοι νοσηλεύονται σε ογκολογικές κλινικές που θα συμμετέχουν στην παρούσα κλινική μελέτη και συνεργάζονται με Ογκολογικές Ομάδες της Ελλάδας και του εξωτερικού. Οι ασθενείς διαγνώστηκαν με γλοίωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας κατά τα έτη 2025-2026. Τα κλινικά δεδομένα θα είναι διαθέσιμα από το γραφείο συλλογής δεδομένων των ογκολογικών κλινικών που θα συμμετέχουν στην παρούσα κλινική μελέτη και που συνεργάζονται με Ογκολογικές Ομάδες της Ελλάδας ή και του εξωτερικού. Οι ασθενείς που θα συμμετέχουν στη μελέτη θα υπογράψουν γραπτή συγκατάθεση πριν από την εκάστοτε γενετική/μοριακή ανάλυση και εμβολιασμό μετά από σχετική ενημέρωση. Κατά τη διάρκεια της κλινικής μελέτης θα καταγράφονται αναδρομικά τα κλινικά δεδομένα ενδιαφέροντος των ασθενών (ηλικία, φύλο, εντόπιση όγκου, είδος χειρουργείου) και τα δεδομένα παρακολούθησης (follow-up), όπως η ημερομηνία υποτροπής και η ημερομηνία θανάτου. Το βιολογικό υλικό της μελέτης θα αποτελεί ιστικές τομές προερχόμενες από βιοπτικό υλικό ή/και υλικό χειρουργικών παρασκευασμάτων, φρέσκες ή εγκλεισθείσες σε κύβους παραφίνης (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE).

Έγκλειση ιστών και λήψη τομών

Οι όγκοι που ελήφθησαν από τους ασθενείς, θα τοποθετηθούν σε PBS και έπειτα θα μονιμοποιηθούν με PFA 4% για 16 ώρες στους 40 C. Η περαιτέρω επεξεργασία τους σχετίζεται με το αν θα προορίζονται για λήψη κρυοτομών ή τομών παραφίνης.

Λήψη τομών με κρυοτόμο

Για να προστατευθούν ευαίσθητοι επίτοποι που καταστρέφονται (cross-linking) με την παραφινποίηση, προτιμάται η λήψη κρυοτομών. Μετά τη μονιμοποίηση, τα δείγματα θα εκπλένονται με PBS και εν συνεχεία θα διατηρούνται για 1-2 μέρες σε σουκρόζη 30% η οποία λειτουργεί κρυοπροστατευτικά. Έπειτα, θα τοποθετούνται σε ειδικές θήκες-μήτρες και εμποτίζονται με το ειδικό υλικό OCT για φύλαξη σε χαμηλές θερμοκρασίες (Optimal Cutting Temperature) και θα φυλάσσονται στους -80°C. Η μήτρα ιστού-OCT θα κόβεται στον κρυοστάτη σε τομές 10-20 μm, οι οποίες θα τοποθετούνται σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες (cryofrost plus). Θα αφήνονται για 45' σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια θα φυλάσσονται στους -80°C. Πριν την εφαρμογή του ανοσοφθορισμού θα αγίνονται για να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες. Οι τομές θα

μονιμοποιήθούν αφού εμβαπτισθούν σε κρύα ακετόνη (-20ο C) για 5', θα στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου 5-10' και ύστερα θα εκπλυθούν σε PBS.

Λήψη τομών με μικροτόμο

Έπειτα της μονιμοποίησης, θα ακολουθείται έκπλυση με PBS και εν συνεχεία τοποθέτηση των ιστών σε διάλυμα αιθανόλης 70% για 1-2 μέρες. Ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωση του ιστού με μια σειρά από διαδοχικές επώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH), ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση της παραφίνης. Η πορεία των επώσεων είναι η εξής: EtOH 70% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά EtOH 85% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά EtOH 95% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά EtOH 100% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά. Τα διαλύματα αιθανόλης θα παρασκευάζονται φρέσκα, ώστε να μην τροποποιείται η συγκέντρωση της αιθανόλης λόγω εξάτμισης. Παράλληλα η λιωμένη παραφίνη θα φιλτράρεται μέσα από χαρτί χρωματογραφίας Whatman 3M, ώστε να συγκρατηθούν τυχόν αδιάλυτα τμήματα και σκουπίδια. Συγχρόνως θα προθερμαίνεται κατάλληλη ποσότητα ξυλενίου για το επόμενο στάδιο. Ο αφυδατωμένος ιστός θα επωάζεται στη συνέχεια 2 φορές με 100% ξυλένιο, σε απαγωγό, για 20 λεπτά (RT). Θα ακολουθεί επώση με διάλυμα ξυλενίου / παραφίνης (1:1), στους 65ο C για 45 λεπτά. Τελικά ο ιστός θα εμβαπτίζεται σε 100% παραφίνη (x 3) στους 65ο C και θα επωάζεται για 20 λεπτά ανά εμβάπτιση. Η τελευταία επώση με την παραφίνη θα πραγματοποιείται στο δοχείο όπου θα παραμείνει για να σχηματιστεί το καλούπι ιστού-παραφίνης. Όσο η παραφίνη είναι ακόμα υγρή, θα διευθετείται ο ιστός στο κέντρο του δοχείου και θα αφήνεται μετά το τέλος της τελευταίας 20λεπτης επώσης να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (O/N). Τα καλούπια φυλάσσονται στους 4ο C όπου διατηρούνται για αρκετό διάστημα. Για τη λήψη τομών ακολουθούνται τα εξής στάδια : Τοποθετούμε το καλούπι με τον ιστό στην ειδική υποδοχή του μικροτόμου παραφίνης. Ρυθμίζουμε το πάχος των τομών που θέλουμε να πάρουμε (5μm-15μm) Οι τομές αυτές θα τοποθετούνται αρχικά σε κρύο νερό. Εν συνεχεία θα τις μεταφέρουμε τη βοήθεια ενός πινέλου σε ένα υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50ο C, προκειμένου να ξετυλιχτούν και να τοποθετηθούν στις αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης. Οι τομές θα αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου (25ο C) για 24 ώρες. Για να πραγματοποιηθεί ο ανοσοφθορισμός, θα πρέπει πρώτα να γίνει η αποπαραφινοποίηση. Για την αποπαραφινοποίηση των ιστών οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές θα τοποθετούνται σε ένα γυάλινο δοχείο με ξυλένιο όπου και θα παραμένουν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα οι ιστοί θα ενυδατώνονται σταδιακά με εμβάπτιση σε μια σειρά από διαδοχικές ελλατούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH), ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση του υδατικού διαλύματος μέσα στους ιστούς. Η πορεία των επώσεων θα είναι η εξής: EtOH 100 % RT, 10 λεπτά EtOH 95 % RT, 10 λεπτά EtOH 70 % RT, 10 λεπτά EtOH 50 % (x 2 φορές), RT, 10 λεπτά PBS 1X, RT, 10 λεπτά.

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, η μελέτη θα πραγματοποιηθεί σε ένα στάδιο. Στο στάδιο αυτό θα ενταχθούν 29 ασθενείς οι οποίοι θα αποτελούν την Ομάδα μελέτης Ασθενών (Group 29 Ασθενών) και θα εμβολιασθούν με το TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με TMZ και bevacizumab, αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτοί είναι διαθέσιμοι, και πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών με βάση τη μοριακή υπογραφή του όγκου του κάθε ασθενή. Από την Ομάδα αυτή βιοπτικό υλικό (FFPE) κατάλληλο για ανάλυση με NGS θα είναι διαθέσιμο και για τους 29 ασθενείς και η γονοτυπική ανάλυση θα πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr χρησιμοποιώντας το ειδικά σχεδιασμένο για γλοιώματα πάνελ της illumina. Η συλλογή και επεξεργασία των κύβων παραφίνης θα διενεργηθούν στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr όπου η αρχική επεξεργασία θα αφορά στην ιστολογική ανασκόπηση των τομών, συμπεριλαμβανομένων της παρουσίας καρκινικών κυττάρων στο παρασκεύασμα, του ποσοστού της νέκρωσης, του ποσοστού Ki67, του βαθμού διαφοροποίησης, της ενδοθηλιακής υπερπλασίας και της επιλογής των περιοχών του όγκου για μακροεκτομή. Όλα τα παραπάνω θα πραγματοποιηθούν από συνεργαζόμενο με την Ογκολογική Ομάδα που θα συμμετέχει στην παρούσα κλινική μελέτη παθολογοανατόμο. Η ανάλυση του γονιδίου MGMT θα πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr (Θεσσαλονίκη, Ελλάδα). Η μελέτη θα λάβει έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος των Ογκολογικών Κλινικών της παρούσας κλινικής μελέτης που συνεργάζονται με Ογκολογικές Ομάδες της Ελλάδας ή και του εξωτερικού και θα πραγματοποιηθεί με βάση τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Όλοι οι ασθενείς που θα συμμετέχουν στη μελέτη θα λάβουν και θα υπέγραψουν ειδικό έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης για τη χρήση βιολογικού υλικού και τη χρησιμοποίησή του σε μελλοντικές μελέτες (informed consent).

Επεξεργασία ιστών και απομόνωση DNA

Τα δείγματα ιστών φρέσκων ή εγκλεισμένων σε κύβους παραφίνης (FFPE) θα ελεγχθούν μέσω ιστολογικής εξέτασης χρώσης αιματοξυλίνης-εωσίνης, για να διαπιστωθεί ότι ανταποκρίνονται στον ζητούμενο ιστολογικό τύπο και για να αξιολογηθεί το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων στο παρασκεύασμα και το ποσοστό της νέκρωσης. Θα ακολουθήσει μακροεκτομή χειροκίνητα από μη χρωματισμένες τομές πάχους 10μm πριν από την απομόνωση του DNA. Η απομόνωση του DNA από τις τομές των ιστών θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) για τα δείγματα των ασθενών της Ομάδας μελέτης Ασθενών (Group 29 Ασθενών) (Group A) και το επίσης

εμπορικά διαθέσιμο kit Gene Read DNA FFPE (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) για τα δείγματα των ασθενών της Ομάδας μελέτης 2 (Group B), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του DNA θα προσδιορισθεί χρησιμοποιώντας το φωτόμετρο φθορισμού Qubit (Life Technologies, Paisley, UK) και στις δύο Ομάδες. Αναμένεται ότι από τα 29 δείγματα των ασθενών τα 27 θα πληρούν τα κριτήρια για περαιτέρω ανάλυση με τη μεθοδολογία του NGS (ελάχιστη συγκέντρωση DNA 2ng/μl).

Γονοτυπική ανάλυση με τη μεθοδολογία αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS) και δημιουργία DNA βιβλιοθήκης

Η γονοτυπική ανάλυση των όγκων της **Ομάδα μελέτης Ασθενών (Group 29 Ασθενών)** θα πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας των εργαστηρίων myoncotherapy.com της εταιρείας biogenea.gr χρησιμοποιώντας πολυγονιδιακό πάνελ γονιδίων της illumina που στοχεύει τις πιο συχνές και επικρατέστερες μεταλλάξεις όπως έχουν περιγραφεί από τη βάση δεδομένων/Ατλαντας Καρκινικού Γονιδιώματος (The Cancer Genome Atlas, TCGA) στα γλοιοβλαστώματα. Η ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου TERT για τις πιο συχνές μεταλλάξεις (mutation hotspots) θα πραγματοποιηθεί με αλληλούχιση DNA κατά Sanger. Κατά τον σχεδιασμό του πάνελ, η αντιστοίχιση των αναγνώσεων DNA των περιοχών-στόχων που παρήχθησαν από την πρωτοταγή ανάλυση στο ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς (GRCh37/hg19) θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τη ροή διοχέτευσης εντολών διεργασιών Ampliseq (Thermo Fisher Scientific/Ion Torrent) με σκοπό τον σχεδιασμό εκκινητών που οδηγούν στην παραγωγή πολλαπλασιαζόμενων αλληλουχιών-στόχων (amplicons) μεγέθους έως 175 ζευγών βάσεων τα οποία προέρχονται από το DNA που έχει απομονωθεί από τον ιστό των κύβων των εγκλεισμένων σε παραφίνη. Η ειδικότητα των εκκινητών θα αξιολογηθεί περαιτέρω χρησιμοποιώντας το εργαλείο NCBI-BLAST. Το ειδικά σχεδιασμένο πάνελ που θα εφαρμοστεί, IAD68363_167Ampliseq, θα καλύπτει μια συνολική αλληλουχία 31.6 kb στοχεύοντας σημειακές μεταλλάξεις, δηλαδή παραλλαγές του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Variants, SNVs) και απαλείψεις/εισχωρήσεις (Insertions and Deletions, InDels) στα γονίδια των MTOR, JAK1, FUBP1, JAK3, AKT2, CIC, H3F3A, ACVR1, IDH1, PDGFRA, TERTp, EGFR, CDK6, BRAF, FGFR1, CDKN2A/2B, PTEN, CCND1, ATM, CDK4, MDM2, RB1, IDH2, TP53, MAP2K4, NF1, CDK12, ATRX. Το πάνελ αυτό σχεδιάστηκε στην illumina στοχεύοντας γονίδια που εμφανίζουν συχνά μεταλλάξεις στα γλοιώματα υψηλού βαθμού κακοήθειας, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία εκείνης της χρονικής περιόδου. **Θα ακολουθήσει η κατασκευή των DNA βιβλιοθηκών και η γονοτύπηση αυτών θα πραγματοποιηθεί μέσω της μεθοδολογίας του NGS χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα (γενετικός αναλυτής επόμενης γενιάς) Ion Personal Genome Machine (Thermo Fisher/Ion Torrent).** Η εξαγωγή των δεδομένων, η ανίχνευση των βάσεων (base calling) και η δημιουργία των αναγνώσεων των αλληλουχιών θα πραγματοποιηθεί στον διακομιστή Torrent χρησιμοποιώντας τη σουίτα Torrent Suite v.4.4.2, ενώ θα ακολουθήσει κατακερματισμός των αλληλουχιών προσαρμογής, αντιστοίχιση των αναγνώσεων του DNA που προέκυψαν στο γονιδίωμα αναφοράς και ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών (variant calling). Οι γενετικές παραλλαγές που θα προκύψουν θα εμπλουτισθούν με πληροφορίες από το Ion Reporter v.4 και θα γίνουν αποδεκτές για ανάλυση μόνο όσες πληρούσαν τα εξής κριτήρια:

- Τουλάχιστον 100 αναγνώσεις για κάθε πολλαπλασιαζόμενη περιοχή του DNA (>100 amplicon reads)
- Κάθε βάση της αλληλουχίας του DNA να έχει διαβασθεί τουλάχιστον 100 φορές (position coverage >100)
- Κάθε γενετική παραλλαγή να έχει διαβασθεί τουλάχιστον 40 φορές (variant coverage >40) για τις χειρότερα διαβασμένες παραλλαγές (100 αναγνώσεις).

Οι απαλείψεις/εισχωρήσεις (InDels) που θα παρουσιάσουν μεγάλο ποσοστό των δινουκλεοτιδίων GC και οι μη εμπλουτισμένες γενετικές παραλλαγές δεν θα συμπεριληφθούν στην περαιτέρω ανάλυση. Στο συγκεκριμένο πάνελ το κατώφλι για την καταλληλότητα των δειγμάτων θα οριστεί ως μέσο βάθος ανάγνωσης 150 φορές και ο αριθμός των παραλλαγών θα είναι ≥ 5 . Για τα δείγματα στα οποία δεν θα ανιχνευθούν μεταλλάξεις το κατώφλι για την καταλληλότητα των δειγμάτων θα οριστεί ως βάθος ανάγνωσης 300 φορές. Με βάση τα παραπάνω, τα 28 από τα 29 δείγματα των ιστών εγκλεισμένων σε κύβους παραφίνης αλλά και των φρέσκων ιστών που θα προέρχονται από ίσο αριθμό ασθενών αναμένεται να είναι κατάλληλα για ανάλυση. Για αυτά τα δείγματα οι μέσες/διάμεσες τιμές για το μέσο βάθος ανάγνωσης αναμένεται να είναι 435/305 (εύρος: 185-3524), ενώ οι μέσες/διάμεσες τιμές για τον αριθμό των κατάλληλων γενετικών παραλλαγών αναμένεται να είναι 23/22 (εύρος: 5-206). Οι παραλλαγές που θα πληρούν τα κριτήρια καταλληλότητας θα χαρακτηρίζονται ως μεταλλάξεις, εφόσον οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος ή σε αλλαγή στην περιοχή του ματίσματος και η ελάσσονα συχνότητα αυτών (Minor Allele Frequency, MAF) θα είναι $<0.1\%$, σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων dbSNP, 5000 Exomes και ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>). Παρακάτω αναφέρονται γονίδια που ελέγχονται από το συγκεκριμένο πάνελ για εντόπιση μεταλλάξεων (SNVs + Indels) και δομικών γενετικών αλλαγών (CNAs + rearrangements). Η κατασκευή των βιβλιοθηκών του DNA που θα απομονωθούν από ιστούς εγκλεισμένους σε κύβους παραφίνης θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, θα πραγματοποιηθεί θραύση του DNA (60-250ng) με ενζυμικό

τρόπο στους 32οC για 7 λεπτά, θα ακολουθήσει η αντίδραση σύνδεσης των προσαρμογέων με τη λιγάση στους 20οC για 20 λεπτά και καθαρισμός με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η Λίστα των μικρών ενθέσεων και ελλειμμάτων (Small Insertions and Deletions, InDels) και των αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων του DNA των γονιδίων (Copy Number Alterations, CNAs) και των γονιδιακών αναδιατάξεων (rearrangements) που θα ελέγχονται κατά την ανάλυση του προφίλ του όγκου θα συμπεριλαμβάνει τα παρακάτω: Single Nucleotide Variants / Insertions and Deletions: AKT1, ALK, APC, AR, ARAF, ATM, ATRX, BARD1, BRAF, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, CIC, CTNNB1, DDR2, DICER1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FLT3, FOXA1, FOXL2, FUBP1, GATA3, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, IDH1, IDH2, JAK2, KEAP1, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP3K1, MET, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MTOR, NBN, NF1, NPM1, NRAS, NTRK1, PALB2, PDGFRA, PIK3CA, PIK3CB, PMS2, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RAF1, RET, RUNX1, SMAD4, SPOP, STK11, TERT, TP53; Copy Number Alterations Rearrangements: 1p/19q co-deletion, AR, CDKN2A, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KIT, KRAS, MET, MYC, MYCN, PIK3CA, PTEN, RB1, TP53, ALK, BRAF, FGFR3, NTRK1, NTRK2, NTRK3, RET, ROS1, TPRSS2. Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR για σήμανση των δειγμάτων με ειδικά μόρια-δείκτες (indexes) και ένας ακόμη καθαρισμός με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των DNA βιβλιοθηκών θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το σύστημα 4150 AgilentTapestation (D1000 ScreenTape, Agilent, Waldbronn, Germany). Ο εμπλουτισμός των DNA βιβλιοθηκών για τις γενομικές περιοχές ενδιαφέροντος θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας μία μέθοδο υβριδισμού (TACS, TArget Capture Sequences) ειδικά σχεδιασμένη για την ενίσχυση των επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων ενδιαφέροντος. Οι περιοχές που θα ενισχυθούν μέσω του υβριδισμού θα ακινητοποιούνται σε σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, ώστε να ακολουθήσει υβριδισμός με τις DNA βιβλιοθήκες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Μία ειδικά σχεδιασμένη μέθοδος ανάλυσης του προφίλ του όγκου από το εργαστήριο της myoncotherapy.com θα χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των παραλλαγών της βάσης ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Variants, SNVs), των μικρών ενθέσεων και ελλειμμάτων (Small Insertions and Deletions, InDels) και των αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων του DNA των γονιδίων (Copy Number Alterations, CNAs) και των γονιδιακών αναδιατάξεων (rearrangements). Τα δείγματα που θα έχουν εκλουσθεί θα πολλαπλασιαστούν χρησιμοποιώντας ειδικά προσαρμοσμένους εκκινητές. Θα ακολουθήσει η αλληλούχηση των εμπλουτισμένων DNA βιβλιοθηκών στην πλατφόρμα NextSeq του οίκου Illumina (Illumina, SanDiego, USA).

Αλληλούχηση DNA κατά Sanger για έλεγχο μεταλλάξεων στον υποκινητή του γονιδίου TERT

Για τους ασθενείς της Ομάδας μελέτης επιπρόσθετα από τη γονοτυπική ανάλυση με NGS θα πραγματοποιηθεί ανάλυση των όγκων για τις μεταλλάξεις C228T και C250T στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου TERT που εδράζονται στις γενομικές περιοχές 1,295,228 και 1,295,250 (GRCh37 γονιδίωμα αναφοράς) με αλληλούχηση DNA κατά Sanger. Η συγκεκριμένη μέθοδος θα επιλεγεί λόγω της δυσκολίας της περιοχής να αναλυθεί με NGS, καθώς είναι πλούσια σε βάσεις GC. Συγκεκριμένα, θα εφαρμοστεί η τεχνική του PCR δύο σταδίων ή “φωλιασμένη” PCR (Nested PCR). Για τον σκοπό αυτό θα χρησιμοποιηθούν δύο κατάλληλα ζεύγη εκκινητών στοχεύοντας μια περιοχή 201 ζευγών βάσεων εντός της περιοχής του γονιδίου TERT. Συγκεκριμένα, θα χρησιμοποιηθεί ένα ζεύγος εκκινητών εξωτερικά αυτής (πρόσθιος εκκινητής: 5' ACCCGTCCTGCCCTTCACCT 3', ανάστροφος εκκινητής: 5' CCAGCGGCAGCACCTCGCGGTA 3') και ένα δεύτερο ζεύγος εκκινητών (πρόσθιος εκκινητής: 5' ACCCGTCCTGCCCTTCACCT 3', ανάστροφος εκκινητής: 5' CGGGGCCAGGGCTTCCAC 3'). Οι αντιδράσεις PCR θα πραγματοποιηθούν στον θερμικό κυκλοποιητή GeneAmp PCR (Thermofisher, USA) στις εξής συνθήκες: αποδιάταξη 95οC για 10 λεπτά για 1 κύκλο (1η ή 2η PCR, αντιστοίχως), στους 18 ή 28 κύκλους (α) αποδιάταξη στους 95οC για 30 δευτερόλεπτα, (β) αναδιάταξη στους 68οC για 30 δευτερόλεπτα και (γ) επιμήκυνση των εκκινητών στους 72οC για 1 λεπτό. Στη δεύτερη αντίδραση PCR θα προστεθεί το τελικό στάδιο της επιμήκυνσης στους 72ο C για 10 λεπτά. Η αλληλούχηση του DNA θα πραγματοποιηθεί και προς τις δύο κατευθύνσεις χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit Big Dye Terminator kitv.1.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA) και θα ακολουθήσει η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων στον γενετικό αναλυτή ABI3130XL (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific, USA). Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας ειδικό λογισμικό πρόγραμμα (Sequencing Analysis software v 5.2).

Ανίχνευση μεθυλίωσης στο γονίδιο MGMT

Η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου MGMT (06-Μεθυλογουανίνη Μεθυλοτρανσφεράση) η οποία οδηγεί σε απουσία έκφρασης της MGMT, ενός επιδιορθωτικού ενζύμου του DNA που σχετίζεται με τη σταθερότητα του γονιδιώματος έχει βρεθεί στο 40% των ασθενών με γλοιοβλάστωμα και φαίνεται πως σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση και καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με αλκυλιούντες παράγοντες (τεμοζολαμίδη, CCNU, BCNU). Στη μελέτη μας ο έλεγχος για μεθυλίωση MGMT θα πραγματοποιηθεί σε ιστό FFPE στην πλειοψηφία των ασθενών των Ομάδων μελέτης 1&2. Το πρότυπο μεθυλίωσης στις CpG νησίδες του γονιδίου MGMT θα πραγματοποιηθεί με χημική τροποποίηση των μη-μεθυλιωμένων αλλά όχι των μεθυλιωμένων

βάσεων κυτοσίνης σε ουρακίλη χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit EpiTect Bisulfite (Qiagen, USA). Η ειδική για τη μεθυλίωση αντίδραση PCR θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας εκκινητές που είναι ειδικοί είτε για το μεθυλιωμένο ή το μη-μεθυλιωμένο DNA, όπως έχει περιγράψει προηγουμένως. Οι συγκεκριμένες αντιδράσεις (MSP) θα πραγματοποιηθούν δύο φορές. Επίσης, θα συμπεριληφθούν ένα δείγμα με μεθυλιωμένο DNA ως θετικός μάρτυρας και ένας αρνητικός μάρτυρας σε κάθε πειραματική διαδικασία.

WES

Η αλματώδης ανάπτυξη της τεχνολογίας στον τομέα της Μοριακής Βιολογίας επέτρεψε την πραγματοποίηση μελετών συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (genome-wide association studies, GWAS) σε ασθενείς με όγκους, με τεράστιο όφελος στην καλύτερη κατανόηση των μοριακών μονοπατιών της καρκινογένεσης. Το WES με πιστοποίηση CLIA θα διεξαχθεί από την Πλατφόρμα Κλινικής Έρευνας Αλληλουχίας, Broad Institute WCG eResearch CTMS. Η κατασκευή βιβλιοθήκης από χειρουργικά δείγματα GBM όγκων των 29 ασθενών θα πραγματοποιηθεί όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Για όλους τους ασθενείς που θα λάβουν θεραπεία με TAMAVAC VACCINE, θα πραγματοποιηθεί ανάλυση ολόκληρου του εξώματος χρησιμοποιώντας το σετ Agilent SureSelect Human All Exon 44 Mb έκδοση 2.0 (Agilent Technologies). Για ασθενείς που θα ακολουθήσουν τη θεραπεία με TAMAVAC VACCINE το WES θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το σετ της Illumina Nextera Rapid Capture Exome έκδοση 1.2. Τα δεδομένα θα αναλυθούν χρησιμοποιώντας τη γραμμή Broad Picard Pipeline (έκδοση 1.752).

RNA-seq.

Για την κατασκευή βιβλιοθήκης RNA-seq, το RNA θα εξαχθεί από φρέσκα κατεψυγμένα τμήματα ή δείγματα FFPE χρησιμοποιώντας το Qiagen AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit ή το Qiagen AllPrep DNA/RNA FFPE Kit, αντίστοιχα. Οι βιβλιοθήκες RNA-seq θα παρασκευαστούν χρησιμοποιώντας το kit προετοιμασίας βιβλιοθήκης έλικας mRNA Illumina TruSeq ή το kit προετοιμασίας βιβλιοθήκης πρόσβασης TruSeq RNA της Illumina. Το ολικό RNA θα ποσοτικοποιηθεί χρησιμοποιώντας το Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit και θα κανονικοποιηθεί σε 5 ng μ l⁻¹. Για τους 29 ασθενείς που θα λάβουν θεραπεία με TAMAVAC VACCINE κάθε δείγμα θα μεταφερθεί σε ένα παρασκεύασμα βιβλιοθήκης που είναι μια αυτοματοποιημένη παραλλαγή του kit προετοιμασίας δειγμάτων mRNA Illumina TruSeq. Οι προκύπτουσες βιβλιοθήκες θα ποσοτικοποιηθούν με qPCR χρησιμοποιώντας το kit ποσοτικοποίησης βιβλιοθήκης KAPA για πλατφόρμες αλληλουχίας Illumina. Τα δεδομένα θα αναλυθούν χρησιμοποιώντας τον αγωγό Broad Picard, ο οποίος περιλαμβάνει την αποπολυπλεξία και τη συγκέντρωση δεδομένων. Τα δεδομένα RNA-seq δεν θα είναι διαθέσιμα για ασθενείς με νέκρωση ιστού στο δείγμα όγκου.

Βιοπληροφορική ανάλυση και προσδιορισμός επιτόπων-στόχων για τον σχεδιασμό του TAMAVAC VACCINE.

Η ανίχνευση των γενωμικών αναδιατάξεων θα πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας ζευγάρωμα βάσεων που δεν θα είναι σε συμφωνία διαιρώντας τα αρχεία ανάγνωσης που θα έχουν προηγουμένως αντιστοιχηθεί ακολουθώντας τοπική συνδεσμολογία και αντιστοίχιση εκ νέου για την εφαρμογή μιας ροής διοχέτευσης εντολών διεργασιών εσωτερικής χρήσης, προκειμένου να τελειοποιηθεί η σειρά των υποψήφιων γενωμικών γεγονότων. Τα NetMHCpan έκδοση 2.4, DeppNeoVX και SEQ2NEO θα χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό νεοεπιτόπων που θα περιέχουν μεταλλάξεις και θα προβλέπεται ότι θα συνδέονται με τα μόρια MHC κατηγορίας I για κάθε μεμονωμένο ασθενή. Έως 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) πεπτιδία θα σχεδιάζονται για κάθε ασθενή τα οποία θα αποτελούνται κατά μέσο όρο από 7-13 AAs το καθένα προερχόμενα από σωματικές μεταλλάξεις από τους ίδιους τους ασθενείς όπου αναμένεται να προκύψουν έως και 40 ανεξάρτητες μεταλλάξεις στις οποίες θα δίνεται προτεραιότητα και θα χρησιμοποιούνται ως δεδομένα εισαγωγής στον αλγόριθμο BiogenetoligandrolTM designed by Grigoriadis Ioannis για το σχεδιασμό και παρασκευή των προαναφερόμενων πεπτιδίων. Οι μεταλλάξεις στα ογκογονίδια θα έχουν την υψηλότερη προτεραιότητα σε κάθε ομάδα που θα κατατάσσεται. Θα χρησιμοποιούνται μόνο sSNV που έδειξαν έκφραση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου. Επιπλέον, θα ληφθεί υπόψη μια ποικιλία πιθανών βιοχημικών ιδιοτήτων (υδροφοβία ή παρουσία πολλαπλών κυστεϊνών), που θα μπορεί να επηρεάσουν τη δυνατότητα σύνθεσης ή διαλυτότητα των (LIMPs, ASPs και bEPTs) πεπτιδίων.

Παραγωγή TAMAVAC VACCINE εξατομικευμένων εμβολίων νεοαντιγόνων

Τα εξατομικευμένα εμβόλια νεοαντιγόνου θα παρασκευαστούν με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του εξώματος (WES) και των δεδομένων RNA-seq που δημιουργούνται από πρόσφατα κατεψυγμένους όγκους ή φρέσκους όγκους που θα είναι διαθέσιμοι ως ιστός ενσωματωμένος σε παραφίνη (FFPE) σταθεροποιημένος σε φορμαλίνη ή ως φρέσκος ιστός που θα λαμβάνεται κατά τη στιγμή της διαγνωστικής εκτομής. Το WES του φυσιολογικού ιστού θα δημιουργηθεί από αυτόλογο DNA PBMC. Λεπτομέρειες για τα πρωτόκολλα WES και RNA-seq θα βρεθούν στις Συμπληρωματικές Πληροφορίες. Όλες οι κυτταρικές σειρές θα διατηρούνται σε συγκεκριμένες και ελεγχόμενες συνθήκες, μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο (incubator-chamber), όπου θα επιτυγχάνεται σταθερή θερμοκρασία στους 370 C, 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) και σχετική υγρασία υψηλότερη από 95%. Η εύρυθμη ανάπτυξη (κυτταρική έκπτυξη) όλων των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) σε τελική συγκέντρωση 1X, εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS: Fetal Bovine Serum), 2 mM L-γλουταμίνη (L-glutamine), 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο (Sodium pyruvate), 50 mM όξινο δισανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate), 1X διαλύματος μη-απαραίτητων αμινοξέων (Non-essential amino acids) και ένα κοκτέιλ αντιβιοτικών πενικιλίνης (Penicillin) (100 U/ml) /στρεπτομυκίνης (Streptomycin) (100 µg/ml) για την αποφυγή ενδεχόμενων βακτηριακών μολύνσεων. Τα HLA κατηγορίας 1 και 2 τα οποία είναι δύο κατηγορίες μορίων HLA (αντιγόνα ανθρώπινων λευκοκυττάρων), το μόριο HLA τάξης 1 παρουσιάζει αντιγόνα σε κυτταροτοξικά T κύτταρα με υποδοχείς CD8+, ενώ το μόριο HLA τάξης 2 παρουσιάζει αντιγόνα στα βοηθητικά T κύτταρα με υποδοχείς CD4+ και είναι σημαντικά ως αντιγόνα μεταμόσχευσης θα αξιολογηθούν με τη χρήση μοριακής τυποποίησης PCR κατηγορίας I και II (BWH Tissue Typing Laboratory) και με την εφαρμογή των ακόλουθων τεχνικών: α) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με τη χρήση ειδικής αλληλουχίας εκκινητών (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers, PCR-SSP) και β) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης-Ανάστροφος Υβριδισμός (Polymerase Chain Reaction—reverse dot blot). Ο προσδιορισμός των συχνотήτων των HLA αλληλομόρφων γονιδίων έγινε με τον τύπο του Brenstein : $GF=1-\sqrt{1-AgF}$ Ενώ η σύγκριση των αλληλομόρφων έγινε με τον υπολογισμό του χ^2 , η γενετική απόσταση έγινε με βάση την γονιδιακή συχνότητα βάσει του τύπου cavalli-sfortza: $D = 4(1 - \cos\theta) / k - 1$ όπου $\cos\theta = \sum \sqrt{(GfiA)(GfiB)}$ καθότι ο προσδιορισμός των HLA γονιδίων με εφαρμογή της DNA τεχνολογίας καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό HLA ειδικοτήτων, οι οποίες δεν ανιχνεύονται με εφαρμογή των παραδοσιακών ορολογικών και κυτταρικών τεχνικών. Στη συνέχεια θα εντοπιστούν κωδικοποιητικές μεταλλάξεις και θα προβλεφθούν προσωπικά νεοαντιγόνα με βάση την ανάλυση συγγένειας δέσμευσης μεμονωμένων αλληλομόρφων HLA γονιδίων χρησιμοποιώντας εργαλεία πρόβλεψης δέσμευσης MHC κατηγορίας I όπως NetMHCpan έκδοση 2.422, DeepNeoVX και SEQ2NEO IC50 < 500 nM για επιλεγμένους επιτόπους.

In-silico φαρμακοκινητικές και μελέτες προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής για την κατηγοριοποίηση και αξιολόγηση της προβλεψης της ανοσογονικής δράσης, της κβαντοποριακής συγγένειας και της ελαχιστοποίησης της ενέργειας προσδεσής του συμπλέγματος των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων TAMAVAC και των (GB)-TAAs.

Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού.

Αρχικά θα διερευνηθεί η διαπερατότητα των ενώσεων αυτών του συμπλέγματος των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της Bevacizumab, της Temozolamide και του αναστολέα της pembrolizumab από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB, Blood Brain Barrier). Για σκοπό αυτό θα χρησιμοποιηθεί λογισμικό VolSurf 57 το οποίο παρέχει τη δυνατότητα πρόβλεψης της διαπερατότητας από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω μαθηματικού μοντέλου BBB.

Οι αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης της ενέργειας θα παρέχονται από το Macro Model της εταιρείας Schrodinger είναι οι εξής:

• Αλγόριθμος Polak-Ribiere Conjugate Gradient (PRCG)

Ο αλγόριθμος αυτός ανήκει στην κατηγορία των μεθόδων σύγκλισης και ταυτόχρονα χρησιμοποιεί τη συνάρτηση της πρώτης παραγώγου Polak- Ribiere. Χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου αλγόριθμου είναι ότι ξεκινά ξανά τη διαδικασία της ελαχιστοποίησης κάθε 30 επαναλήψεις, όπου N ο αριθμός ατόμων του υπό μελέτη συστήματος. Με τον τρόπο αυτόν θα επιτυγχάνεται η λήψη μοριακών δομών πολύ χαμηλής ενέργειας των πεπτιδίων των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8).

• Αλγόριθμος Truncated Newton Conjugate Gradient (TNCG)

Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος χρησιμοποιεί μία συνάρτηση δεύτερης παραγώγου για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας, παρουσιάζοντας μεγάλη επιτυχία στην παραγωγή μοριακών δομών πολύ χαμηλής ενέργειας.

• Αλγόριθμος Oren-Spedicato Variable Metric (OSVM)

Ο αλγόριθμος OSVM ανήκει στις μεθόδους μεταβλητής μετρικής (variable metric) και χρησιμοποιεί την τροποποίηση Oren-Spedicato της μεθόδου Fletcher-Powell quasi-Newton. Παρουσιάζει σχετικά χαμηλή ταχύτητα επαναλήψεων. Δεν ενδείκνυται για μοριακές δομές με πολύ στρεβλωμένη γεωμετρία.

• Αλγόριθμος Steepest Descent (SD)

Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος θα χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με άλλες μεθόδους για την ελαχιστοποίηση μοριακών δομών των πεπτιδίων των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8). Είναι αποτελεσματικός στην ελαχιστοποίηση της ενέργειας μοριακών δομών που σχεδιάζονται με κάποιο σχεδιαστικό λογισμικό και οι οποίες είναι πάρα πολύ μακριά από κάποιο ενεργειακό ελάχιστο, αλλά απαιτείται η χρήση και άλλης μεθόδου για περαιτέρω ελαχιστοποίηση της ενέργειας.

• Αλγόριθμος Full Matrix Newton Raphson (FMNR)

Ο αποτελεσματικός αλγόριθμος Full Matrix Newton Raphson (FMNR) θα χρησιμοποιηθεί για την πλήρη σύγκλιση μοριακών δομών σε μεγάλα μοριακά συστήματα όπως αυτών των MTOR, JAK1, FUBP1, JAK3, AKT2, CIC, H3F3A, ACVR1, IDH1, PDGFRA, TERTp, EGFR, CDK6, BRAF, FGFR1, CDKN2A/2B, PTEN, CCND1, ATM, CDK4, MDM2, RB1, IDH2, TP53, MAP2K4, NF1, CDK12, ATRX αλλά και των miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210 που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των ασθενών .

• Αλγόριθμος Low-memory

Ο αλγόριθμος Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (LBFGS) θα χρησιμοποιηθεί για την ορθή και αποτελεσματική επιλογή της ελαχιστοποίησης ενέργειας σε μεγάλα μοριακά συστήματα όπως αυτών των MTOR, JAK1, FUBP1, JAK3, AKT2, CIC, H3F3A, ACVR1, IDH1, PDGFRA, TERTp, EGFR, CDK6, BRAF, FGFR1, CDKN2A/2B, PTEN, CCND1, ATM, CDK4, MDM2, RB1, IDH2, TP53, MAP2K4, NF1, CDK12, ATRX αλλά και των miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210 που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των ασθενών της παρούσας κλινικής μελέτης.

Πεδία Δυνάμεων

Τα πεδία δυνάμεων (force fields) είναι ένα σημαντικό συστατικό της Μοριακής Μοντελοποίησης μέσω των οποίων προσομοιάζεται η συμπεριφορά των μορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακά κατηγοριοποιημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) σε ατομικό επίπεδο. Επιπρόσθετα, τα πεδία δυνάμεων θα παρέχουν τους ενεργειακούς όρους που απαιτούνται για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας, τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής και άλλες υπολογιστικές μελέτες στη Μοριακή Μοντελοποίηση συστημάτων, τα οποία κυμαίνονται από απλά οργανικά μόρια έως πολύπλοκα μακρομόρια όπως πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα. Η επιλογή ενός συγκεκριμένου πεδίου δυνάμεων εξαρτάται από τον τύπο του υπό μελέτη συστήματος και του επιπέδου ακρίβειας που απαιτείται. Ακολουθούν μερικά από τα πεδία δυνάμεων που χρησιμοποιούνται ευρύτατα:

• Πεδίο δυνάμεων AMBER

Τα πεδία δυνάμεων AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement, AMBER) χρησιμοποιούνται ευρέως σε προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής. Διαφορετικές εκδόσεις πεδίων δυνάμεων AMBER (όπως AMBER", AMBER94, AMBER99, AMBER 11458. κ.λπ.) έχουν σχεδιαστεί για διάφορους τύπους μορίων παρόμοιων με αυτά που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακά ταξινομημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8), συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και μικρών οργανικών μορίων αλλά και των φαρμάκων της Bevacizumab και της Temozolamide. Όλες οι εξισώσεις που θα χρησιμοποιούνται στο πεδίο δυνάμεων AMBER" είναι πανομοιότυπες με αυτές του αυθεντικού πεδίου δυνάμεων AMBER που σχεδιάστηκε από τον Kollman και τους συνεργάτες του. Ωστόσο, το πεδίο δυνάμεων AMBER" διαφοροποιείται από AMBER καθώς για τους δεσμούς υδρογόνου θα χρησιμοποιηθεί ο πρόσφατα σχεδιασμένος από τον Kollman όρος Lennard-Jones και μία βελτιωμένη παράμετρος για τον αμιδικό σκελετό των πεπτιδίων.

Το υπολογιστικό πακέτο AMBER (Assisted Model Building Energy Refinement) περιλαμβάνει χρήσιμα εργαλεία της σύγχρονης Υπολογιστικής Χημείας. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πρόγραμμα Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics) μέσω του οποίου υπολογίζεται η Ελεύθερη Ενέργεια (free energy calculations) πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων και υδατανθράκων. Θα χρησιμοποιηθούν τα παρακάτω κύρια προγράμματα:

1. Προγράμματα Προετοιμασίας (Preparation Programs).

Τα κύρια προγράμματα προετοιμασίας είναι : antechamber και LEaP (Link, Edit, and Parm).

-Σύνολο εργαλείων για τη δημιουργία αρχείων οργανικών μορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακά ταξινομημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) τα οποία στη συνέχεια μπορούν να διαβαστούν από το πρόγραμμα LEaP.

•Δυνατότητα μετατροπής αρχείων (π.χ από pdb αρχεία mol2 αρχεία).

-LeaP και καθορισμός ατομικών φορτίων και τύπων ατόμων (atom types).

•Δυνατότητα ανάγνωσης και γραφής πολλών τύπων αρχείων (formats: pdb, mol2, Amber Prep, Amber Parm, Object file format).

-Δημιουργία νέων αλληλουχιών αμινοξέων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακά **ταξινομημένα** νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) χρησιμοποιώντας απλές εντολές.

•Ένωση αμινοξέων και δημιουργία με τους χωρίς δεσμούς συμπλόκων μορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακά ταξινομημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) (nonbonded complexes of molecules).

-Τοποθέτηση αντισταθμιστικών ιόντων (counterions) γύρω από το μόριο.

-Διαλυτοποίηση μορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακά ταξινομημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) σε διάφορους διαλύτες.

- Μετατροπή εσωτερικών συντεταγμένων στα μόρια που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακά **ταξινομημένα** νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) σε διάφορους διαλύτες.

-Δημιουργία αρχείων που περιέχουν την τοπολογία (prmtcrd) και τις παραμέτρους του συστήματος (prtop).

2. Προγράμματα Προσομοίωσης (Simulation Programs).

Το κύριο πρόγραμμα προσομοίωσης ονομάζεται Sander (Simulated Annealing with NMR-Derived Energy Restraints) με το οποίο θα εκτελούνται υπολογισμοί ελαχιστοποίησης ενέργειας, μοριακής δυναμικής και βελτιστοποίησης της διαμόρφωσης πεπτιδίων TAMAVAC-TM μέσω φασματοσκοπίας NMR (Nuclear Magnetic Resonance).

3. Προγράμματα Ανάλυσης (Analysis Programs) όπου θα:

- Υπολογίζονται οι γωνίες μεταξύ των ατόμων.

- Υπολογίζεται η μέση διαμορφωτική δομή.

- Υπολογίζονται οι αποστάσεις μεταξύ επιλεγμένων ατόμων.

- Αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- Υπολογίζονται οι συναρτήσεις συσχετισμού.

• Πεδίο δυνάμεων CHARMM

Το πεδίο δυνάμεων CHARMM (Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics CHARMM) αναπτύχθηκε από το πρόγραμμα CHARMM του Πανεπιστημίου του Χάρβαρντ και είναι γνωστό για την ακρίβειά του στην προσομοίωση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Περιλαμβάνει παραμέτρους για ένα ευρύ φάσμα μακρομοριακών συστημάτων.

• Πεδίο δυνάμεων OPLS

Το πεδίο δύναμης OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations, OPLS) είναι γνωστό για την αποτελεσματικότητά του και την ακρίβειά του στην προσομοίωση ιδιοτήτων υγρής φάσης. Έχει επεκταθεί ώστε να θα περιλαμβάνει παραμέτρους για πρωτεΐνες και άλλα μακρομόρια όπως αυτών που εμπεριέχονται στα νεοαντιγονικά εμβόλια TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) VACCINES.

• Πεδίο δυνάμεων OPLS_2001

Το συγκεκριμένο πεδίο δυνάμεων, που αναφέρεται και ως OPLS-AA, σχεδιάστηκε από τον Jorgensen στο Πανεπιστήμιο Yale και αποτελεί ένα από τα επιτυχέστερα πεδία δυνάμεων για τις προσομοιώσεις συμπεκνωμένης φάσης πεπτιδίων. Όλες οι χρησιμοποιούμενες εξισώσεις του OPLS_2001 είναι πανομοιότυπες με αυτές του αυθεντικού πεδίου δυνάμεων OPLS-AA. Το OPLS_2001 έχει δοκιμαστεί σε μία ευρεία ποικιλία από οργανικά συστήματα και έχει επικυρωθεί η αξιοπιστία των υπολογισμών που θα προσφέρει. Σύγκριση υπολογισμών με χρήση του OPLS_2001 με ab initio υπολογισμούς και πειραματικά δεδομένα αναμένεται να αποδείξουν την ακρίβεια των υπολογισμών ενέργειας για τα συστήματα μοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) VACCINE και των πρωτεϊνών στόχων των MTOR, JAK1, FUBP1, JAK3, AKT2, CIC, H3F3A, ACVR1, IDH1, PDGFRA, TERTp, EGFR, CDK6, BRAF, FGFR1, CDKN2A/2B, PTEN, CCND1, ATM, CDK4, MDM2, RB1, IDH2, TP53, MAP2K4, NF1, CDK12, ATRX αλλά και των miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210 μικρογονιδιακών στόχων των οποίων οι παράμετροι είχαν προσδιοριστεί με ακρίβεια, όλες οι υπόλοιπες παράμετρο του OPLS_2001 θα είναι με ακρίβεια προσδιορισμένες.

• Πεδίο δυνάμεων GROMOS

Το πεδίο δυνάμεων GROMOS (Groningen Molecular Simulation, GROMOS) θα χρησιμοποιηθεί για προσομοιώσεις οργανικών ενώσεων, μακρομορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακώς ταξινομημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8).

• Πεδίο δυνάμεων UFF

Σε αντίθεση με ορισμένα από τα πεδία δυνάμεων που αναφέρθηκαν προηγουμένως και έχουν συγκεκριμένες παραμέτρους για διαφορετικούς τύπους ατόμων, το πεδίο δυνάμεων UFF (Universal Force Field, UFF) είναι ένα πιο γενικό πεδίο δυνάμεων, το οποίο μπορεί να εφαρμοστεί σε μια μεγάλη ποικιλία χημικών ενώσεων και θα χρησιμοποιηθεί για γρήγορες προκαταρκτικές ελαχιστοποιήσεις ενέργειας.

Πεδίο δυνάμεων MMFF

Το MMFF (Merck Molecular Force Field MMFF) θα χρησιμοποιηθεί για ταχεία ελαχιστοποίηση ενέργειας και διαμορφωτική ανάλυση οργανικών μορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακώς ταξινομημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) Vacci. Χρησιμοποιείται συχνά σε μελέτες Φαρμακευτικής Χημείας και σχεδιασμού φαρμάκων.

Μελέτες Μοριακής Δυναμικής

Για τη διερεύνηση της σταθερότητας του συμπλέγματος των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων TAMAVAC-TM **ανανεμυγμένων** με-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της Bevacizumab και Temozolamide και του αναστολέα της pembrolizumab θα πραγματοποιηθούν υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής με τη χρήση του προγράμματος AMBER.

• Ημειμπεϊρικές Κβαντομηχανικές Μέθοδοι (Semi-Empirical Quantum Mechanical Methods, AM1, PM3, K.ATT)

Αν και δεν θεωρούνται κλασικά πεδία δυνάμεων, αυτές οι μέθοδοι χρησιμοποιούν κβαντομηχανική για να εκτιμήσουν 5 ηλεκτρονικές δομές και τις ενέργειες των μορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακώς ταξινομημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) Vacci. Θα χρησιμοποιούνται επίσης, για ελαχιστοποίηση της ενέργειας μικρών μορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακώς ταξινομημένα νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-

TAAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) όταν απαιτείται μεγαλύτερη ακρίβεια.

• PMEMD (Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics)

Βελτιστοποιημένη έκδοση του προγράμματος Sander για περιοδικές, Particle mesh Ewald (PME) και Generalized Bom (GB) προσομοιώσεις.

ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΒΑΝΤΟΠΟΡΙΑΚΗΣ ΣΥΓΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΩΝ ΝΕΟΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ TAMAVAC-TAAS-(MAGE-1, HER-2, GP100, AIM-2, TRP-2, EPHA2, 105-SURVIVIN-50, IL13Rα2-58, HEAT-SHOCK PEPTIDE PROTEIN COMPLEX-96 (HSPPC-96) ΣΕ MOL2 ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΤΗΣ BEVACIZUMAB, ΤΗΣ TEMOZOLAMIDE ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΗΣ PEMBROLIZUMAB ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ MTOR, JAK1, FUBP1, JAK3, AKT2, CIC, H3F3A, ACVR1, IDH1, PDGFRA, TERTP, EGFR, CDK6, BRAF, FGFR1, CDKN2A/2B, PTEN, CCND1, ATM, CDK4, MDM2, RB1, IDH2, TP53, MAP2K4, NF1, CDK12, ATRX ΟΠΙΩΣ ΚΑΙ ΕΠΙ ΤΩΝ MIR-101, MIR-128A, MIR-132, MIR-133A, MIR-133B, MIR-149, MIR-153, MIR-154, MIR-185, MIR-29B, MIR-323, MIR-328, MIR-330, MIR-21, MIR-155 ΚΑΙ MIR-210 ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ.

Οι υπολογισμοί προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής θα πραγματοποιηθούν με το πρόγραμμα AMBER και με τη χρήση του PMEMD. Το πεδίο δυνάμεων 19958 θα χρησιμοποιηθεί για την παραμετροποίηση των πρωτεϊνών στόχων των MTOR, JAK1, FUBP1, JAK3, AKT2, CIC, H3F3A, ACVR1, IDH1, PDGFRA, TERTP, EGFR, CDK6, BRAF, FGFR1, CDKN2A/2B, PTEN, CCND1, ATM, CDK4, MDM2, RB1, IDH2, TP53, MAP2K4, NF1, CDK12, ATRX συμπεριλαμβανομένων των mir-101, mir-128a, mir-132, mir-133a, mir-133b, mir-149, mir-153, mir-154, mir-185, mir-29b, mir-323, mir-328, mir-330, mir-21, mir-155 και mir-210 μικρογονιδιακών/μικρο-ριβονουκλεϊνικών στόχων. Για την παραμετροποίηση του προσδετών του συμπλέγματος των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων TAMAVAC-TAAS-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της Bevacizumab και Temozolamide και του αναστολέα της pembrolizumab θα εφαρμοστεί το πρόγραμμα ANTECHAMBER το οποίο χρησιμοποιεί το πεδίο δυνάμεων General AMBER force field (GAFF) και τη μέθοδο AM1-BCC για τον υπολογισμό των φορτίων. Τα λογισμικά NetMHCpan έκδοση 2.4, DeppNeoVX και SEQ2NEO θα χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό και σχεδιασμό των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων TAMAVAC-TM νεοεπιτόπων που θα περιέχουν μεταλλάξεις και θα προβλέπεται ότι θα συνδέονται με τα μόρια MHC κατηγορίας I για κάθε μεμονωμένο ασθενή. Έως 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) πεπτίδια θα προσομοιώνονται σε κάθε μελέτη μοριακής δυναμικής ανά ασθενή και στα οποία θα δίνεται προτεραιότητα και θα χρησιμοποιούνται ως δεδομένα εισαγωγής στον αλγόριθμο Biogeneto-ligandrol-TM designed by Grigoriadis Ioannis για το σχεδιασμό, την κατηγοριοποίηση των κβαντομοριακών ιδιοτήτων τους με σκοπό την παρασκευή των προαναφερομένων εμβολίων TAMAVAC-TM, αποτελούμενων από πεπτίδια με την καλύτερη ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης, μοριακή συγγένεια πρόσαραξης και με τη βέλτιστη δυνατή ανοσογονική δράση επι των μοριακών στόχων των PDGFRA, NTRK3, NTRK2, NTRK1, NRAS, MYCN, MYC, MTOR, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, ETV5, FGFR1, ETV4, ETV1, ESR1, CTNNB1, DDR2, EGFR, EGFRvIII, ERBB2, (HER2), ERBB3, ERBB4, ERG, CDK6, AKT1, ALK, AR, AXL, BRAF, CCND1, CDK4, PIK3CA, PPARG, RAF1, RET, ROS1, και SMO. Για την προσομοίωση των μορίων που θα εμπεριέχονται στα κβαντομοριακά **ταξινομημένα** νεοαντιγόνα των εμβολίων TAMAVAC-TAAs-(MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, EphA2, 105-survivin-50, IL13Rα2-58, heat-shock peptide protein complex-96 (HSPPC-96), και Smac-TLR7/8) του διαλύτη θα χρησιμοποιηθεί μοντέλο επιδιαλυτοποίησης TIP311 με διαλύτη νερό.

Σύνθεση του TAMAVAC VACCINE συγκέντρωση και τελική παρασκευή εμβολίου.

Τα κβαντομοριακά επιλεγμένα και εξατομικευμένα TAMAVAC-TM εμβόλια νεοαντιγόνου ασθενή θα παρασκευαστούν με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του εξώματος (WES) και των δεδομένων RNA-seq που δημιουργούνται από πρόσφατα κατεψυγμένους όγκους ή φρέσκους όγκους που θα είναι διαθέσιμοι ως ιστός ενσωματωμένος σε παραφίνη (FFPE) σταθεροποιημένος σε φορμαλίνη ή ως φρέσκος ιστός που θα λαμβάνεται κατά τη στιγμή της διαγνωστικής εκτομής. Το WES του φυσιολογικού ιστού θα δημιουργηθεί από αυτόλογο DNA PBMC. Λεπτομέρειες για τα πρωτόκολλα WES και RNA-seq θα βρεθούν στις Συμπληρωματικές Πληροφορίες. Όλες οι κυτταρικές σειρές θα διατηρούνται σε συγκεκριμένες και ελεγχόμενες συνθήκες, μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο (incubator-chamber), όπου θα επιτυγχάνεται σταθερή θερμοκρασία στους 370 C, 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO2) και σχετική υγρασία υψηλότερη από 95%. Η εύρυθμη ανάπτυξη (κυτταρική έκπτυξη) όλων των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) σε τελική συγκέντρωση 1X, εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS: Fetal Bovine Serum), 2 mM L-γλουταμίνη (L-glutamine), 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο (Sodium pyruvate), 50 mM όξινο δισανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate), 1X διαλύματος μη-απαραίτητων αμινοξέων (Non-essential amino acids) και ένα κοκτέιλ αντιβιοτικών πενικιλίνης (Penicillin) (100 U / ml) / στρεπτομυκίνης (Streptomycin) (100 μg / ml) για την αποφυγή ενδεχόμενων βακτηριακών μολύνσεων. Τα HLA κατηγορίας 1 και 2 τα οποία είναι δύο κατηγορίες

μορίων HLA (αντιγόνα ανθρώπινων λευκοκυττάρων), το μόριο HLA τάξης 1 παρουσιάζει αντιγόνα σε κυτταροτοξικά T κύτταρα με υποδοχείς CD8+, ενώ το μόριο HLA τάξης 2 παρουσιάζει αντιγόνα στα βοηθητικά T κύτταρα με υποδοχείς CD4+ και είναι σημαντικά ως αντιγόνα μεταμόσχευσης θα αξιολογηθούν με τη χρήση μοριακής τυποποίησης PCR κατηγορίας I και II (BWH Tissue Typing Laboratory) και με την εφαρμογή των ακόλουθων τεχνικών: α) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με τη χρήση ειδικής αλληλουχίας εκκινητών (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers, PCR-SSP) και β)) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης-Ανάστροφος Υβριδισμός (Polymerase Chain Reaction—reverse dot blot). Ο προσδιορισμός των συχνοτήτων των HLA αλληλομόρφων γονιδίων θα γίνει με τον τύπο του Brenstein : $GF=1-\sqrt{1-AgF}$ Ενώ η σύγκριση των αλληλόμορφων έγινε με τον υπολογισμό του χ^2 , η γενετική απόσταση θα υπολογιστεί με βάση την γονιδιακή συχνότητα βάσει του τύπου cavalli-sforza: $D = 4(1- \cos\theta) / k-1$ όπου $\cos\theta = \sum \sqrt{(GfiA) (GfiB)}$ καθότι ο προσδιορισμός των HLA γονιδίων με εφαρμογή της DNA τεχνολογίας καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό HLA ειδικοτήτων, οι οποίες δεν ανιχνεύονται με εφαρμογή των παραδοσιακών ορολογικών και κυτταρικών τεχνικών. Στη συνέχεια θα εντοπιστούν κωδικοποιητικές μεταλλάξεις και θα προβλεφθούν προσωπικά νεοαντιγόνα με βάση τις προαναφερόμενες μελέτες προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής για την αξιολόγηση της πρόβλεψης της ανοσογονικής δράσης του συμπλέγματος εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων Tamavac-TM **ανανεμιγμένων** με-TAAS. 17-25 (GMP) (LIMPs, ASPs και bEPTs) πεπτίδια μήκους 7-13 αμινοξέων θα συντεθούν με χημεία συνθετικών πεπτιδίων στερεάς φάσης και θα καθαριστούν χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) (CSBio). Κάθε ένα από το TAMAVAC VACCINE θα αποτελείται από 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) εξατομικευμένα συνθετικά νεοαντιγονικά πεπτίδια τα οποία θα είναι σε **5-6 πισίνες πεπτιδίων** με GBM-TAAs, συμπεριλαμβανομένων των MAGE-1, HER-2, gp100, AIM-2, TRP-2, Ephrin305Rvi1, (HSPPC-96) και πεπτίδια Smac-TLR7/8. Τα φαρμακευτικά προϊόντα/εμβόλια TAMAVAC VACCINE θα αποτελούνται από 17-25 πεπτίδια από την αποθήκη της Biogenea Pharmaceuticals Ltd. cGAMP, (GM-CSF), (Poly-ICLC), imiquimod, CpG, σαπωνίνες και (MPLA0) ανοσοτροποποιητές θα επιλεγούν γενοτυπικά και θα προσωποποιηθούν ανάλογα με το γενετικό προφίλ του κάθε ασθενή ως προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές σε όλους τους εμβολιασμούς με TAMAVAC VACCINE. Τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE θα εμπεριέχουν προσωποποιημένο ανασυνδυασμό όλων των ανοσοτροποποιητών συμπεριλαμβανομένων των (GM-CSF), (Poly-ICLC), imiquimod, CpG, σαπωνίνες Α που συσχετίζονται με λιποσπορίνες. Τα TAMAVAC VACCINE είναι ανασυνδυασμένα νεοεπιτοπικά και προσωποποιημένα εμβόλια για τον καρκίνο, θα συνοδεύεται με Tetanus Toxoid, Poly-ICLC, GM-CSF, Imiquimod, και Immune Checkpoint inhibitors και θα αποτελούνται από 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) κατά μέσο όρο 7-13 Αμινοξέων για την αποτελεσματική διέγερση των αντιγονοειδικών CD4+ και CD8+ T κυττάρων σε 17 έως 21 εβδομάδες με εξαιρετικό προφίλ ασφάλειας. Τα TAMAVAC-TM εμβόλια θα αποτελούνται από 5-6 πισίνες TAAs και In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακάς κατηγοριοποιημένων νεοαντιγονικών εξατομικευμένων νέο-αντιγονικών πεπτιδίων. Τα TAMAVAC VACCINE θα είναι έτοιμα για χρήση 1 μήνα μετά την εγγραφή του ασθενούς στην κλινική μελέτη, καθώς αυτά τα πεπτίδια πρέπει να συντεθούν εκ νέου για κάθε ασθενή μετά την ταυτοποίηση του χημικογενετικού προφίλ και μεταλλακτώματος των αντίστοιχων μεταλλαγμένων πεπτιδίων στα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA. Τα φαρμακευτικά προϊόντα TAMAVAC VACCINE θα αποτελούνται από 17-25 de novo πεπτίδια που θα συντίθενται για κάθε έναν μεμονωμένο ασθενή.

Παραγωγή Αυτόλογων ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων)

Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων (mononuclear cells-MNCs)

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων (mononuclear cells-MNCs) από τα δείγματα περιφερικού αίματος ασθενών Ομάδων A,B&C που θα συμμετέχουν στην παρούσα κλινική μελέτη θα πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας με χρήση διαλύματος φικόλης (Ficoll-Hypaque). Τα δείγματα θα αραιώνονται 10 φορές σε θρεπτικό RPMI (Gibco® RPMI 1640 medium) και θα ακολουθεί ήπια ανάδευση. Για τα δείγματα MO θα ακολουθείται μία επιπλέον προεργασία για τη διάσπαση των συνδέσμων του ημίρρευστου μυελού (single cell suspension) με χρήση 7mg κολλαγενάσης (Collagenase from Clostridium histolyticum, SIGMA) για κάθε 35ml αραιωμένου δείγματος. Θα ακολουθεί επώαση σε κινούμενο επωαστήρα για 45λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φιλτράρισμα για απομάκρυνση επιπλέον πηγμάτων από ηθμούς 40 μm. Σε σωληνάρια φυγοκέντρου 50ml θα τοποθετούνται 15ml φικόλης και θα γίνεται επιστοίβαξη 35ml αραιωμένων δειγμάτων με ιδιαίτερη προσοχή προκειμένου να μην αναμειχθούν οι δύο επιμέρους στιβάδες. Τα δείγματα θα φυγοκεντρώνονται στα 400g, 20oC για 35λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης τα δείγματα θα διαχωρίζονται σε τέσσερις βασικές ζώνες: ορού, MNCs, φικόλης, κοκκιοκυττάρων/ερυθροκυττάρων (εικόνα 14). Μετά την απομάκρυνση του ορού (αιμοπετάλια και πλάσμα) θα γίνεται μεταφορά του στρώματος των MNCs με πλαστική πιπέττα Pasteur σε νέα σωληνάρια των 50ml.

Καλλιέργεια CD34+ κυττάρων προς ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα)

Συμβατική καλλιέργεια σε πιάτα

Η καλλιέργειας διαφοροποίησης των CD34+ περιφερικού αίματος ασθενών Ομάδων A,B&C που θα διαφοροποιηθούν προς ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα) θα γίνεται σε θρεπτικό μέσο Gibco® IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) με 2% Gibco® Penicillin-Streptomycin, 1% Gibco® L-Glutamine και 10% ανθρώπινου ορού από υγιείς εθελοντές δότες ή 20% ομφάλιου

πλάσματος αδρανοποιημένου συμπληρώματος (56oC για 1ώρα). 150x103 CD34+ κύτταρα θα επιστρώνονται την ημέρα 0 της καλλιέργειας σε πιάτα 12-οπών (Corning® Costar 12-well tissue culture plates) παρουσία Human Recombinant GM-CSF Protein 50 (100ng/ml) και Recombinant Human SCF (50ng/ml). Για 4 εβδομάδες τα κύτταρα θα καλλιεργούνται παρουσία των παραπάνω κυτοκινών με συνεχείς ανακαλλιέργειες ανά 3-4 ημέρες. Την 5η εβδομάδα της καλλιέργειας το κοκτέιλ των κυτοκινών της καλλιέργειας θα περιλαμβάνει Recombinant GM-CSF Protein 50 (100ng/ml) και Human Recombinant IL-4 (50ng/ml). Την ημέρα 35 τα ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα) που εκπύχθηκαν θα συλλέγονται προς ταυτοποίηση και μετέπειτα ψύξη.

Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρες

Ο αριθμός που προτείνεται από τη βιβλιογραφική αναζήτηση για έναρξη καλλιεργειών T-κυττάρων ή κυττάρων παγκρέατος σε βιοαντιδραστήρες είναι 5 10x106 κύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψη μας το μεγαλύτερο μέγεθος των CD34+ κυττάρων θα θεωρήσουμε σκόπιμο να ελέγξουμε την ικανότητα έκπτυξής τους στους βιοαντιδραστήρες εισάγοντας μικρότερο αρχικό αριθμό (1-2x106 CD34+ κύτταρα). Για το σκοπό αυτό η διαδικασία θα ακολουθεί την πορεία της συμβατικής καλλιέργειας μέχρι το στάδιο έκπτυξης των 1-2x106 κυττάρων τα οποία εισάγονται τελικά σε βιοαντιδραστήρες. Για τις πρώτες 3-4 ημέρες καλλιέργειας ο όγκος θρεπτικού μέσου θα είναι 20ml ενώ για κάθε επόμενη ανακαλλιέργεια θα διατηρείται σταθερά στα 30ml. Το κοκτέιλ κυτοκινών και η διάρκεια της καλλιέργειας είναι θα είναι ίδια με της συμβατικής καλλιέργειας έκπτυξης ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων).

Τροποποίηση παραμέτρων καλλιέργειας

Διάρκεια καλλιέργειας

Για να ελεγχθεί η επίδραση του χρόνου καλλιέργειας στην έκπτυξη των κυττάρων καθώς και την ανοσοφαινοτυπική και λειτουργική τους δραστηριότητα συγκριτικά με το συμβατικό πρωτόκολλο «4 εβδομάδες GM-CSF/SCF + 1 εβδομάδα GM-CSF/IL 4» (Harada Y N. Y., 2011) θα γίνουν δοκιμαστικές καλλιέργειες 2+1, 3+1 και 5+1.

Ορός καλλιέργειας

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες για την έκπτυξη των ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) οι καλλιέργειες θα διενεργηθούν τόσο παρουσία αυτόλογων για κάθε περίπτωση ορών όσο και αλλογενών ορών της ίδιας ή διαφορετικών ομάδων από την ομάδα αίματος του δείγματος ασθενών Ομάδων Α,Β&C που θα συμμετέχουν στην παρούσα κλινική μελέτη.

Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση

Σε όλη τη διάρκεια των καλλιεργειών (τουλάχιστον κάθε μία φορά/εβδομάδα) ένα μέρος των κυττάρων (50-100x103) θα συλλέγονται σε φιαλίδια 5ml (Polysytrene Tube BD) προκειμένου να ελεγχθεί η σταδιακή απώλεια του αρχέγονου χαρακτήρα των κυττάρων και η ολοένα αυξανόμενη έκφραση επιφανειακών δεικτών μυελοειδών ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων), με κυτταρομετρία ροής. Με την ολοκλήρωση των καλλιεργειών σε όλες τις συνθήκες τα παραγόμενα ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα) θα ελέγχονται ως προς τη μυελοειδή προέλευσή τους, την απώλεια πλασματοειδών και λοιπών αιμοποιητικών δεικτών (T-κύτταρα, B-κύτταρα, NK κύτταρα κλπ)

Ωρίμανση παραγόμενων ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων)

Με προσδέτες των υποδοχέων τύπου Toll (TLR-Ls) Μετά από απόψυξη ψυχθέντων ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) ολοκληρωμένων καλλιεργειών σε δεκαπλάσιο όγκο Gibco® DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) και φυγοκέντρηση στα 400g, 4oC για 5λεπτά θα γίνεται επίστρωση 2-3x106 ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) /οπή σε πιάτα 6 οπών (Corning® Costar 6-well tissue culture plates) με προσθήκη των κυτοκινών κατάληξης της καλλιέργειας πριν την ψύξη (100ng/ml GM-CSF, 50ng/ml IL-4). Η ωρίμανση θα γίνεται με κοκτέιλ των αγωνιστών R848 (4μg/ml) & Poly(I:C) (20μg/ml) & Εμβολίων TAMAVAC-TM VACCINE βάση βιβλιογραφίας για 24, 48 και 72ώρες ενώ θα υπάρχει πάντα και μία τουλάχιστον οπή μάρτυρας, χωρίς ωρίμανση.

Έλεγχος ανοσοφαινοτύπου διαφοροποίησης προς ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα)

Σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) θα ελέγχεται η σταδιακή αύξηση της έκφρασης του χαρακτηριστικού δείκτη ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) CD11c και του δείκτη μυελοειδών ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) CD33 με ταυτόχρονη παρακολούθηση της μείωσης έκφρασης για τον CD34 δείκτη. Το κάθε δείγμα θα επωάζεται παρουσία 10μl FITC anti-Human CD11c (EXBIO) / PE [71] anti-Human CD33 (Cytognos) και 20μl FITC anti-Human CD11c (EXBIO) / APC mouse anti-Human CD34 (BD Pharmingen) και θα αναλύεται.

Ανοσοφαινοτυπικός έλεγχος δεικτών ωρίμανσης (Κυτταρομετρία ροής) ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) ολοκληρωμένης καλλιέργειας

Με την κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry – FCM) ελέγχεται η έκφραση μιας πρωτεΐνης (διαλυτής ή διαμεμβρανικής) καθώς και το ποσό της εν λόγω πρωτεΐνης ή το ποσοστό των κυττάρων που την παράγουν. Απαραίτητο βήμα είναι η σύνδεση ενός αντισώματος που φέρει φθορίζουσα χρωστική (η οποία αναγνωρίζεται από το κυτταρόμετρο ροής) με την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, μία δέσμη φωτός ενός μεμονωμένου μήκους κύματος διαπερνά τη ροή ενός υγρού (π.χ. ολικό αίμα, διάλυμα με κύτταρα κ.α.). Ένας αριθμός ανιχνευτών φθορισμού περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα αντισώματα που είναι προσδεδεμένα στα σωματίδια διεγείρονται και εκπέμπουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από ανάλυση συλλέγονται πληροφορίες σχετικά με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Ο ανοσοφαινότυπος ωρίμανσης των ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) που εκπύχθηκαν θα ελέγχεται αμέσως μετά την ωρίμανση και συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου ως προς την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων. Πιο συγκεκριμένα στα δείγματα θα προστίθενται 10μl PerCP anti-Human CD86 (EXBIO), APC anti-Human CD40 (IMMUNOSTEP), PE anti Human CD83 (EXBIO) για επώαση και μετέπειτα ανάλυση. Με την ολοκλήρωση των καλλιέργειών ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) όλα τα δείγματα θα ταυτοποιούνται ως προς την παρουσία δεικτών ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) (CD11c, HLA-DR), αλλά και την απουσία δεικτών πλασματοειδικής προέλευσης ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) (CD123) και λοιπών αιμοποιητικών δεικτών (Lineage: CD3, CD19, CD14, CD16, CD20 & CD56). Έτσι κάθε δείγμα θα επωάζεται παρουσία 10μl APC anti-Human CD11c (EXBIO), PerCP anti-Human HLA-DR (EXBIO), PE anti-Human CD123 (EXBIO) και 5μl FITC Liquid KOMBITEST™ CD3/CD19/CD14/CD16/CD20 /CD56.

Έλεγχος ωρίμανσης με TAMAVAC-TM VACCINE Εμβόλια

Για την ωρίμανση των κυττάρων με εμβόλια η επίστρωσή τους σε πιάτα μετά την απόψυξη θα γίνεται όπως ακριβώς και στην περίπτωση των TLR-Ls. Θα ακολουθεί ωρίμανση σε συγκέντρωση 4% του τελικού όγκου ανά οπή με εμβόλια. Πιο συγκεκριμένα θα χρησιμοποιούνται τα In-Silico σχεδιασμένα και κβαντομοριακά κατηγοριοποιημένα νεοαντιγονικά και εξατομικευμένα Εμβόλια TAMAVAC-TM VACCINE σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες και Pembrolizumab, ξεχωριστά καθώς και σε διπλούς και τριπλούς συνδυασμούς για 24, 48 και 72ώρες ενώ θα υπάρχει πάντα και μία τουλάχιστον οπή μάρτυρας, χωρίς ωρίμανση.

Μορφολογική ταυτοποίηση ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) μετά την ωρίμανση με TAMAVAC-TM VACCINE Εμβόλια

Για ισχυρότερη προσκόλληση των κυττάρων θα γίνεται ειδική προεπεξεργασία των αντικειμενοφόρων πλακών με διάλυμα θετικής φόρτισης (HistoGrip 50X- Invitrogen histochemical reagent). Οι πλάκες θα εμβαπτίζονται για 1-2λεπτά σε αραιωμένο σε ακετόνη διάλυμα τελικής συγκέντρωσης 1X, ακολουθούν 3 διαδοχικά ξεπλύματα σε απεσταγμένο H₂O και στέγνωμα στους 60°C για 1ώρα. Μικροποσότητες του ιζήματος των κυττάρων θα επιστρώνονται στα πλακάκια με γυάλινες πιπέττες Pasteur σε οριοθετημένα με Dako Pen (Biotech) πλαίσια και θα μένουν για στέγνωμα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος όλη νύχτα (overnight air dry).

Χρονοδιάγραμμα κλινικών συμβάντων και Δοσολογία ΕΜΒΟΛΙΩΝ TAMAVAC 1&2

Το χρονοδιάγραμμα κλινικών συμβάντων για τους ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον μία δόση εμβολίου TAMAVAC VACCINE, θα υπολογιστεί από το χειρουργείο μέχρι το θάνατο του ασθενή. Η συνολική επιβίωση θα οριστεί ως ο χρόνος που θα περάσει από τη διάγνωση του καρκίνου μέχρι τον θάνατο ή την τελευταία ημερομηνία χορήγησης των TAMAVAC VACCINE στον/στην ασθενή. Η μέθοδος Kaplan-Meier θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της πιθανότητας να είναι ένας ασθενής ελεύθερος συμβάματος κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού του με τα TAMAVAC VACCINE. Η διάμεση επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) και η συνολική επιβίωση (OS) θα υπολογιστούν επίσης αντίστοιχα. Μεταξύ των εγγεγραμμένων ασθενών, μια διάμεση τιμή (110-145) σωματικών παραλλαγών ενός νουκλεοτιδίου ανά όγκο (εύρος, 75-158) θα δοκιμαστεί με μια διάμεση τιμή (58-63) κωδικοποιητικών μεταλλάξεων ανά όγκο (εύρος, 32-93) χρησιμοποιώντας αλληλουχία ολόκληρου του εξώματος, και η έκφραση μιας υποομάδας RNA θα επιβεβαιωθεί με ανάλυση αλληλουχίας RNA (αλληλουχία RNA). Αυτές θα περιλαμβάνουν μεταλλάξεις που θα παρατηρούνται συνήθως στο γλοιοβλάστωμα και επηρεάζουν τα PTEN, RB1 και EGFR. Θα δοκιμαστούν επίσης μεταλλάξεις IDH1 ή IDH2. 2 έως 3 ασθενείς αναμένεται να αποσυρθούν λόγω ανεπαρκούς αριθμού δραστικών νεοεπιτόπων ή εξέλιξης της νόσου μετά από ακτινοθεραπεία. Για τους υπόλοιπους ασθενείς, ο διάμεσος αριθμός και το μήκος αμινοξέων των πεπτιδίων που θα ενσωματώνονται ανά εμβόλιο θα είναι 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) κατά μέσο όρο 7-13 AA ο καθένας από τους ίδιους τους ασθενείς που θα προέρχονται από σωματικά μεταλλάγματα 12 (εύρος, 7-20) και 24 (εύρος, 15-30), αντίστοιχα.

Το εμβόλιο TAMAVAC VACCINE θα εφαρμοστεί κατά τη διάρκεια των κύκλων χορήγησης Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας χημειοακτινοβολίας (CRT) σε συνδυασμό με προσωποποιημένους αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος και αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία με tumor-lysate pulsed DCs. Ξεκινώντας την ημέρα 14 πριν από τον πρώτο κύκλο χορήγησης των Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, οι ασθενείς από την **Ομάδα μελέτης Ασθενών (Group 29 Ασθενών)** θα λάβουν 7 εμβολιασμούς με εμβόλια TAMAVAC VACCINE για 7 εβδομάδες. Θα χρησιμοποιηθούν 900 μg ανά πεπτίδιο ανά φιαλίδιο, ακολουθούμενα από δύο αναμνηστικές δόσεις οκτώ και δεκαέξι εβδομάδες αργότερα. Για κάθε δόση, οι δεξαμενές εμβολίων θα χορηγούνται εντός έξι ωρών από την απόψυξη με μη περιστρεφόμενο τρόπο σε ένα από τα τέσσερα έως και τέσσερα άκρα. Θα επιτρέπονται ταυτόχρονα φάρμακα που κρίνονται απαραίτητα για την επαρκή φροντίδα του ασθενούς, συμπεριλαμβανομένων των ταυτόχρονων κορτικοστεροειδών για συμπτώματα που σχετίζονται με εγκεφαλικό οίδημα. Τα εμβόλια της μελέτης θα χορηγηθούν ακόμα και σε ασθενείς που χρειάζονται περισσότερα από 4 mg δεξαμεθαζόνης την ημέρα εντός επτά ημερών από την έναρξη της χορήγησης των εμβολίων TAMAVAC VACCINE. Η κλινική αξιολόγηση και παρακολούθηση θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τα κριτήρια RANO για την Αξιολόγηση Ανοσοθεραπείας Απόκρισης Νευρο-Ογκολογικού Ασθενή.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗΣ

ΚΛΙΝΙΚΟ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΧΥΜΙΚΗΣ ΑΝΟΣΙΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΝΖΥΜΟ- ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΗΣ ΑΝΟΣΟΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (ELISA) ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΟΓΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΓΛΟΙΟΒΛΑΣΤΩΜΑ ΠΟΥ ΕΜΒΟΛΙΑΣΘΗΚΑΝ ΜΕ TAMAVAC VACCINES ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΣΥΝΧΟΡΗΓΗΘΗΚΑΝ BEVACIZUMAB 10MG/KG ΚΑΘΕ 15 ΗΜΕΡΕΣ ΚΑΙ TEMOZOLAMIDE 150-200mg/M²/ΗΜΕΡΑ ΓΙΑ ΠΕΝΤΕ ΗΜΕΡΕΣ ΚΑΘΕ 28 ΗΜΕΡΕΣ ΚΑΙ ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΗ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΠΡΟΣΩΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΝΑΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΣΗΜΕΙΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟΧΕΥΟΜΕΝΟΥ ΚΑΤΑ ΤΟΥ PD-1 ΤΗΣ PEMBROLIZUMAB, ΕΦΟΣΟΝ ΑΥΤΟΣ ΕΙΝΑΙ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΣ, ΚΑΤΑ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΡΧΩΝ ΤΗΣ 6^{ης}, 13^{ης} ΚΑΙ 25^{ης} ΕΒΔΟΜΑΔΑΣ

Εφαρμογή της μεθόδου ενζυμο-συνδεδεμένης ανοσοπροσρόφησης (ELISA) για την αξιολόγηση και διερεύνηση της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας των ασθενών που εμβολιάστηκαν με TAMAVAC VACCINES και τους συνχορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ένας αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Μια αιμοληψία (30 ml) θα γίνει στους 29 ασθενείς της παρούσας πριν την έναρξη της συνδυαστικής θεραπείας TAMAVAC-TM αλλά και μετά την ολοκλήρωση του εμβολιασμού τους με τα Εμβόλια TAMAVAC VACCINES. Στο σημείο αυτό της κλινικής μελέτης θα χρησιμοποιήσουμε την τεχνική ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των IL2, IL10, IL16, TNF-a, granzyme-b, IgM, IgG, IgA, IgE, CMV IgM και IgG, EBV IgM και IgG, toxoplasma gondii IgM και IgG, anti-dsDNA, ENA και αντισώματα αντι-καρδιολιπίνης. Ο υψηλότερος βαθμός WHO grade σχετίζεται με μειωμένο αριθμό των CD3 (p=0.011), CD4 (p=0.015), CD8 (p=0.048) του κλάσματος CD4/CD8 (p=0.027), όπως επίσης με μειωμένες τιμές IL2 (p=0.018), C4 (p=0.02) και IgG (p=0.05). Υψηλότερο WHO grade σχετίζεται με μεγαλύτερες ελλείψεις της ανοσίας. Οι τελευταίες είναι παρούσες τόσο στη χυμική όσο και στην κυτταρική ανοσία. Η ποσότητα των CD4 και οι τιμές της IL2 αποτελούν σημαντικούς παράγοντες πρόβλεψης του βαθμού κακοήθειας κατά WHO. Ο αριθμός των CD4 θετικών κυττάρων σχετίζεται αντίστροφα με μια καλύτερη επιβίωση ασθενών με γλοιοβλάστωμα. Προτείνουμε μια προεγχειρητική αξιολόγηση του ανοσολογικού συστήματος σε ασθενείς με γλοιώματα. Οι αριθμοί CD4 και οι τιμές της IL2 αποτελούν σημαντικούς παράγοντες πρόβλεψης του βαθμού κακοήθειας κατά WHO. Ευνοϊκοί προγνωστικοί παράγοντες είναι η νεότερη ηλικία κατά τη διάγνωση (p=0.020), χειρουργική αφαίρεση vs στερεοτακτικής βιοψίας (p=0.042), συμπληρωματική χημειοθεραπεία (p=0.028) και ακτινοθεραπεία (p=0.002), καθώς και αριθμός CD4 θετικών κυττάρων άνω των 200 /mm³ (p=0.001). Ο τελευταίος αποτελεί και ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα επιβίωσης. Επίσης παρατηρούνται διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δομών του ανοσολογικού συστήματος. Η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής θα εφαρμοστεί για τον καθορισμό των CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56 θετικών κυττάρων και κλάσματος CD4/CD8. Οι 29 ασθενείς της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να παρουσιάζουν αυξημένες τιμές των IL2 (p=0.000), TNFa (p=0.033), IgG(p=0.011), IgA(p=0.027), C4 (p=0.026), CD3 (p=0.001), CD4 (p=0.000), CD8 (p=0.002), κλάσμα CD4/CD8 (p=0.000), CD19 (p=0.04) και μειωμένες για IL10 (p=0.05) σε σύγκριση με αυτές που είχαν μετρηθεί πριν την έναρξη του εμβολιασμού τους με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE και της συνδυαστικής θεραπείας των με Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και τον αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου

κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας. Δεν αναμένεται να παρατηρηθεί κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά πριν και μετά τον εμβολιασμό τους σχετικά με τους μικροβιακούς παράγοντες, ολικά NK-κύτταρα, IgM, IL16, granzyme-b, RF, ANA, ENA, anti-dsDNA και αντισώματα της αντικαρδιολιπίνης.

Μέτρηση των κατασταλτικών επιδράσεων των TAMAVAC VACCINE στη δημιουργία αποικιών των καρκινικών κυττάρων ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Τα κύτταρα ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας θα τοποθετηθούν σε πλάκες 96 φρεατίων στα αντίστοιχα μέσα καλλιέργειας, σε πυκνότητα 1×10^4 κύτταρα / φρεάτιο (εις τριπλούν) σε διάλυμα 100 μ L. Την επόμενη μέρα, θα επωαστούν με TAMAVAC VACCINE όπου μετά από 72 ώρες, θα προστεθούν MTT (5 mg / mL) στα φρεάτια και στη συνέχεια τα τρυβλία 96 φρεατίων θα επωαστούν για 4 ώρες. Στη συνέχεια, θα προστεθούν 100 μ L DMSO. Η απορρόφηση (OD) θα μετρηθεί στα 570 nm σε έναν φασματόμετρο. Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί μια σειρά από κλωνογονικούς προσδιορισμούς επιβίωσης για να εκτιμήσουμε την ευαισθησία των κυττάρων ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες και αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία σε συνδυασμό με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων των PD-1: (Nivolumab, Pembrolizumab και Cemiplimab), PDL-1: (Atezolimumab, Durvalumab και Avelumab) και της CTLA-4: Ipilimumab, εφόσον αυτοί είναι διαθέσιμοι, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας.

Μέτρηση της ενισχυτικής και επαγωγικής επίδρασης των TAMAVAC VACCINE επί της Pembrolizumab στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων όγκων ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες και αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Για να εξεταστεί εάν τα ανασταλτικά αποτελέσματα της TAMAVAC-TM συνδυαστική θεραπεία συσχετίζονται με την επαγωγή απόπτωσης των κυττάρων ογκολογικού ασθενή που θα υποβληθούν σε αγωγή με TAMAVAC VACCINE και Pembrolizumab, μόνα τους ή σε συνδυασμό με Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες και αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία για 48 ώρες, τα κύτταρα θα αναλυθούν με κυτταρομετρία ροής διπλής χρώσης με αννεξίνη V-FITC / PI. Η θεραπεία με TAMAVAC VACCINE και Pembrolizumab αναμένεται να προκαλέσει αύξηση του αποπτωτικού αποτελέσματος, σε σύγκριση με τη Pembrolizumab μόνη της. Η συγχρηρήγηση της Pembrolizumab με TAMAVAC VACCINE αναμένεται να έχει σημαντικά υψηλότερα ποσοστά απόπτωσης σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου και Pembrolizumab, αντίστοιχα. Αυτά τα αποτελέσματα αναμένεται να αναδείξουν ότι η TAMAVAC-TM συνδυαστική θεραπεία θα μπορούσε να συμβάλλει σημαντικά στη μείωση του πολλαπλασιασμού καρκινικών κυττάρων, αποδεικνύοντας ότι τα TAMAVAC VACCINE ενδεχομένως να έχουν ρόλο στον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Κυκλοφορούμενες μετρήσεις ποσοστών έκφρασης βιοδεικτών σε ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA), Ελεύθερο κυτταρικό RNA (cfRNA), και κυκλοφορόντες πρωτεΐνες ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Η βιοψία του ιστού ενδέχεται να μην επιτρέπει την ικανοποιητική ανίχνευση του όγκου σε πρώιμα στάδια ή σε περιπτώσεις υπολειμματικής νόσου και κατά αυτόν τον τρόπο η βιοψία δεν είναι κατάλληλη για έλεγχο. Επιπλέον, η χρονική και χωρική ετερογένεια του όγκου μπορεί να μειώσει την πρακτική χρησιμότητα των ιστών βιοψίας ως εργαλεία, για την παρακολούθηση της πρόόδου της θεραπείας του όγκου και την σωστή αξιολόγηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία. Ειδικότερα, σε πολυεστιακές μορφές όγκων, ενδέχεται να είναι απαραίτητο η διενέργεια λήψης πολλαπλών βιοψιών για να διαπιστωθεί με ακρίβεια η παθολογία του όγκου, καθώς οι όγκοι εξελίσσονται συνεχώς, τόσο χωρικά όσο και χρονικά, κατά ιδίου σκοπού ή και ως αποτέλεσμα ως προς την θεραπεία (Perakis & Speicher, 2017). Με βάση λοιπόν τα προαναφερθέντα, στην παρούσα κλινική

μελέτη θα ακολουθηθεί μία ελάχιστη επεμβατική διαδικασία μετρήσεων των ποσοστών έκφρασης βιοδεικτών σε ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA), Ελεύθερο κυτταρικό RNA (cfRNA), και κυκλοφορούντες πρωτεΐνες, αυτή της υγρής βιονότιας μεταξύ των ασθενών που ολοκλήρωσαν τον εμβολιασμό TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες και αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας, η αποτελεί λύση σε αυτά τα προβλήματα, και ως μια συνεχώς εξελισσόμενη διαδικασία που θα επιτρέψει την διάγνωση και εξέλιξη του όγκου και φυσικά θα δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο, την πρόγνωση αλλά και την πιθανότητα υποτροπής της παθολογίας. Η ανάλυση του κυκλοφορούντος DNA του όγκου (ctDNA) θα περιλαμβάνει τον εντοπισμό και την ανάλυση θραυσμάτων DNA που θα εκκρίνονται από τα κύτταρα του όγκου στην κυκλοφορία του αίματος. Με την απομόνωση και την ανάλυση των αλληλουχιών του ctDNA, θα μπορούν να αναγνωριστούν και να αναλυθούν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γενετικών αλλαγών που συσχετίζονται με τον εγκεφαλικό όγκο ασθενών που θα εμβολιαστούν με Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και TAMAVAC VACCINE εξατομικευμένα εμβόλια. Οι τεχνολογίες cfDNA μπορούν να ανιχνεύσουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο ctDNA που είναι ενδεικτικές ενός όγκου εγκεφάλου. Αυτές οι μεταλλάξεις θα μπορεί να περιλαμβάνουν μονονουκλεοτιδικές μεταβολές (SNVs = single nucleotide variants), εισαγωγές/διαγραφές (indels), ή μεγαλύτερες δομικές μεταβολές, όπως συγχωνεύσεις γονιδίων ή χρωμοσωμικών ανακατατάξεων (Mair & Mouliere, 2022). Η ανάλυση της ποικιλίας του αριθμού αντιγράφων (Copy number variation- CNV) του cfDNA επιτρέπει τον εντοπισμό αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων του DNA, όπως ενισχύσεις ή διαγραφές, οι οποίες μπορούν να παρέχουν δεδομένα στο γενωμικό τοπίο των όγκων του εγκεφάλου (Mouliere et al., 2018; Sun et al., 2019). Αυτές οι προηγμένες τεχνολογίες επιτρέπουν σε πραγματικό χρόνο (real-time) την παρακολούθηση της δυναμικής του όγκου και της ανταπόκρισης του στη θεραπεία μέσω της ανάλυσης του ctDNA σε διάφορες στιγμές κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Αυτό θα επιτρέπει τον εντοπισμό νεοεμφανιζόμενων γενετικών αλλαγών και μηχανισμών αντοχής, καθοδηγώντας έτσι τις αποφάσεις σχετικά με τη συνδυαστική Bevacizumab 10mg/kg, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και TAMAVAC VACCINE εξατομικευμένη θεραπεία.

Κυκλοφορούμενες μετρήσεις ποσοστών έκφρασης βιοδεικτών σε κυκλοφορούντα κύτταρα του όγκου (CTCs) ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτοι είναι διαθέσιμοι, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Τα CTCs είναι κύτταρα που προέρχονται από έναν πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή (μεταστατικό) όγκο και συμμετέχουν στη μεταστατική διαδικασία. Ωστόσο, η κυτταρική μετακίνηση είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και οι παθογενετικοί της μηχανισμοί πρέπει να διασαφηνιστούν πλήρως. Επίσης, παραμένει ασαφές εάν τα CTCs προέρχονται από κεντρικούς υποπληθυσμούς του όγκου ή αν αντιπροσωπεύουν το σύνολο του όγκου (Massagué & Obenauf, 2016). Αυτά τα κύτταρα εισέρχονται στη ροή των διαφόρων βιολογικών υγρών, όπως το αίμα, το ENY (κεντρικό νευρικό σύστημα) και τα ούρα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι, στην περίπτωση των εγκεφαλικών όγκων ασθενών που τους χορηγήθηκαν αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτοι είναι διαθέσιμοι, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας, τα CTCs θα συλλέγονται από το ENY όπως και από το αίμα του ασθενή. Επιπλέον, η παρακέντηση δεξαμενής (Cisternal puncture) ασθενών που ολοκλήρωσαν τον παραπάνω συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE θα παρέχει πιο ακριβή αποτελέσματα σε σύγκριση με την οσφυονωτιαία παρακέντηση, αν και η οσφυονωτιαία παρακέντηση φαίνεται να είναι λιγότερο επεμβατική και λιγότερο επικίνδυνη όσον αφορά τις πιθανές επιπλοκές από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Επίσης, πρέπει να σημειώσουμε ότι το ENY ανακυκλώνεται και ανταλλάσσεται πλήρως κάθε τρεις έως πέντε ημέρες (Sullivan et al., 2014). Όσον αφορά τους όγκους εγκεφάλου, και ιδιαίτερα το GB, έχει δείξει ότι τα CTCs μπορούν να ανιχνευθούν στο αίμα των ασθενών σε ποσοστό 20% έως 40% (Gao et al., 2016; Krol et al., 2018).

Κυκλοφορούμενες μετρήσεις ποσοστών έκφρασης βιοδεικτών σε εξωκυττάρια κυστίδια/ Εξωσωμάτια (Extracellular Vesicles, EVs/Exosomes) και μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα (micro-ribonucleic acids, miRNAs: miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210) ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτοι είναι διαθέσιμοι, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Αρχικά, τα εξωσώματα θεωρούνταν ως απόβλητα των κυττάρων, αλλά τώρα γνωρίζουμε ότι λειτουργούν ως κυστίδια σήματος μεταξύ των κυττάρων και αποτελούν συντονιστές της κυτταρικής επικοινωνίας μέσω της μεταφοράς πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων (Théry, 2011). Η μεταφορά των εξωσωμάτων εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου-αποδέκτη και συμβαίνει κυρίως μέσω φαγο- ή ενδοκυττάρωσης (Christianson et al., 2013; Cocucci & Meldolesi, 2015). Τα εξωσώματα παίζουν κύριο ρόλο στην παθοφυσιολογία των ασθενειών, καθώς και στην κυτταρική ανάπτυξη, την ομοιόσταση και την ανοσοαντίδραση (De Toro et al., 2015; Skouras, Gargalionis, et al., 2023). Τα κύτταρα του όγκου εκπέμπουν έναν υψηλό αριθμό εξωσωμάτων στον εξωκυτταρικό χώρο, τα οποία ερευνήθηκαν αρχικά ως μη-κυτταρικά θεραπευτικά αντιγόνα για την ανάπτυξη εμβολίων κατά των όγκων ή των μολυσματικών ασθενειών (André et al., 2002; Chaput et al., 2004), και τα περισσότερα από τα οποία είναι δομημένα από λειτουργικά βιομόρια miRNAs (Romano et al., 2020). Σε αυτό το πλαίσιο, τα εξωσώματα ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες και με τον αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος των PD-1, της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας, θα εξετασθούν ως προς τα επίπεδα των miRNAs των miR-101, miR-128a, miR-132, miR-133a, miR-133b, miR-149, miR-153, miR-154, miR-185, miR-29b, miR-323, miR-328, miR-330, miR-21, miR-155 και miR-210 και άλλων ενώσεων που μπορούν και κατ' επέκταση να χρησιμεύσουν ως αντιπροσωπευτικά εργαλεία για το μοριακό προφίλ του αντίστοιχου όγκου ασθενή που του χορηγήθηκαν τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες και τον αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος των PD-1, της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας.

Κυκλοφορούμενες μετρήσεις ποσοτών έκφρασης βιοδεικτών σε cfDNA, cfRNA, και Κυκλοφορούντες πρωτεΐνες στην διάγνωση των Γλοιωμάτων ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας

Το cfDNA μπορεί επίσης να βοηθήσει στην ποσοτική μέτρηση γενετικών (π.χ., μεταλλάξεις του γονιδίου IDH) ή επιγενετικών αλλαγών (μεθυλίωση του γονιδίου MGMT) (Faria et al., 2018; Mathios & Phallen, 2022). Στο cfDNA που προέρχεται από ασθενείς με γλοιώμα, υπάρχουν διάφορα γονίδια και επιγενετικές αλλαγές που μπορούν να ανιχνευθούν και να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τη διάγνωση και παρακολούθηση της νόσου. Ένα εξαιρετικό παράδειγμα είναι η μετάλλαξη H3K27M χαρακτηριστική των διάχυτων διηθητικών γλοιωμάτων γέφυρας [Diffuse midline gliomas (DMGs)]. Στην παρούσα μελέτη ασθενών που τους χορηγήθηκε Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs και με τον αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος των PD-1, της Pembrolizumab, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας, το cfDNA θα απομονωθεί από δύο τύπους δειγμάτων: ένας τύπος με μετάλλαξη H3.3K27M και ο άλλος τύπος H3 wildtype (H3WT). Τα δείγματα θα περιλαμβάνουν ιστούς όγκου H3.3K27M (δεκατέσσερα δείγματα), ENY (δεκαέξι δείγματα), πλάσμα (δεκατέσσερα δείγματα) και ανθρώπινα πρωτογενή παιδιατρικά κύτταρα γλοιωμάτων. Στόχος της παρούσας κλινικής μελέτης είναι να αξιολογηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της ανίχνευση μεταλλάξεων τόσο στους αντίστοιχους ιστούς DMG όσο και στα δείγματα του ENY ασθενών που ολοκλήρωσαν τον εμβολιασμό με TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες και Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και των PD-1 (Pembrolizumab) αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας. Η παρούσα μελέτη θα εστιάσει επίσης στα επίπεδα έκφρασης της μετάλλαξης H3K27M η οποία αναμένεται να ανιχνευθεί στο ENY και το πλάσμα των ασθενών με DMG. Μεταξύ των δύο, το ENY αναμένεται να εμφανίσει την υψηλότερη συγκέντρωση cfDNA (Panditharatna et al., 2018). Πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στην ανίχνευση των φαινομένων αντιμετάθεσης (retrotransposition) του LINE-1 σε διάφορους τύπους κυττάρων, όπως στα NPCs κύτταρα (neural precursor cells) που προέρχονται τόσο από ανθρώπινα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (CSCs) όσο και από εγκεφαλικά βλαστικά κύτταρα. Μελέτες με φαινόμενα αντιμετάθεσης που πραγματοποιήθηκαν σε αυτούς τους τύπους κυττάρων επιβεβαίωσαν την ύπαρξη δραστηριότητας του LINE-1 και στις δύο συνθήκες (Coufal et al., 2009). Στα πλαίσια της διενέργειας της παρούσας κλινικής μελέτης θα αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης της γενικής μεθυλίωσης του DNA (global DNA methylation) μέσω της μεθυλίωσης του μεταθετού στοιχείου LINE-1 (L1) η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο όσον αφορά τις επιγενετικές αλλαγές στα κύτταρα ενός γλοιώματος, επιτρέποντας τη διάγνωση μέσω της ανάλυσης του cfDNA ασθενών που ολοκλήρωσαν τον εμβολιασμό με TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με τον αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος των PD-1, της Pembrolizumab. Επιπλέον, θα διεξαχθούν πειράματα και αναλύσεις αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR) και RC-Seq (retrotransposon capture sequencing) οι

οποίες θα επιτρέψουν να εντοπίσουν σωματικές LINE-1 επιδράσεις σε γονίδια κωδικοποίησης πρωτεϊνών με διαφορετική έκφραση εντός του εγκεφάλου ασθενών που ολοκλήρωσαν τον εμβολιασμό με TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με τον αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος των PD-1, της Pembrolizumab. Οι συγκεκριμένες μελέτες θα αξιολογήσουν τα επίπεδα μεθυλίωσης του LINE-1 μέσω της ποσοτικής bisulfite pyrosequencing τεσσάρων CpG τοποθεσιών σε δείγματα εγκεφάλου ασθενών που ολοκλήρωσαν το παραπάνω θεραπευτικό σχήμα, καθώς και σε κατεψυγμένους ιστούς όγκων των ιδίων ασθενών όπου και αναμένεται να παρατηρηθεί ένα σχετικά χαμηλότερο επίπεδο έκφρασης και υπομεθυλίωσης του LINE-1 κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας.

Συγκριτικές μελέτες GWAS στην διάγνωση των Γλοιωμάτων ασθενών που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δendraτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές και ένας αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, αυτός της Pembrolizumab εφόσον είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Συγκριτικές μελέτες GWAS σε πληθυσμούς ασθενών με γλοίωμα που τους χορηγήθηκαν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες, αυτόλογη δendraτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE θα διενεργηθούν κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας οι οποίες αναμένεται να αναδείξουν μία μείωση της έκφρασης των παθογονιδίων ενός συγκεκριμένου μοριακού προφίλ που περιλαμβάνει περίπου 60-80 κοινούς μονονουκλεοτιδικούς πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphisms, SNPs) οι οποίοι φαίνεται ότι προδιαθέτουν στην ανάπτυξη γλοιώματος, καθώς οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί βρίσκονται συχνότερα σε ασθενείς με γλοίωμα. Οι αντίστοιχες θέσεις στο DNA ονομάζονται γενετικοί τόποι υψηλού κινδύνου για την ανάπτυξη γλοιώματος (high risk loci), αλληλόμορφα κινδύνου (risk alleles) ή γενετικές παραλλαγές κινδύνου (risk variants). Ενδιαφέρον είναι πως οι 29 ασθενείς στους οποίους θα χορηγηθούν Bevacizumab 10mg/kg κάθε 15 ημέρες, Temozolamide 150-200mg/m²/ημέρα για πέντε ημέρες κάθε 28 ημέρες και τον φαρμακογενετικά προσωπο-επιλεγμένο αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος των PD-1, της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια TAMAVAC VACCINE αναμένεται να εκφράσουν μειωμένα επίπεδα γενετικής έκφρασης σε τουλάχιστον 8 από τους πολυμορφισμούς αυτούς οι οποίοι βρίσκονται σε γενωμικές θέσεις όπου συναντάμε γονίδια που αναφέρονται ως παθολογικά στα γλοιώματα, π.χ. TERC, TERT, EGFR, CCDC26, CDKN2B, PHLDB1, TP53 και RTEL1, χωρίς όμως να βρίσκονται σε κωδικές περιοχές των γονιδίων αυτών. Επιπλέον, οι ασθενείς στους οποίους θα χορηγηθεί η συνδυαστική θεραπεία TAMAVAC-TM αναμένεται να εκφράσουν μειωμένα επίπεδα γενετικής έκφρασης σε τουλάχιστον 4 από τους 8 προαναφερθέντες γενετικούς τόπους υψηλού κινδύνου οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται με την ανάπτυξη γλοιωμάτων όλων των ιστολογικών τύπων και των βαθμών κακοήθειας και βρίσκονται κοντά στα γονίδια TERT, RTEL1, EGFR, TP53, ενώ οι πολυμορφισμοί στους υπόλοιπους 4 γενετικούς τόπους υψηλού κινδύνου που βρίσκονται κοντά στα γονίδια TERC, CDKN2B, PHLDB1 και CCDC26 σχετίζονται με ανάπτυξη ορισμένων υποτύπων γλοιωμάτων. Η ίδια ομάδα των 29 ασθενών αναμένεται να εκφράσουν μειωμένα επίπεδα γενετικής έκφρασης σε τουλάχιστον 8 από τους πολυμορφισμούς αυτούς οι οποίοι βρίσκονται κοντά στο γονίδιο CDKN2B στο χρωμόσωμα 9 και αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης αστροκυτωμάτων, ανεξαρτήτως βαθμού, αλλά δεν συνδέονται με τον κίνδυνο εμφάνισης ολιγοδενδρογλοιακών όγκων.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, οι νεοαντιγονικοί εμβολιασμοί TAMAVAC VACCINE θα αξιολογηθούν ως μια εφικτή θεραπευτική στρατηγική για ανοσολογικά ψυχρούς όγκους με σχετικά χαμηλό μεταλλακτικό φορτίο με στόχο τη μείωση του αριθμού των CD4+ T κυττάρων που έχουν αναφερθεί σε όγκους γλοιοβλαστώματος που υποτροπιάζουν ταχέως μεταξύ των ασθενών με χαμηλά επίπεδα διάγνωσης. Σκοπός της παρούσας μελέτης θα είναι και η βελτιστοποίηση των Γενετικών Ημιεμπειρικών Κβαντομηχανικών Αλγορίθμων Ευρετικής Αναζήτησης που προβλέπουν την ανοσογονικότητα των επιτόπων CD8+, τις νεοεπιτόπιες συστηματικές ανοσοαποκρίσεις και τελικά τις νεοεπιτόπιες συστηματικές ανοσοαποκρίσεις των επιτόπων CD4+, οι οποίοι μπορούν να βοηθήσουν στην αποσαφήνιση αυτών των αποτελεσμάτων καθώς και στην ενίσχυση της ανοσογονικότητας εξατομικευμένων νέο-αντιγονικών εμβολίων. Τα ανοσοφαινοτυπικά άρτια ΔΚ (δendraτικά κύτταρα) που θα συγχρηρηγηθούν στην παρούσα κλινική μελέτη θα ωριμάζουν σε μεγάλη κλίμακα με χρήση των βιοαντιδραστήρων, για πρώτη φορά σε αυτού του είδους τις καλλιέργειες χρησιμοποιώντας το κοκτέιλ των αγωνιστών R848 (4μg/ml) & Poly(I:C) (20μg/ml) R848 (4μg/ml), Poly(I:C) (20μg/ml) & Εμβολίων TamavacTM VACCINE βάση βιβλιογραφίας για 24, 48 και 72ώρες με μέσα χαμηλότερου κόστους έναντι των συμβατικών μεθόδων ωρίμανσης και αναμένεται να είναι άκρως λειτουργικά και ικανά να αντιγονοπαρουσιάσουν και να επάγουν ειδικές ανοσοαποκρίσεις. Σε αντίθεση με τις καθιερωμένες μεθόδους ωρίμανσης των ΔΚ (δendraτικών κυττάρων) που περιλαμβάνουν τη χρήση TLR Ls και αυξητικών παραγόντων (IL-1β, TNF-α, PGE-E2, GM-CSF,

IL-4) για 48 ώρες, ως εναλλακτικό τρόπο ωρίμανσης προτείνουμε τη χρήση των In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς **ταξινομημένων** των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων TamavacTM VACCINE καθώς θα περιέχουν TLR-Ls και θα μπορούσαν να έχουν παρόμοια απόκριση. Τα Εμβόλια αυτά θα είναι παρασκευασμένα για κλινική χρήση ενώ είναι σαφώς οικονομικότερα συγκριτικά με τα προϋπάρχοντα και αναμένεται να μπορούν να συμβάλλουν σε επιτυχή αντιγονοπαρουσίαση με ικανοποιητική έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD86, CD83 και CD40 ενώ παράλληλα να ωριμάζουν τα κύτταρα ώστε να εκκρίνουν τις απαραίτητες για Th1 απόκριση κυτοκίνες. Αυτή θα είναι μια δοκιμή φάσης I διερεύνησης της ασφάλειας και της ανοσολογικής απόκρισης του νέου εμβολίου TAMAVAC σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθείσα GB. Το κλινικό πρωτόκολλο TAMAVAC-TM θα επικεντρώνεται στην πρόβλεψη και το σχεδιασμό Ειδικών Νεοαντιγόνων για τον Καρκίνο από σωματικές μεταλλάξεις του ίδιου του ασθενούς που διαφέρουν από τα αντιγόνα άγριου τύπου και θα είναι ειδικό για κάθε μεμονωμένο ασθενή.

Πρωτεύοντα τελικά σημεία:

Προσδιορισμός του προφίλ ασφάλειας και ανεκτικότητας του TAMAVAC VACCINE όταν συγχρησιμοποιείται με προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητικές, αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και την τυπική θεραπεία αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος.

Δευτερεύοντα τελικά σημεία:

Περιγραφικές αναλύσεις των επαγόμενων T-κυττάρων ανοσοαποκρίσεων μετά από εμβολιασμούς με TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και τυπική θεραπεία αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος.

Συνολική επιβίωση με το TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητικές σε πρόσφατα διαγνωσμένο γλοιώμα σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και το τυπικό αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος.

Επιβίωση χωρίς εξέλιξη με το TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητικές σε πρόσφατα διαγνωσμένο γλοιώμα σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και το τυπικό αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος.

Πρωταρχικός Σκοπός: Θεραπεία

Κατανομή : N/A

Επεμβατικό Μοντέλο: Ενιαία Ομαδική Ανάθεση

Απόκρυψη: Κανένα (Ανοιχτή ετικέτα)

Όπλα και Επεμβάσεις

Ποια θα είναι η μέτρηση της μελέτης;

Μέτρα πρωτογενούς αποτελέσματος

Μέτρο Αποτελεσμάτων	Περιγραφή μέτρου	Χρονικό Πλαίσιο
Ασφάλεια και ανοχή	Προσδιορισμός του προφίλ ασφάλειας και ανεκτικότητας του TAMAVAC VACCINE όταν θα συγχρησιμοποιείται με αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, ανοσοτροποποιητές και την τυπική θεραπεία αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος	Συνεχώς για περίπου 40 εβδομάδες συν παρακολούθηση

Δευτερεύοντα Μέτρα Αποτελεσμάτων

Μέτρο Αποτελεσμάτων	Περιγραφή μέτρου	Χρονικό Πλαίσιο
Ανοσολογική απόκριση των T-κυττάρων	Περιγραφική ανάλυση των επαγόμενων ανοσοαποκρίσεων των T-κυττάρων μετά από εμβολιασμούς με TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και την τυπική θεραπεία αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος.	έως 24 μήνες από τον εμβολιασμό
Συνολική επιβίωση (OS)	Συνολική επιβίωση με το TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητικές σε πρόσφατα διαγνωσμένο γλοίωμα σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με τυπικό αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος.	έως 24 μήνες από τον εμβολιασμό
Επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS)	Επιβίωση χωρίς εξέλιξη με το TAMAVAC VACCINE σε συνδυασμό με αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητικές σε πρόσφατα διαγνωσμένο γλοίωμα σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με τυπικό αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος.	έως 12 μήνες από τον εμβολιασμό

Συνεργάτες και Ερευνητές

Ανάδοχος

-Ογκολογική Κλινική

Συνεργάτες

- Biogenea Pharmaceuticals Ltd

Ερευνητές

- Κύριος Ερευνητής: Γρηγοριάδης Ιωάννης

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ Γ ΟΝΙΔΙΩΝ

ATRX: alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

CCDC26: coiled-coil domain containing 26

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CDKN2B: cyclin-dependent kinase inhibitor 2B

CIC: capicua transcriptional repressor gene

DAXX: death-domain-associated protein

EGFR: epidermal growth factor receptor

HIF-a: hypoxia induced factor

IDH1: isocitrate dehydrogenase 1

IDH2: isocitrate dehydrogenase 2

FGFR: fibroblast growth factor receptor gene

FUBP1: far upstream element binding protein 1 gene

MGMT O6-Methylguanine DNA Methyltransferase

NF1: neurofibromin 1

PDGFRA: platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide

PHLDB1: pleckstrin homology-like domain, family B, member 1

PTEN: phosphatase and TENsin homolog

RTEL1: regulator of telomere elongation helicase 1

TACC: transforming acidic coiled-coil containing protein

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TERC: telomerase RNA component

TERT: telomerase reverse transcriptase

TP53: tumor protein p53

ZNF208: zinc finger protein

ΓΛΩΣΣΑΡΙ

Copy Number Variation (CNV) : αλλαγή του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου

Frameshift mutation: παραλλαγή που τροποποιεί το πλαίσιο ανάγνωσης

Genotype: γονότυπος

Insertions/deletions (Indels) : απαλείψεις/εισχωρήσεις

Missense mutation: παρανοηματική μετάλλαξη

Mutation hotspot: περιοχή με υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων

Next Generation Sequencing (NGS) : αλληλούχιση νέας γενιάς

Non sense mutation: μη νοηματική μετάλλαξη

Rearrangements: γενωμικές αναδιατάξεις

Single Nucleotide Polymorphism (SNP) : μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός

Single Nucleotide Variant (SNV) : παραλλαγή του ενός νουκλεοτιδίου

Splice site mutation: μετάλλαξη που επηρεάζει το κανονικό μάτισμα

The Cancer Genome Atlas (TCGA) : Άτλαντας Καρκινικού Γονιδιώματος

Structural variant (SV) : δομική παραλλαγή

Variant calling: ανίχνευση γενετικών παραλλαγών

Variant of Unknown Significance (VUS) : παραλλαγή αγνώστου κλινικής σημασίας