



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός: Η παρακολούθηση της ποσοτικής μεταβολής του φορτίου της μετάλλαξης *KRAS* G12C (MAF) στο cfDNA σε δείγματα πλάσματος ασθενών με μεταστατικό ΜΜΚΠ που συλλέχθηκαν σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία κατά τη θεραπεία.

Μεθοδολογία: Βελτιστοποιήθηκαν οι αντιδράσεις ddPCR (QX200, BioRad) για την ταυτόχρονη ανίχνευση της G12C και της wild-type αλληλουχίας του *KRAS*. Ακολούθως, προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου με πειράματα ελέγχου. Δείγματα πλάσματος συλλέχθηκαν από 26 ασθενείς με ΜΜΚΠ και ανιχνεύσιμη μετάλλαξη *KRAS* G12C στον ιστό, πριν την έναρξη πρώτης γραμμής συστηματικής θεραπείας (T0) και στην πρώτη εκτίμηση ή υποτροπή της νόσου (T1). Η ανίχνευση της *KRAS* G12C στα δείγματα cfDNA έγινε με την αναπτυχθείσα μέθοδο ddPCR και ακολούθησε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Αποτελέσματα: Το όριο ανίχνευσης της ddPCR μεθόδου προσδιορίστηκε στο 0.2% (MAF). Στο 30.77% (N=8/26) των ασθενών, η μετάλλαξη *KRAS* G12C ανιχνεύθηκε στο cfDNA στο T0, ενώ στο 69.23% (N=18/26) η μετάλλαξη *KRAS* G12C δεν ήταν ανιχνεύσιμη κατά το T0. Είναι ενδιαφέρον ότι σε 3 από τους 18 ασθενείς με μη ανιχνεύσιμη *KRAS* G12C στο πλάσμα κατά την T0, η *KRAS* G12C έγινε ανιχνεύσιμη στο πλάσμα κατά την υποτροπή της νόσου (T1). Σε 6 ασθενείς με πρόοδο νόσου, ανιχνεύτηκε αύξηση του *KRAS* G12C MAF στο T1 σε σχέση με το T0. Για τους 4 ασθενείς με μειωμένο ή σταθερό *KRAS* G12C MAF στο T1 σε σχέση με το T0, κανένας δεν είχε πρόοδο νόσου.

Συμπεράσματα: Η ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση του φορτίου της μετάλλαξης *KRAS* G12C στο cfDNA ασθενών με ΜΜΚΠ, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό προγνωστικό και προβλεπτικό εργαλείο, επιλύοντας προβλήματα έλλειψης ιστού.

CONTACT

Σοφία Αγγελάκη MD, PhD
Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας,
Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης,
Παθολογική Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου
Email: agelaki@uoc.gr
Phone: 2810392438

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ *KRAS* G12C, ΣΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ DNA ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.

Μιχαηλίδου Κλείτα¹, Δημαράς Παντελής^{1,2}, Κυριακίδου Αθηνά^{1,2}, Κουτουλάκη Χαρά¹, Μαυρίδης Κωνσταντίνος³, Παπαδάκη Μαρία¹, Μαυρουδής Δημήτριος^{1,2}, Αγγελάκη Σοφία^{1,2}

¹Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, ²Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, ³Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο, Κρήτη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *KRAS* G12C μετάλλαξη είναι πλέον **θεραπευτικά στοχεύσιμη** για τους ασθενείς με προχωρημένο **μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (ΜΜΚΠ)**, στους οποίους παρουσιάστηκε υποτροπή μετά τη συστηματική θεραπεία με αντικαρκινικά φάρμακα και ως εκ τούτου ο μοριακός έλεγχος είναι ζωτικής σημασίας για την επιλογή της βέλτιστης θεραπείας για τους ασθενείς.

Για τους ασθενείς με **μεταστατικό ΜΜΚΠ το διαθέσιμο ιστολογικό υλικό** είναι συχνά **μη επαρκές** για εκτενή χαρακτηρισμό του. Η **χωρική και χρονική ετερογένεια** του όγκου, απαιτεί τη λήψη επαναλαμβανόμενων βιοψιών, αν και στην πλειονότητα των περιπτώσεων η **διενέργεια επαναληπτικής βιοψίας** κατά την πρόοδο της νόσου είναι **δυσχερής**.

Η **υγρή βιοψία**, μέσω της ανίχνευσης μεταλλάξεων στο ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA), αποτελεί **εναλλακτική πηγή μοριακής πληροφορίας** σε περιπτώσεις όπου δεν είναι διαθέσιμος επαρκής ιστός ή για την παρακολούθηση της νόσου. Η ανάλυση του cfDNA, αποτελεί όμως πρόκληση καθώς τα μόρια cfDNA είναι κατακεραματισμένα από τη φύση τους, και «αραιώνονται» από το κυκλοφορούν ελεύθερο DNA μη καρκινικής προέλευσης.

Η **τεχνολογία ψηφιακής PCR σταγονιδίων (ddPCR)**, είναι ένα ισχυρό εργαλείο που έχει τη δυνατότητα να ικανοποιήσει την ανάγκη για **ταχεία, και εξαιρετικά ευαίσθητη ανίχνευση μεταλλάξεων κλινικής σημασίας, όπως η *KRAS* G12C, στο cfDNA των ασθενών με ΜΜΚΠ**, με συχνότητες μεταλλαγμένων αλληλόμορφων (MAF) τόσο χαμηλές όσο 0.01%.

ΣΚΟΠΟΣ

Η χρήση της **βελτιστοποιημένης μεθοδολογίας ψηφιακής PCR σταγονιδίων (ddPCR)** για την παρακολούθηση της **ποσοτικής μεταβολής του φορτίου** της μετάλλαξης *KRAS* G12C (MAF) στο cfDNA σε δείγματα πλάσματος ασθενών με μεταστατικό ΜΜΚΠ που συλλέχθηκαν σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία κατά τη θεραπεία.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

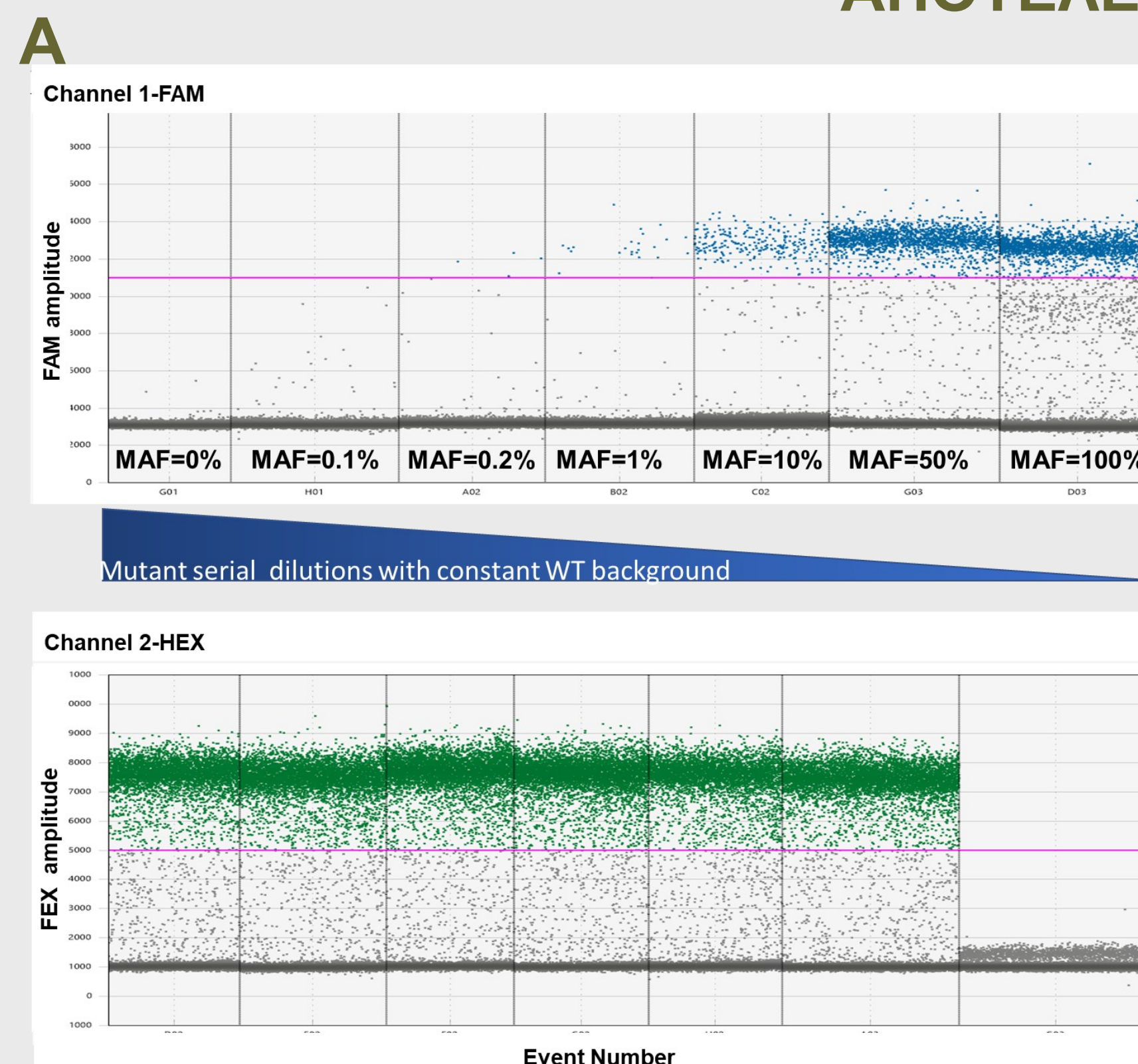
Συλλογή βιολογικών δειγμάτων: Δείγματα πλάσματος συλλέχθηκαν από 26 ασθενείς με ΜΜΚΠ και ανιχνεύσιμη μετάλλαξη *KRAS* G12C στον ιστό, πριν την έναρξη πρώτης γραμμής συστηματικής θεραπείας (T0) και στην πρώτη εκτίμηση ή υποτροπή της νόσου (T1). Οι ασθενείς λάμβαναν θεραπεία πρώτης γραμμής στη Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και έδωσαν την ενυπόγραφη συγκατάθεση τους για τη συμμετοχή στη μελέτη.

Απομόνωση cfDNA από δείγματα πλάσματος: Το cfDNA απομονώθηκε από 2 mL πλάσματος με τη χρήση ειδικού κιτ αντιδραστηρίων και ποσοτικοποιήθηκε με τη χρήση φθορισμομέτρου τύπου QUBIT. Το cfDNA που απομονώθηκε από τα δείγματα πλάσματος των ασθενών με ΜΜΚΠ αναλύθηκε με τη μέθοδο ddPCR.

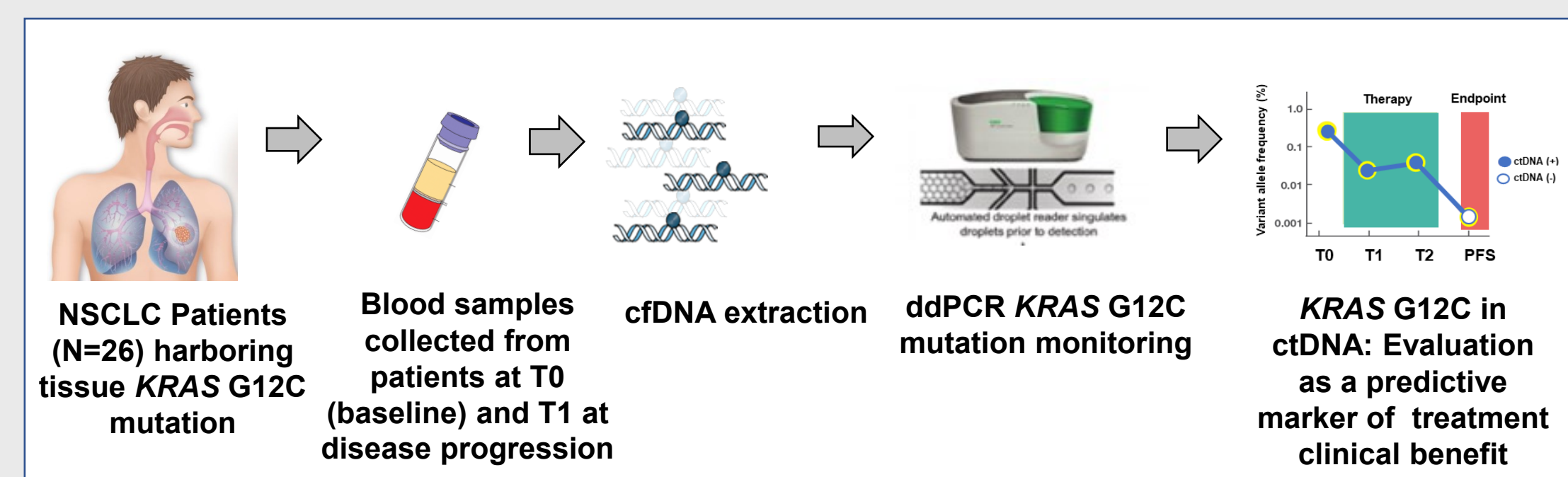
Ανάπτυξη υπερευαίσθητης μεθοδολογίας ddPCR για την ανάλυση της *KRAS* G12C μετάλλαξης: Βελτιστοποιήθηκαν οι αντιδράσεις ddPCR (QX200, BioRad) για την ταυτόχρονη ανίχνευση της G12C και της wild-type (WT) αλληλουχίας του εξωνίου 2 του *KRAS* στα δείγματα cfDNA. Προσδιορίστηκε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου με πειράματα ελέγχου χρησιμοποιώντας σειριακές αραιώσεις της μεταλλαγμένης αλληλουχίας σε υπόβαθρο *KRAS* WT αλληλουχίας σε συγκεντρώσεις 0.1%, 0.2%, 1%, 10%, 50%, και 100%. Η αντίδραση ddPCR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad).

Ανάλυση αποτελεσμάτων: Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό QuantaSoft Analysis Pro για τον προσδιορισμό του φορτίου σε copies/mL πλάσματος της G12C μετάλλαξης σε κάθε δείγμα και για τον υπολογισμό του MAF.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



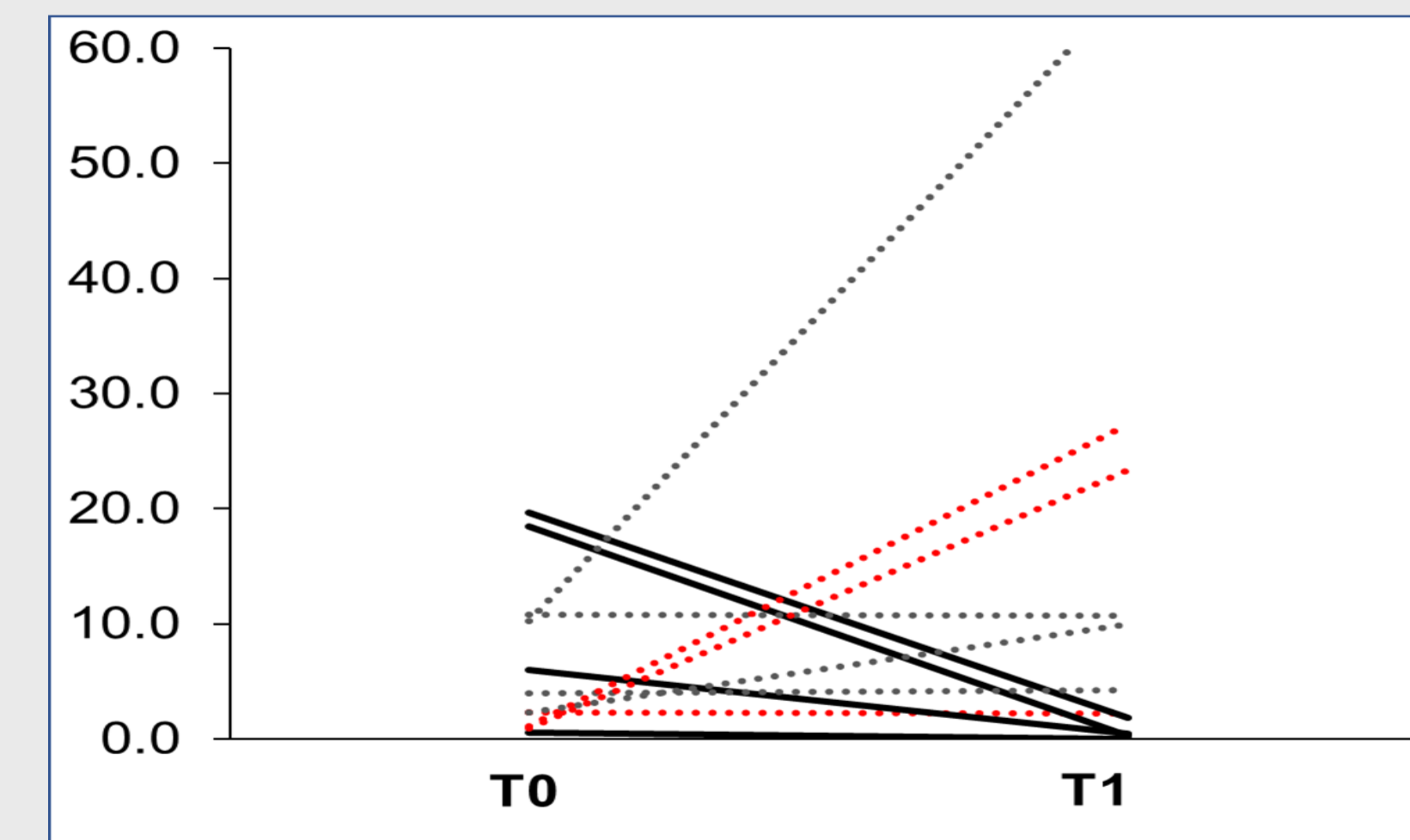
Εικόνα 1. Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου ddPCR με πειράματα ελέγχου. **A.** 1D scatter plot των σειριακών αραιώσεων της *KRAS* G12C σε υπόβαθρο WT αλληλουχίας σε συγκεντρώσεις MAF από 0.1%, 0.2%, 1%, 10%, 50%, μέχρι και 100%. Η ανίχνευση της μεταλλαγμένης αλληλουχίας G12C του *KRAS* γίνεται με σημασμένους με FAM ανιχνευτές και της wild-type αλληλουχίας με σημασμένους με HEX ανιχνευτές. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου προσδιορίστηκε στο 0.2% MUT/WT. **B.** Dynamic range of the ddPCR-based assay. Το R² υποδηλώνει γραμμική συσχέτιση μεταξύ του προσδιορισθέντος και θεωρητικού MAF.



Εικόνα 2. Δείγματα πλάσματος συλλέχθηκαν από 26 ασθενείς με ΜΜΚΠ και ανιχνεύσιμη μετάλλαξη *KRAS* G12C στον ιστό, πριν την έναρξη πρώτης γραμμής συστηματικής θεραπείας (T0) και στην πρώτη εκτίμηση ή υποτροπή της νόσου (T1).

<i>KRAS</i> G12C	<i>KRAS</i> G12C	Αρ. Ασθενών (Ποσοστό)
Ιστός	Πλάσμα	
MUT	MUT	8 (30.77%)
MUT	WT	18 (69.23%)
Σύνολο		26 (100%)

Πίνακας 1. Από τους 26 ασθενείς με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στον ιστό με Sanger, οι 8 (30.77%) είχαν ανιχνεύσιμη μετάλλαξη και στο πλάσμα (cfDNA) πριν την έναρξη πρώτης γραμμής θεραπείας (T0) όπως ελέγχθηκαν με τη ddPCR. Στους υπόλοιπους 18 (69.23%) ασθενείς με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη στον ιστό, δεν ανιχνεύτηκε η μετάλλαξη *KRAS* G12C στο δείγμα πλάσματος κατά το χρονικό σημείο T0.



Εικόνα 3. Σε 6 ασθενείς με πρόοδο νόσου, ανιχνεύτηκε αύξηση του *KRAS* G12C MAF στο T1 σε σχέση με το T0 (διακεκομμένη γραμμή). Σε 3 από τους 18 ασθενείς με μη ανιχνεύσιμη *KRAS* G12C στο πλάσμα κατά την T0, η *KRAS* G12C έγινε ανιχνεύσιμη στο πλάσμα κατά την υποτροπή της νόσου (T1). Για τους 4 ασθενείς με μειωμένο ή σταθερό *KRAS* G12C MAF στο T1 σε σχέση με το T0, κανένας δεν είχε πρόοδο νόσου (μαύρη γραμμή).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Τα προκαταρκτικά μας αποτελέσματα δείχνουν ότι η ddPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ευαίσθητη ανίχνευση της *KRAS* G12C σε ελεύθερο κυττάρων κυκλοφορούν καρκινικό DNA από ασθενείς με ΜΜΚΠ, με όριο ανίχνευσης 0,2% MAF.
- ✓ Από τους 26 ασθενείς με ανιχνεύσιμη μετάλλαξη *KRAS* G12C στον ιστό με Sanger, οι **8 (30.77%)** είχαν ανιχνεύσιμη μετάλλαξη και στο πλάσμα όπως ελέγχθηκαν με τη ddPCR
- ✓ Σε 6 ασθενείς με πρόοδο νόσου, ανιχνεύτηκε αύξηση του *KRAS* G12C MAF στο T1 σε σχέση με το T0. Για τους 4 ασθενείς με μειωμένο ή σταθερό *KRAS* G12C MAF στο T1 σε σχέση με το T0, κανένας δεν είχε πρόοδο νόσου.
- ✓ Η **ποσοτικοποίηση και παρακολούθηση του φορτίου της μετάλλαξης *KRAS* G12C στο cfDNA ασθενών με ΜΜΚΠ, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό προγνωστικό και προβλεπτικό εργαλείο, επιλύοντας προβλήματα έλλειψης ιστού.**

Βιβλιογραφία

- Desage, A.L.; Leonce, C.; Swalduz, A.; Ortiz-Cuaran, S. Targeting *KRAS* Mutant in Non-Small Cell Lung Cancer: Novel Insights Into Therapeutic Strategies. *Front Oncol* 2022, 12, 796832, doi:10.3389/fonc.2022.796832.
- Lietman, C.D.; Johnson, M.L.; McCormick, F.; Lindsay, C.R. More to the *RAS* Story: *KRAS*(G12C) Inhibition, Resistance Mechanisms, and Moving Beyond *KRAS*(G12C). *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2022, 42, 1-13, doi:10.1200/EDBK_351333.
- Sochacka-Cwikla, A.; Maczynski, M.; Regiec, A. FDA-Approved Small Molecule Compounds as Drugs for Solid Cancers from Early 2011 to the End of 2021. *Molecules* 2022, 27, doi:10.3390/molecules27072259.
- Olsen, S.; Liao, J.; Hayashi, H. Real-World Clinical Outcomes after Genomic Profiling of Circulating Tumor DNA in Patients with Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Curr. Oncol.* 2022, 29, 4811-4826. <https://doi.org/10.3390/currenco29070382>
- Michaelidou K, Koutoulaki C, Mavridis K, Vorrias E, Papadaki MA, Koutsopoulos AV, Mavroudis D, Agelaki S. Detection of *KRAS* G12/G13 Mutations in Cell Free-DNA by Droplet Digital PCR, Offers Prognostic Information for Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cells.* 2020; 9(11):2514. <https://doi.org/10.3390/cells9112514>

Ευχαριστίες

Μέρος της παρούσας εργασίας χρηματοδοτήθηκε από την Εταιρεία Ογκολόγων - Παθολόγων Ελλάδας (Ε.Ο.Π.Ε.)