



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών
— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Διευθυντής: Ν. Καβαντζάς Καθ. Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:

**«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο: Έρευνα και
Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της
Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»**

Διευθυντής ΠΜΣ

Στ. Θεοχάρης Καθ. Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: Μελέτη της κατάστασης των γονιδίων *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*,
ALK και της έκφρασης PD-L1 σε σειρά μη μικροκυτταρικών
καρκινωμάτων πνεύμονα ενός Πανεπιστημιακού Τριτοβάθμιου
Νοσοκομείου**

Όν/μο: Ρουμπούτσου Μαρία

Αρ. μητρώου: 20190644

Ιδιότητα: Ιατρός

Επιβλέπων ΜΔΕ: Φούκας Περικλής

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

**«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο: Έρευνα και
Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της
Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΕΡΙΚΛΗΣ ΦΟΥΚΑΣ (Επιβλέπων)

ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΙΔΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Ιδιαίτερες ευχαριστίες για τη βοήθεια τους στην εκπόνηση της εργασίας στους

Περικλή Φούκα,

Ιωάννη Παναγιωτίδη,

Άρη Σπάθη,

Ευαγγελία Αγγελοπούλου,

Δανάη Λεβεντάκου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
-----------------	----------

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
---------------------	----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο - ΓΟΝΙΔΙΟ *EGFR*

1.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	4
1.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	5
1.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	7
1.4 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	7
1.5 ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ	7
1.6 ΑΝΑΣΤΟΛΗ	7
1.7 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο - ΓΟΝΙΔΙΟ *BRAF*

2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	10
2.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	12
2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	12
2.4 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	13
2.5 ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ	13
2.6 ΑΝΑΣΤΟΛΗ	13
2.7 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο - ΓΟΝΙΔΙΟ *KRAS*

3.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	15
3.2 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	16
3.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	17
3.4 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	17
3.5 ΑΝΑΣΤΟΛΗ	17

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - ΓΟΝΙΔΙΟ *ALK*

4.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	18
4.2 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ <i>ALK</i>	18
4.3 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	19
4.4 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	19
4.5 ΑΝΑΣΤΟΛΗ	20
4.6 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	20

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο - PD-L1

5.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ	21
5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	21
5.3 ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ	22
5.4 ΑΝΑΣΤΟΛΗ	22

ΜΕΛΕΤΗ	24
---------------	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο – ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ **24**

6.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	24
6.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	24
6.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ **26**

7.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ	26
7.2 ΣΥΧΝΟΤΗΤΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ	29
7.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ	31
7.4 ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ	32
7.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΠΡΟΣΦΑΤΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ	32

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ **34**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	35
-----------------	-----------

ABSTRACT	36
-----------------	-----------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	37
---------------------	-----------

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα καρκινικά κύτταρα εμπεριέχουν πολλές γενετικές ανωμαλίες, ένα μέρος εκ των οποίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες που είναι ουσιαστικές για την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Οι μεταλλάξεις οδηγοί (driver mutations) εκκινούν την εξέλιξη ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό, το οποίο δεν επιδέχεται ρύθμιση μέσω αναστολής ανατροφοδότησης. Αν απενεργοποιηθούν αυτές οι μεταλλάξεις, τότε το καρκινικό κύτταρο οδηγείται σε θάνατο. (Weinstein and Joe, 2006; UpToDate, 2021)

Οι μεταλλάξεις οδηγοί συμβαίνουν νωρίς κατά την εξέλιξη του όγκου, οπότε είναι κλωνικές και διατηρούνται στους υποκλώνους που αναπτύσσονται κατά την πρόοδο του καρκίνου. Οδηγούν στην ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπεριέχουν κινάσες και είναι συχνά αμοιβαίως αποκλειόμενες, δηλαδή το καρκινικό κύτταρο είναι απίθανο να παρουσιάζει πάνω από μία μετάλλαξη οδηγό. (Govindan et al., 2012; UpToDate, 2021; Zhang, Yang and Gray, 2009)

Με την ανάλυση των μεταλλάξεων οδηγών αποσαφηνίζεται περαιτέρω η μοριακή παθογένεση του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος πνεύμονα (NSCLC- Non-Small Cell Cancer). Ήδη από τις αρχές του 2000 έχουν αναπτυχθεί παράγοντες που στοχεύουν σε συγκεκριμένα μοριακά μονοπάτια στα καρκινικά κύτταρα που απενεργοποιούν μεταλλάξεις οδηγούς, θανατώνοντας έτσι μόνο αυτά, ενώ είναι σχετικά αβλαβείς για τα φυσιολογικά κύτταρα. (Travis et al., 2015, pp.22-25; UpToDate, 2021)

Παρά την ανάπτυξη της στοχευμένης θεραπείας, τελικά τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν αντίσταση στη θεραπεία, η οποία μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις κατηγορίες.

- Η πρώτη αφορά σε αντοχή που αναπτύσσεται μέσω αλλαγών στο γονίδιο-στόχο, όπως ενίσχυση του γονιδίου ή δεύτερη μετάλλαξη σε περιοχή του γονιδίου που αφορά στο σημείο σύνδεσης με το φάρμακο της στοχευμένης θεραπείας (On-target resistance).
- Η δεύτερη κατηγορία μηχανισμού αντοχής αφορά στην ενεργοποίηση μεταγενέστερων μονοπατιών στον καταρράκτη της σηματοδότησης (Off-target resistance), ενώ
- στην τρίτη κατηγορία παρατηρείται φαινοτυπική τροποποίηση, δηλαδή το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα μετατρέπεται σε μικροκυτταρικό (Phenotypic transformation). (Engelman et al., 2007; Gainor and Shaw, 2013; Garraway and Jänne, 2012; Kim et al., 2013; Niederst et al., 2015; Ohashi et al., 2012; Rotow and Bivona, 2017; Sequist et al., 2011; Witta et al., 2006)

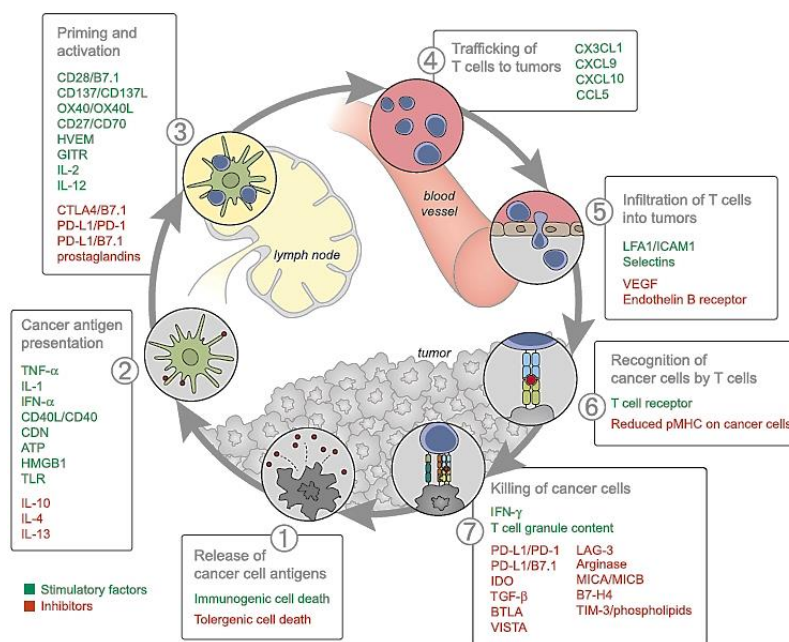
Το μοντέλο των δυο διαμερισμάτων (two-compartment model) μπορεί να περιγράψει τις κυριότερες οδούς στην μοριακή παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα. Σύμφωνα με αυτό, ο κάθε πνεύμονας χωρίζεται ανατομικά σε δύο διαμερίσματα με διακριτές λειτουργίες, στα οποία εντοπίζονται διαφορετικά επιθηλιακά κύτταρα και διαφορετικές φωλεές αρχέγονων ή στελεχιαίων κυττάρων (stem cell niches). Στο διαμέρισμα του κεντρικού αεραγωγού λαμβάνει χώρα η αγωγή του εισπνεόμενου αέρα, ενώ στο περιφερικό διαμέρισμα της τελικής αναπνευστικής μονάδας γίνεται η ανταλλαγή των αερίων. Στους καπνιστές οι καρκινογόνες ουσίες του καπνού φαίνεται να στοχεύουν το κεντρικό και το περιφερικό διαμέρισμα, επηρεάζουν όμως περισσότερο το κεντρικό διαμέρισμα. Αντίθετα, στους μη-καπνιστές το καρκίνωμα του πνεύμονα παρουσιάζεται στην τελική αναπνευστική μονάδα εξ αιτίας

παραγόντων που δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί. Η ενεργοποίηση του γονιδίου *KRAS* (Kirsten RAt Sarcoma virus gene) παρατηρείται σε αδενοκαρκινώματα και πλακώδη καρκινώματα πνεύμονα πιο συχνά στους καπνιστές και άρα συχνότερα στην περιοχή της πύλης, ενώ η ενεργοποίηση του γονιδίου *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) και αλλαγές του γονιδίου *ALK* (Anaplastic Lymphoma Kinase) έχουν συσχετισθεί με αδενοκαρκινώματα πνεύμονα σε μη-καπνιστές, στην περιφέρεια του πνευμονικού παρεγχύματος. (Travis et al., 2015, pp.22-25)

Οι γενετικές αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα που επιφέρουν απώλεια φυσιολογικών ρυθμιστικών λειτουργιών οδηγούν στην έκφραση νεοαντιγόνων. Τα πεπτίδια αυτών παρουσιάζονται μέσω του συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC- Major HistoCompatibility) τύπου I στη μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων και αναγνωρίζονται από τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα, τα οποία ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση στο καρκινικό κύτταρο. (Boon et al., 1994)

Ο κύκλος ανοσίας κατά του καρκίνου (Cancer – Immunity cycle) περιγράφει τα βήματα για την αποτελεσματική δράση του ανοσοποιητικού συστήματος κατά των καρκινικών κυττάρων. Αρχικά, τα νεοαντιγόνα απελευθερώνονται από τα καρκινικά κύτταρα και αναγνωρίζονται από τα δενδριτικά ή τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Έπειτα αυτά παρουσιάζουν τα νεοαντιγόνα στα MHC τύπου I και II στα T λεμφοκύτταρα του λεμφαδένα, ενεργοποιώντας έτσι την ανοσολογική απάντηση στα καρκινικά κύτταρα. Ο τύπος της ανοσολογικής απάντησης καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ T εκτελεστικών και T ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Τα T κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα μεταφέρονται μέσω των αγγείων στον όγκο. Εκεί μέσω του υποδοχέα T λεμφοκυττάρου (TCR- T Cell Receptor) τα T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν τα πεπτίδια του νεοαντιγόνου στα MHC τύπου I των καρκινικών κυττάρων και ασκούν την κυτταροτοξική τους δράση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να απελευθερώνονται επιπλέον νεοαντιγόνα και έτσι έχουμε επανεκκίνηση του κύκλου. (Motz and Coukos, 2013)

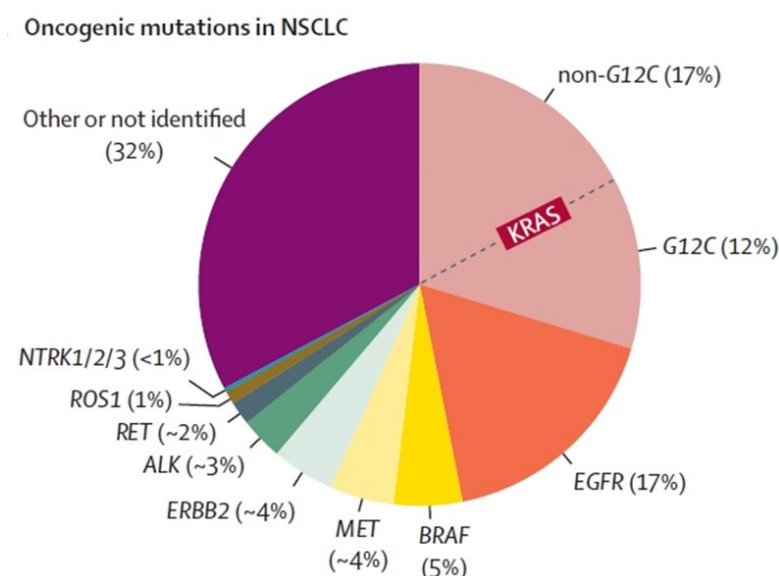
Κάθε βήμα του κύκλου ρυθμίζεται από ενεργοποιητικούς και ανασταλτικούς παράγοντες, ένας εκ των οποίων είναι το PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1). (Chen and Mellman, 2013)



Εικόνα 1 Κύκλος ανοσίας κατά του καρκίνου (Chen and Mellman, 2013)

Ο NSCLC είναι η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. (Ferlay et al., 2014) Εκτός από την ιστολογική του ταξινόμηση, πλέον με την αυξανόμενη γνώση στη βιολογία του καρκίνου του πνεύμονα, ο NSCLC κατηγοριοποιείται σε μοριακούς υποτύπους με βάση τις γενετικές αλλαγές συγκεκριμένων γονιδίων, όπως *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), *ALK*. (Linardou et al., 2019)

Οι συχνότητες των πιο συχνών μεταλλάξεων οδηγών στο NSCLC φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 2 Συχνότητες των πιο συχνών μεταλλάξεων οδηγών σε NSCLC (Thai et al., 2021)

Καθώς το μοριακό προφίλ των όγκων μπορεί να παρουσιάζει ετερογένεια μεταξύ των εθνικοτήτων, πρωταρχικός σκοπός αυτής της διπλωματικής εργασίας είναι η περιγραφή της συχνότητας και του είδους των μεταλλάξεων των γονιδίων *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, των ανασυνδυασμών του *ALK* και της έκφρασης του PD-L1 σε μια σειρά ασθενών που διαγνώστηκαν με NSCLC από τον Ιανουάριο του 2010 έως το Σεπτέμβριο του 2021 σε ένα Τριτοβάθμιο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Αθήνας.

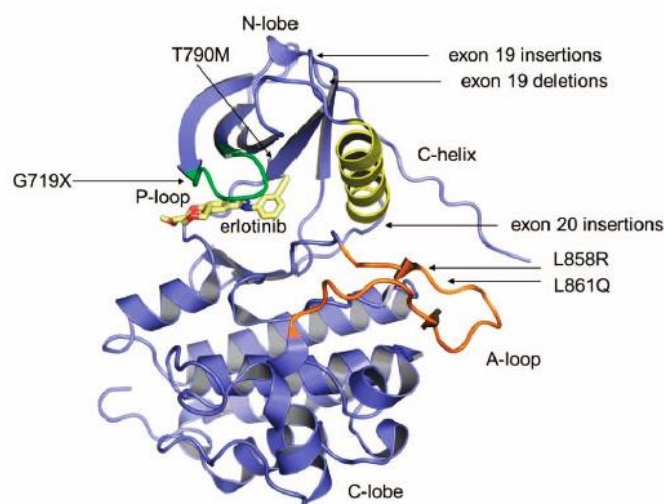
Στο γενικό μέρος που αποτελείται από τα κεφάλαια 1 έως 5 θα γίνει βιβλιογραφική αναφορά στη δομή, λειτουργία, μεταλλάξεις, θεραπεία και μηχανισμούς αντίστασης στη θεραπεία για κάθε γονίδιο ξεχωριστά. Στη συνέχεια στο μέρος της μελέτης που αποτελείται από τα κεφάλαια 6-8 θα περιγραφούν οι μέθοδοι και τα αποτελέσματα της μελέτης της κατάστασης των γονιδίων *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, *ALK* και της έκφρασης του PD-L1. Τα αποτελέσματα θα συγκριθούν με πρόσφατες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ελληνικό πληθυσμό κι έπειτα θα παρουσιασθούν τα συμπεράσματα της μελέτης.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο - ΓΟΝΙΔΙΟ *EGFR*

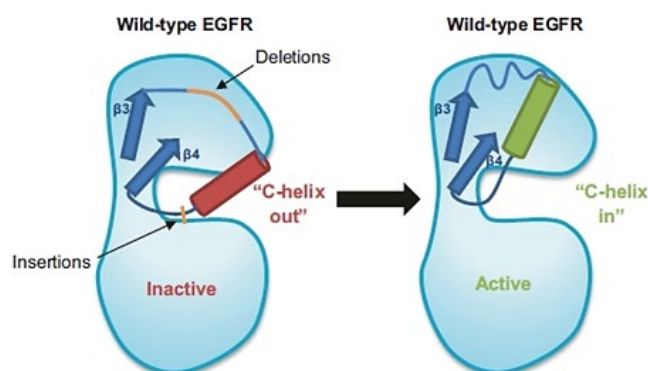
1.1 Δομή και λειτουργία

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) ανήκει στην οικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων αυξητικών παραγόντων ErbB. (Burke et al., 2016, pp.1330-1331) Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 621 αμινοξέα με μεγάλη συμμετοχή κυστεΐνης στο αμινοτελικό άκρο. Το άκρο αυτό προβάλλει στον εξωκυττάριο χώρο και αναγνωρίζει και προσδένεται με τον EGF συνδέτη. Το διαμεμβρανικό τμήμα αποτελείται από 23 υδρόφοβα αμινοξέα που διαπερνούν την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδας της πλασματικής μεμβράνης μέχρι το κυτταρόπλασμα. Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελείται από 542 αμινοξέα, βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και είναι πλούσιο σε κινάσες τυροσίνης. Όταν ο EGF συνδέτης συνδεθεί με το εξωκυττάριο άκρο του EGFR, ενεργοποιούνται οι κινάσες του κυτταροπλασματικού τμήματος του υποδοχέα, αυτές με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τυροσίνες συγκεκριμένων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών, ενεργοποιώντας έτσι τα μονοπάτια PI3K (PhosphoInositide-3 Kinase)/AKT (Protein Kinase B) /mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), RAS (RAr Sarcoma gene)/RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma gene)/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) και STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), τα οποία είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και τη διαίρεση του κυττάρου. (Burke et al., 2016, pp.1330-1331; Weinberg, 2013 p.138-143) Η δομή της τυροσινικής κινάσης του EGFR φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 3 Δομή τυροσινικής κινάσης EGFR (Gerber, Gandhi and Costa, 2014)

Μορφολογικά, με τη σύνδεση του EGF συνδέτη στον EGFR η ρυθμιστική έλικα C του EGFR μετακινείται από μια προς τα έξω, ανενεργό διαμόρφωση σε μια προς τα έσω, ενεργό διαμόρφωση. (Vyse and Huang, 2019)



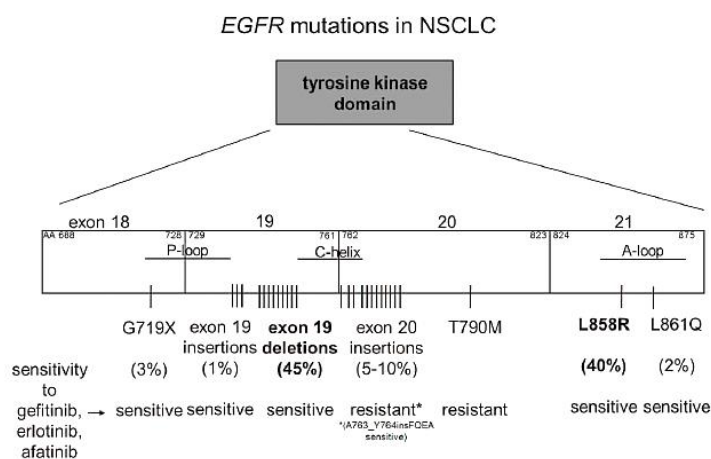
Εικόνα 4 Διαμόρφωση EGFR στην ανενεργό και στην ενεργό κατάσταση (Vyse and Huang, 2019)

1.2 Μεταλλάξεις

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *EGFR* είναι οι πιο συχνές μεταλλάξεις που παρατηρούνται στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Η συχνότητά τους παρουσιάζει γεωγραφική κατανομή, αποτελώντας στην Ευρώπη το 15% των μεταλλάξεων μη μικροκυτταρικού καρκινώματος πνεύμονα και το 62% στην Ασία. (Midha et al., 2015; Shi et al., 2014)

Όλες οι μεταλλάξεις του *EGFR* εντοπίζονται στα εξόνια 18-22 που κωδικοποιούν την τυροσινική κινάση, αφορούν στο σημείο της κινάσης που προσδένεται με το ATP (Adenosine Triphosphate) με αποτέλεσμα μειωμένη συγγένεια για το ATP και μόνιμα ενεργό λειτουργία κινάσης, ανεξάρτητα από τη σύνδεση του EGF συνδέτη. (Carey et al., 2006; Eck and Yun, 2010; Mulloy et al., 2007; Vyse and Huang, 2019)

Οι περισσότερες μεταλλάξεις παρατηρούνται στο εξόνιο 19 (45% των μεταλλάξεων), 21 (40 με 45%), 18 (5%) και στο εξόνιο 20 (<1%). (Burke et al., 2016, pp.1330-1331) Πιο συγκεκριμένα, το 85% των σωματικών μεταλλάξεων του *EGFR* είναι απαλείψεις στο εξόνιο 19 (E19 del) και αντικατάσταση της λευκίνης από αργινίνη στο κωδικόνιο 858 του εξωνίου 21 (E21 L858R). (Thai et al., 2021)



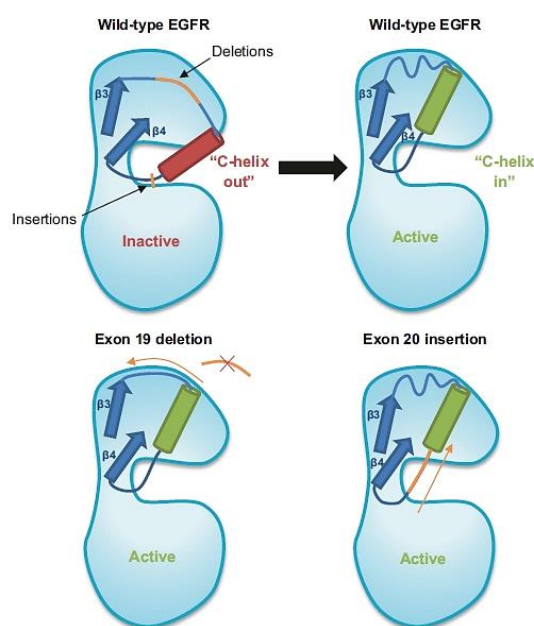
Εικόνα 5 Μεταλλάξεις γονιδίου *EGFR* (Gerber, Gandhi and Costa, 2014)

Μεταξύ των λιγότερο συνήθων μεταλλάξεων οι προσθήκες στο εξώνιο 20 (E20 ins) είναι οι πιο συχνές και παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, καθώς προσθήκες μπορούν να συμβούν οπουδήποτε στην έλικα C ή και στη θηλιά μετά την έλικα C. Άλλες σπάνιες μεταλλάξεις είναι η αντικατάσταση της γλυκίνης από οποιοδήποτε αμινοξύ στο κωδικόνιο 719 του εξωνίου 18 (E18 G719X), η αντικατάσταση της σερίνης από ισολευκίνη στο κωδικόνιο 768 του εξωνίου 20 (E20 S768I), η αντικατάσταση της θρεονίνης από μεθειονίνη στο κωδικόνιο 790 του εξωνίου 20 (E20 T790M) και η αντικατάσταση της λευκίνης από γλουταμίνη στο κωδικόνιο 861 του εξωνίου 21 (E21 L861Q). (Gerber, Gandhi and Costa, 2014)

Ειδικά, με τις E19 del αφαιρούνται αμινοξέα σε σημεία που οδηγούν στην ώθηση της έλικας C προς το αμινοτελικό άκρο του EGFR, ο οποίος αποκτά μόνιμα την ενεργό διαμόρφωση με αποτέλεσμα τη μόνιμη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών.

Αντίθετα, με τις περισσότερες προσθήκες στο εξώνιο 20 (E20 ins) προστίθενται αμινοξέα σε σημεία ώστε να απομακρύνεται η έλικα C από το καρβοξυτελικό άκρο του EGFR, ο οποίος αποκτά, πάλι, την ενεργό διαμόρφωση, όπως φαίνεται στην εικόνα 6. (Vyse and Huang, 2019)

Οι μεταλλάξεις E19 del και E21 L858R έχουν προβλεπτική αξία, καθώς η παρουσία τους σημαίνει ανταπόκριση στη θεραπεία με αναστολείς τυροσινικής κινάσης (EGFR TKIs- Tyrosine Kinase Inhibitors), οι οποίοι θα οδηγήσουν το καρκινικό κύτταρο σε απόπτωση. (Skoulidis and Heymach, 2019; Thai et al., 2021)



Εικόνα 6 Επίπτωση E19 del και E20 ins στην ενεργό διαμόρφωση του EGFR (Vyse and Huang, 2019)

1.3 Μέθοδοι ανίχνευσης

Οι μέθοδοι ανίχνευσης των μεταλλάξεων του *EGFR* είναι οι PCR (Polymerase Chain Reaction) και αλληλούχιση με μέθοδο Sanger ή με αλληλούχιση επόμενης γενεάς (NGS- Next Generation Sequencing). (Roy-Chowdhuri, 2021)

1.4 Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Υπάρχουν μελέτες που έχουν συσχετίσει την παρουσία των μεταλλάξεων του *EGFR* με τον ιστολογικό υπότυπο του NSCLC. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει συσχέτιση αυτών με το κυψελιδικό, λεπιδικό και το μικροθηλώδες αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. Καρκινώματα πνεύμονα με συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης είναι λιγότερο πιθανό να φέρουν μεταλλάξεις του *EGFR*. (Burke et al., 2016, pp.1330-1331)

1.5 Προγνωστική σημασία

Ασθενείς με E20 ins παρουσιάζουν 75% αυξημένο κίνδυνο θανάτου σε σχέση με ασθενείς που φέρουν τις κοινές μεταλλάξεις του *EGFR*. Μάλιστα η πενταετής επιβίωση για τους ασθενείς με E20 ins είναι 8%, ενώ για ασθενείς με τις κοινές μεταλλάξεις του *EGFR* η πενταετής επιβίωση είναι 19%. (Girard et al., 2021)

1.6 Αναστολή

Σύμφωνα με τις τελευταίες οδηγίες της ESMO (European Society for Medical Oncology) στην αναθεωρημένη έκδοση 15 Σεπτεμβρίου 2020 όλοι οι ασθενείς με μεταστατικό NSCLC πρέπει να ελέγχονται για την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο του *EGFR*. Σε περίπτωση παρουσίας των μεταλλάξεων αυτών, προτιμάται οι ασθενείς να λαμβάνουν ως πρώτης γραμμής θεραπεία osimertinib (σύσταση I,A-I: Ενδείξεις από τουλάχιστον μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη μελέτη με καλή μεθοδολογική ποιότητα ή από μετα-αναλύσεις από σωστά διεξαχθείσες τυχαιοποιημένες μελέτες χωρίς ετερογένεια, A: Ισχυρές ενδείξεις για αποτελεσματικότητα με σημαντικό κλινικό όφελος, συνιστάται ανεπιφύλακτα). Εναλλακτικά, οι ασθενείς αυτοί μπορούν να λάβουν erlotinib (σύσταση I,A) ή gefitinib (σύσταση I,A) ή afatinib (σύσταση I,A). Σύστασης I,B (B: Ισχυρές ή μέτρια ισχυρές ενδείξεις για την αποτελεσματικότητα αλλά με περιορισμένο κλινικό όφελος, γενικά συνιστάται) αποτελούν ο συνδυασμός erlotinib με ramucirumab, έναν IgG1 VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) ανταγωνιστή, που προσφέρει μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο εξέλιξης της νόσου (PFS- Progression Free Survival) σε σχέση με τη μονοθεραπεία με erlotinib (19.4 μήνες vs 12.4 μήνες), η μονοθεραπεία με dacomitinib και ο συνδυασμός gefitinib με carboplatin και pemetrexed. Σύστασης II,B (II: Μικρές τυχαιοποιημένες δοκιμές ή μεγάλες τυχαιοποιημένες δοκιμές με υποψία σφαλμάτων - χαμηλότερη μεθοδολογική ποιότητα- ή μετα-αναλύσεις τέτοιων δοκιμών ή δοκιμών με αποδεδειγμένη ετερογένεια) αποτελεί η θεραπεία με erlotinib και bevacizumab που προσφέρει βελτιωμένο PFS κατά 3.6 μήνες σε σχέση με τη μονοθεραπεία erlotinib. (Planchard et al., 2018; Ramalingam et al., 2020)

Όλοι οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *EGFR* θα λάβουν τη θεραπεία με τους EGFR TKIs, ανεξαρτήτως φύλου, ιστολογίας όγκου, φυσικής κατάστασης, κατανάλωσης καπνού.

Αν παρατηρηθεί τοπική πρόοδος νόσου (oligoprogression), συνεχίζεται η θεραπεία με EGFR TKIs και εφαρμόζεται επιπλέον τοπική θεραπεία με χειρουργείο ή ακτινοβολία. Σε περίπτωση γενικευμένης προόδου της νόσου, σύμφωνα με τις οδηγίες της ESMO, πρέπει να γίνεται έλεγχος για την παρουσία της μετάλλαξης E20 T790M έπειτα από επανάληψη βιοψίας ή από το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (fcDNA- free circulating DNA) σε πλάσμα αίματος όταν η βιοψία δεν είναι εφικτό να επαναληφθεί. Αν εντοπιστεί η μετάλλαξη, τότε χορηγείται osimertinib σε περίπτωση που δεν έχει ήδη χορηγηθεί. Αν δεν εντοπιστεί η μετάλλαξη, τότε χορηγείται σχήμα που έχει βάση δύο πλατίνες (σύσταση I,A) ή ο συνδυασμός carboplatin με paclitaxel, atezolizumab και bevacizumab, όταν δεν υπάρχουν αντενδείξεις για έναρξη ανοσοθεραπείας (σύσταση III,A- III: Προοπτικές μελέτες κοόρτης). (Planchard et al., 2018)

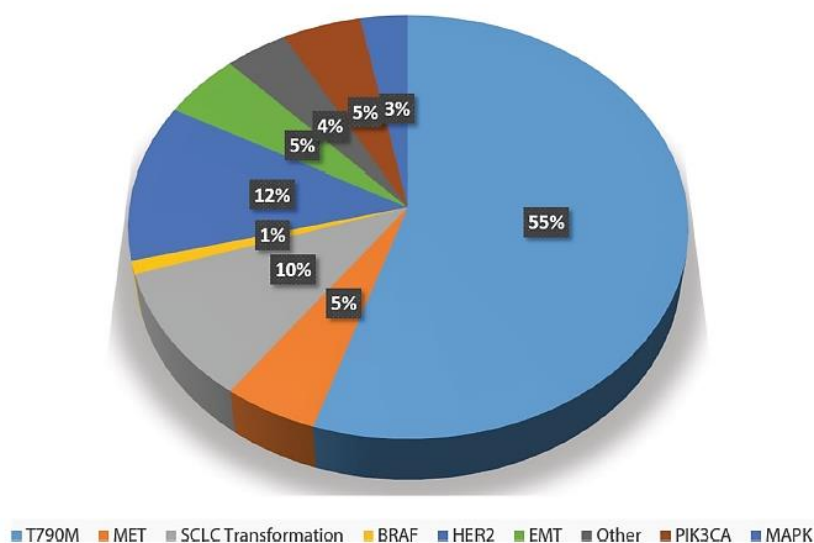
Στις ανανεωμένες οδηγίες του NCCN (National Comprehensive Cancer Network) στην Αμερική για το 2021 και της ESMO στην Ευρώπη, βασισμένες στη μελέτη ADAURA, προτείνεται το osimertinib ως επικουρική θεραπεία μετά από χειρουργηθέν NSCLC σταδίου IB-IIIa, γι' αυτό ακόμα και σε NSCLC αρχικών σταδίων ελέγχουμε πάντα για την πιθανή παρουσία E19 del ή τη μετάλλαξη E21 L858R στο γονίδιο *EGFR*. (Aisner and Riely, 2021; Remon, Soria and Peters, 2021)

Οι ασθενείς με E20 ins δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με τους προαναφερθέντες EGFR TKIs λόγω του εμποδίου που δημιουργείται στη σύνδεση μεταξύ EGFR και TKI από τις προσθήκες, με εξαίρεση την A763_Y764ins που είναι ευαίσθητη στο afatinib. (Gerber, Gandhi and Costa, 2014) Η τρέχουσα πρώτη γραμμής θεραπευτική επιλογή γι' αυτές τις μεταλλάξεις είναι platinum με pemetrexed. Το Μάιο 2021 έλαβε έγκριση από τον FDA (Food and Drug Administration) η χορήγηση amivantamab, ενός αντισώματος που στοχεύει τον EGFR και το MET (met proto-oncogene -hepatocyte growth factor receptor), μετά τη χορήγηση χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα. (FDA grants accelerated approval to amivantamab-vmjw for mNSCLC, 2021) Τον Σεπτέμβριο του 2021 το mobocertinib (TAK-788) είναι ο πρώτος EGFR TKI που έλαβε έγκριση από τον FDA για τους ασθενείς με E20ins και μεταστατικό NSCLC. (FDA grants accelerated approval to mobocertinib for metastatic non-sma, 2021, Ramalingam et al., 2021) Οι μεταλλάξεις αυτές παρουσιάζουν, επίσης, ευαισθησία στο roziotinib, ένα μόριο μικρότερο και πιο εύκαμπτο από τους υπόλοιπους EGFR TKIs. (Riess et al., 2018; Robichaux et al., 2018)

1.7 Μηχανισμοί αντίστασης στη θεραπεία

Στο 50-60% των ασθενών που δεν ανταποκρίνονται στους EGFR TKIs λόγω ανάπτυξης αντοχής παρατηρείται η μετάλλαξη E20 T790M του *EGFR*. Άλλοι μοριακοί μηχανισμοί αντίστασης σε EGFR TKIs είναι η ενίσχυση του γονιδίου *MET*, η ενίσχυση του *HER2* (Human Epidermal growth factor Receptor 2), γονιδιακές αλλαγές στο *PIK3CA*, μεταλλάξεις του *BRAF* κυρίως V600E, μεταλλάξεις του *KRAS*, και μικροκυτταρική μετατροπή.(Planchard et al., 2018)

Mechanisms of Resistance to 1st and 2nd Generation EGFR TKIs

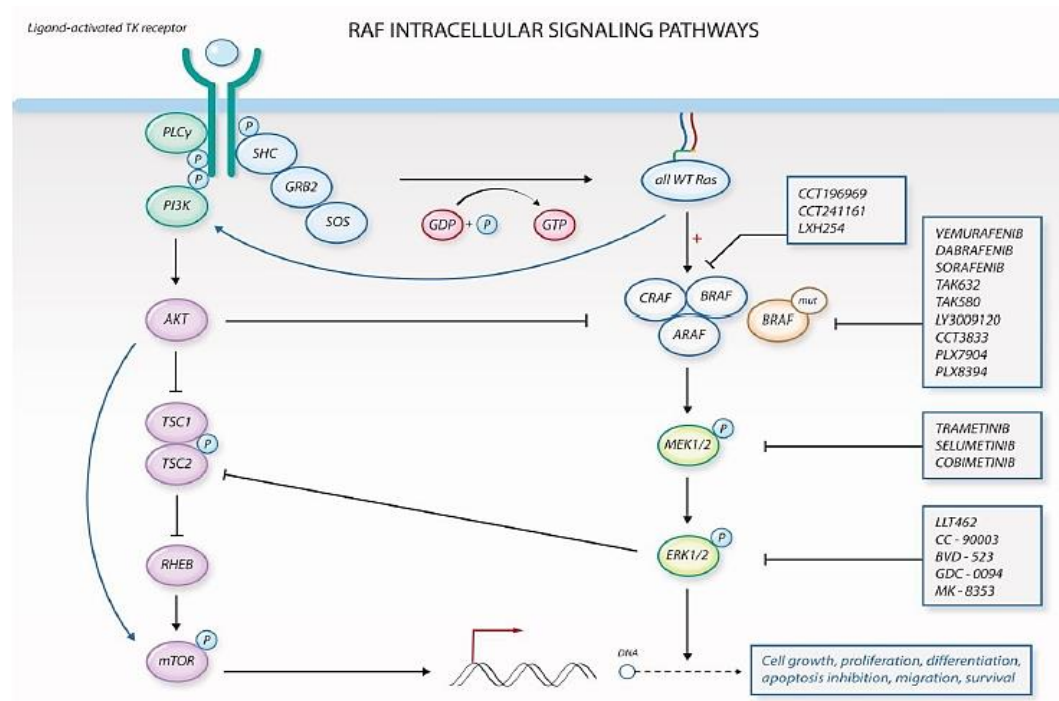


Εικόνα 7 Μηχανισμοί αντίστασης σε EGFR TKIs (Lim and Ma, 2019)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο - ΓΟΝΙΔΙΟ *BRAF*

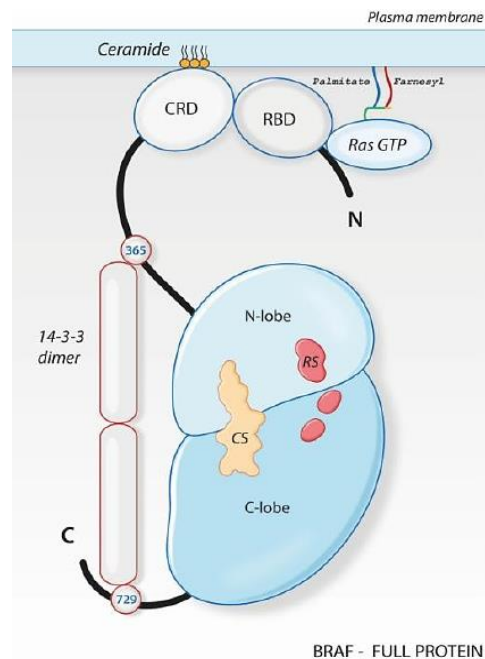
2.1 Δομή και λειτουργία

Το γονίδιο *BRAF* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 και κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης-θρεονίνης που συμμετέχει στο μονοπάτι MAPK/ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη του κυττάρου. (Leonetti et al., 2018; Paik et al., 2011) Η πρωτεΐνη BRAF, όπως και οι πρωτεΐνες MEK (MAPK/ERK Kinase), ERK μεταφέρουν σήματα από τον μεμβρανικό υποδοχέα στο DNA του πυρήνα του κυττάρου. Όταν ο αυξητικός παράγοντας συνδεθεί με τον υποδοχέα, ο τελευταίος διμερίζεται και αυτοφωσφορυλιώνεται μέσω της ενεργότητας τυροσινικής κινάσης. Έπειτα, με το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα συνδέεται και ενεργοποιείται το σύμπλεγμα GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2)- SOS (Son Of Sevenless homologue). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη SOS μετατρέπει την ανενεργό RAS σε ενεργό, απελευθερώνοντας GDP (Guanosine DiPhosphate) από τη RAS και συνδέοντας σε αυτή GTP (Guanosine TriPhosphate). Η ενεργός RAS φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες RAF, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τις πρωτεΐνες MEK1 και MEK2 και αυτές τις ERK1 και ERK2. Η πρωτεΐνη ERK μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες για την έκφραση γονιδίων. Παράλληλα, η πρωτεΐνη RAS φωσφορυλιώνει την PI3K, οπότε ενεργοποιείται το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR. Ταυτόχρονα, η πρωτεΐνη ERK αναστέλλει το σύμπλεγμα TSC1/2 (Tuberous Sclerosis Complex) που φυσιολογικά αναστέλλει το μονοπάτι PI3K/AKT/mTOR. (Leonetti et al., 2018)



Εικόνα 8 Σηματοδοτικό μονοπάτι πρωτεϊνών RAF (Leonetti et al., 2018)

Η πρωτεΐνη BRAF αποτελείται από τρεις σταθερές περιοχές που συναντώνται στην οικογένεια των RAF κινασών. Η σταθερή περιοχή 1 (CR1- Constant Region) παίζει ρόλο στην αρνητική αυτορρύθμιση της BRAF και περιέχει έναν τομέα σύνδεσης με την RAS (RBD- RAS Binding Domain) και έναν τομέα πλούσιο σε κυστεΐνη (CRD- Cysteine Rich Domain). Η CR2 βρίσκεται κοντά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης στα εξώνια 1-10, εμπεριέχει στοιχεία που αναστέλλουν τη σύνδεση με την RAS και την ενεργοποίηση της RAF, ενώ η CR3 βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης στα εξώνια 11-18, φέρει την ενεργότητα κινάσης χρησιμοποιώντας ATP και ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την RAS. (Leonetti et al., 2018)



Εικόνα 9 Δομή πρωτεΐνης BRAF (Leonetti et al., 2018)

2.2 Μεταλλάξεις

Μεταλλάξεις του γονιδίου *BRAF* ανιχνεύονται περίπου στο 5% των ασθενών με NSCLC και από αυτές οι μισές αφορούν στη γνωστή αντικατάσταση της βαλίνης από γλουταμινικό οξύ στο κωδικόνιο 600 (V600E) στο εξόνιο 15 της CR3. (Thai et al., 2021) Το 40% των μεταλλάξεων του γονιδίου *BRAF* αφορά στην ενεργοποιητική μετάλλαξη με αντικατάσταση της γλυκίνης από αλανίνη στο κωδικόνιο 469 (G469A), ενώ το 11% αφορά στην απενεργοποιητική μετάλλαξη με αντικατάσταση του ασπαρτικού οξέος από γλυκίνη στο κωδικόνιο 594 (D594G). (Planchard et al., 2018)

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *BRAF* που οδηγούν σε ενεργοποίηση αυτού, οδηγούν επίσης στην ενεργοποίηση και την αυξημένη έκφραση των γονιδίων *MEK* και *ERK1/2*, ανεξάρτητα από τη δραστηριότητα της πρωτεΐνης RAS. (Brose et al., 2002)

Στη μετάλλαξη V600E αυξάνεται μέχρι 500 φορές από το φυσιολογικό η ενεργότητα της κινάσης της πρωτεΐνης BRAF και η πρωτεΐνη δρα ως μονομερές όταν η δραστηριότητα της πρωτεΐνης RAS είναι χαμηλή. (Wan et al., 2004)

Στην ενεργοποιητική μετάλλαξη G469A η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο του *BRAF* λειτουργεί ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη RAS ως ομοδιμερές, χωρίς ενεργότητα ως μονομερές. Αντίθετα, στην απενεργοποιητική μετάλλαξη D594G η πρωτεΐνη του γονιδίου *BRAF* χάνει την ενεργότητα κινάσης ή φέρει μειωμένη ενεργότητα σε σχέση με τη φυσιολογική πρωτεΐνη, και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη ERK χωρίς να έχει τη δυνατότητα να αναστέλλει την πρωτεΐνη RAS. (Wan et al., 2004; Yao et al., 2015)

Εκτός από τις μεταλλάξεις, έχουν παρατηρηθεί ανασυνδυασμοί του γονιδίου *BRAF* σε εξαιρετικά μικρό ποσοστό NSCLC. (Reddy et al., 2017)

2.3 Μέθοδοι ανίχνευσης

Οι ασθενείς που έχουν διαγνωστεί με αδеноκαρκίνωμα πνεύμονα πρέπει να ελέγχονται για μεταλλάξεις *BRAF* ταυτόχρονα ή αφού αποκλεισθούν οι αμοιβαίως αποκλειόμενες μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του *BRAF* ανιχνεύονται μέσω εξαγωγής και απομόνωσης του γενετικού υλικού και αλληλούχισης αυτού με τη μέθοδο Sanger ή με την ποσοτική PCR (qPCR- quantitative PCR) η οποία ανιχνεύει ταυτόχρονα αλλαγές του *MET*, ανασυνδυασμούς του *ROS1* (v-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1, avian) και άλλες γενετικές αλλαγές. (Barlesi et al., 2016; Gao et al., 2016)

Τα τελευταία χρόνια το NGS επιτρέπει τη μελέτη πολλών ταυτόχρονα γονιδίων, μαζί με την ανίχνευση του *BRAF*. (Leonetti et al., 2018) Στη διαγνωστική φαρέτρα των μεταλλάξεων *BRAF* προστίθενται σιγά σιγά η ανοσοϊστοχημεία (IHC- ImmunoHistoChemistry) με τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος VE1 και η υγρή βιοψία. (Capper et al., 2011) Η ανοσοϊστοχημεία με το αντίσωμα VE1 θεωρείται έγκυρη μέθοδος για τον έλεγχο της μετάλλαξης V600E του γονιδίου *BRAF*, κυρίως σε γυναίκες, μη-καπνίστριες με μικροθηλώδες αδеноκαρκίνωμα. (Leonetti et al., 2018)

Η ανάλυση του κυκλοφορούντος καρκινικού DNA (ctDNA- circulating tumour DNA) παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία για την ανίχνευση μεταλλάξεων *BRAF* σε σύγκριση με την ανάλυση του DNA που εξάγεται από τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTC- Circulating Tumor Cells). (Guibert et al., 2016)

2.4 Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF* είναι αμοιβαίως αποκλειόμενες με μεταλλάξεις του *EGFR*, *KRAS*, ανασυνδυασμό *ALK* ή *ROSI* και ανιχνεύονται συχνότερα σε αδеноκαρκινώματα πνεύμονα. (Planchard et al., 2018) Σημαντικό ποσοστό μεταλλάξεων του γονιδίου *BRAF* έχει ανιχνευθεί και σε μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα (large cell lung carcinomas) και σε μη περαιτέρω τυποποιούμενα NSCLC (NSCLC-NOS- Not Otherwise Specified). (Leonetti et al., 2018) Η μετάλλαξη V600E, που ανευρίσκεται πιο συχνά σε μη βλεννώδη αδеноκαρκινώματα πνεύμονα, συσχετίζεται με το γυναικείο φύλο, μη-καπνιστές, μικροθηλώδη πρότυπο ανάπτυξης και ισχυρή έκφραση του TTF-1 (Thyroid transcription factor-1). Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF* έχουν συσχετιστεί με το ανδρικό φύλο, κάπνισμα και με διάφορες ιστολογίες, συμπεριλαμβανομένου του βλεννώδους αδеноκαρκινώματος. (Marchetti et al., 2011; Yousem, Nikiforova and Nikiforov, 2008)

2.5 Προγνωστική σημασία

Ασθενείς με μεταλλάξεις V600E του *BRAF* έχουν συσχετισθεί με μικρότερο ποσοστό επιβίωσης ελευθέρως νόσου (DFS- Disease Free Survival) και συνολικής επιβίωσης (OS- Overall Survival) (Marchetti et al., 2011; Warth et al., 2013) Χωρίς την χορήγηση στοχευμένης θεραπείας σε μεταστατικό NSCLC, οι ασθενείς με μεταλλάξεις V600E εμφανίζουν δυσμενέστερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς που φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF*. (Kron et al., 2017)

2.6 Αναστολή

Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες οδηγίες της ESMO, για τη μετάλλαξη V600E η θεραπεία πρώτης γραμμής είναι το dabrafenib, ένας αναστολέας BRAF, σε συνδυασμό με trametinib, αναστολέας MEK (σύσταση III,A). Σε περίπτωση τοπικής προόδου της νόσου, συνιστάται τοπική θεραπεία, ενώ σε συστηματική πρόοδο νόσου, χορηγείται χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, αν έχει λάβει ήδη dabrafenib και trametinib. (Planchard et al., 2018) Λόγω της διαθεσιμότητας στοχευμένης θεραπείας για τη μετάλλαξη V600E του *BRAF*, σε πολλές χώρες της Ευρώπης συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας είναι απαραίτητος ο έλεγχος για πιθανή παρουσία της σε προχωρημένα στάδια NSCLC. (Planchard et al., 2018) Αντίθετα, για τους ασθενείς με NSCLC με μεταλλάξεις του *BRAF* διαφορετικές από το V600E, η θεραπεία ακόμα βρίσκεται σε πειραματικό στάδιο. (Leonetti et al., 2018)

2.7 Μηχανισμοί αντίστασης στη θεραπεία

Οι μηχανισμοί αντίστασης στην αναστολή του *BRAF* αφορούν τη σηματοδότηση μέσω του MAPK μονοπατιού που οδηγεί σε επανενεργοποίηση του ERK και μέσω εναλλακτικών μονοπατιών. (Leonetti et al., 2018)

Οι μηχανισμοί αντίστασης μέσω του μονοπατιού MAPK περιλαμβάνουν το εναλλακτικό μάτισμα (splicing) του *BRAF* και την ενίσχυση του γονιδίου *BRAF*, τα οποία αυξάνουν τα επίπεδα των ομοδιμερών του V600E BRAF, καθώς και άλλα γονίδια στο μονοπάτι MAPK, όπως μεταλλάξεις του *NRAS/KRAS* ή του *MEK1/2* που οδηγούν σε ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK ανεξάρτητα από το BRAF. (Johnson et al., 2015)

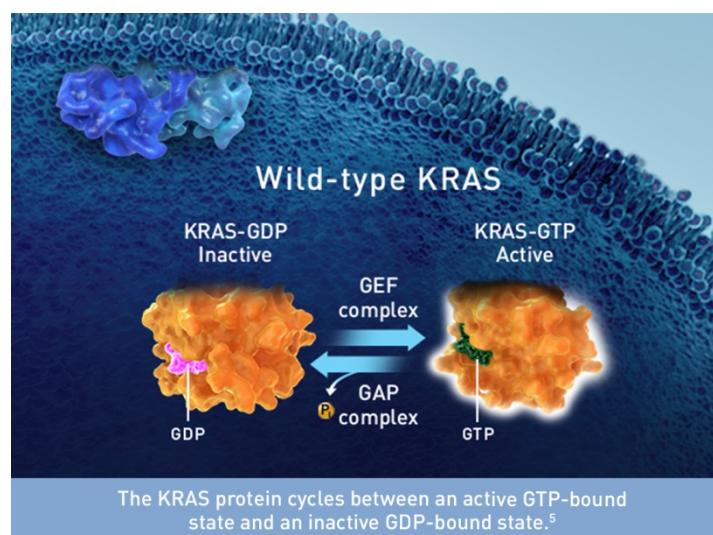
Οι μηχανισμοί αντίστασης που είναι ανεξάρτητοι του μονοπατιού MAPK περιλαμβάνουν ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του *AKT* και απώλεια της λειτουργίας του *PTEN* (Phosphatase and TENSin homolog). (Leonetti et al., 2018)

Παρά το συνδυασμό αναστολέων BRAF και MEK, τελικά αναπτύσσεται αντοχή και η έρευνα πλέον έχει στραφεί στην ανάπτυξη μορίων που είναι αποτελεσματικά έναντι των μονομερών και των ομοδιμερών μεταλλαγμένων πρωτεϊνών του *BRAF*, και αναστολέων RAF (paradox-breaking RAF inhibitors), που αναστέλλουν εκλεκτικά μόνο τα κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαξη στο γονίδιο *BRAF* χωρίς να δρουν στα φυσιολογικά κύτταρα. (Zhang et al., 2015) Αναπτύσσονται, επίσης, εκλεκτικοί αναστολείς του ERK1/2. (Leonetti et al., 2018)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο - ΓΟΝΙΔΙΟ *KRAS*

3.1 Δομή και λειτουργία

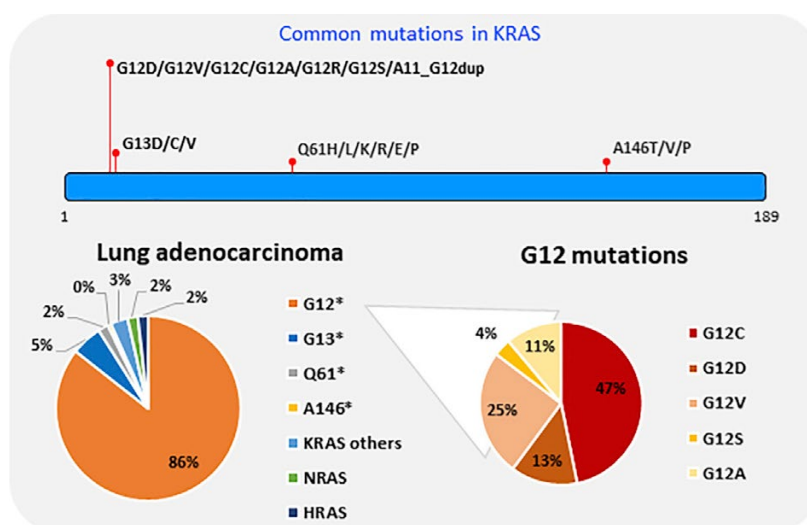
Η οικογένεια των τριών γονιδίων *RAS* κωδικοποιούν τέσσερις ισομορφές πρωτεϊνών, τις HRAS, KRAS K4A, KRAS K4B και NRAS, οι οποίες στο καρβοξυτελικό άκρο τους συνδέονται μέσω ομοιοπολικών δεσμών με ουρές λιπιδίων που αποτελούνται από farnesyl, palmitoyl ή geranylgeranyl ομάδες. Μέσω αυτών των λιπιδίων οι πρωτεΐνες RAS αγκυροβολούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες RAS παρουσιάζουν ενδογενή δραστηριότητα GTPάσης, δηλαδή συνδέονται και υδρολύουν νουκλεοτίδια γουανωσίνης. Πιο συγκεκριμένα, στην ανενεργό φάση οι πρωτεΐνες RAS συνδέονται με GDP, όταν το κύτταρο είναι σε ήρεμη κατάσταση. Όταν το κύτταρο δεχτεί σήματα από το εξωτερικό περιβάλλον, δηλαδή όταν ένας συνδέτης συνδεθεί με υποδοχέα τυροσινικής κινάσης (RTK- Receptor Tyrosine Kinase) για παράδειγμα όταν ο EGF συνδέτης συνδεθεί με τον EGFR του κυττάρου, τότε ο RTK διμερίζεται και ενεργοποιείται η ενδοκυττάρια τυροσινική κινάση. Αυτό οδηγεί στη σύνδεση της πρωτεΐνης GRB2 με τον RTK μέσω του τομέα SH2 (Sequence Homology 2 domain) και στη στρατολόγηση του παράγοντα GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) SOS1 και 2. Όταν ο παράγοντας SOS συνδεθεί με την πρωτεΐνη RAS, προκαλείται αλλαγή στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και αντικατάσταση του GDP από το GTP, ενεργοποιώντας την πρωτεΐνη RAS. Η ενεργός μορφή της RAS ενεργοποιεί την PI3K, την κινάση σερίνης-θρεονίνης raf-1 και το μονοπάτι MAPK για τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και την απόπτωση του κυττάρου. (Martin, Leighl, Tsao and Shepherd, 2013; Weinberg, 2013, pp.166-167) Όταν πια το σήμα διακοπεί, ενεργοποιείται από πρωτεΐνες GAP (GTPase-Activating Proteins) η ενδογενής δραστηριότητα GTPάσης που διαθέτει η πρωτεΐνη RAS μέσω προσθήκης αργινίνης. Έτσι, γίνεται υδρόλυση του συνδεδεμένου GTP σε GDP και η πρωτεΐνη RAS επανέρχεται στην ανενεργό μορφή της. (Weinberg, 2013 p.166-167)



Εικόνα 10 Ενεργός και ανενεργός μορφή KRAS (Targeting KRAS-G12C to Block Oncogenic Signaling, Amgen, 2021)

3.2 Μεταλλάξεις

Στο NSCLC οι πιο συχνές μεταλλάξεις γονιδίων *RAS* αφορούν την πρωτεΐνη *KRAS*, όπου παρατηρείται απλή υποκατάσταση ενός αμινοξέος πιο συχνά στο κωδικόνιο 12 και λιγότερο συχνά στα κωδικόνια 13 και 61. (Martin, Leighl, Tsao and Shepherd, 2013) Οι μη καπνιστές είναι πιο πιθανό να έχουν μεταλλάξεις μετάβασης, δηλαδή αντικατάσταση πουρίνης από πουρίνη ή πυριμιδίνης από πυριμιδίνη, ενώ οι καπνιστές και οι πρώην καπνιστές πιο συχνά έχουν μεταλλάξεις μετατροπής, δηλαδή αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίστροφο. (Martin, Leighl, Tsao and Shepherd, 2013) Η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *KRAS* γενικά αποκλείει την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο του *EGFR* και ανασυνδυασμούς *EML4* (Echinoderm Microtubule associated protein-Like 4)-*ALK*. (Burke et al., 2016, pp.1330-1331) Σύμφωνα με πρόσφατες μοριακές αναλύσεις οι ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS* και NSCLC δεν αποτελούν ομοιογενή υποομάδα και ταυτόχρονα μπορούν να επισυμβαίνουν και άλλες μεταλλάξεις με στατιστική σημαντικότητα, όπως ενίσχυση ή μεταλλάξεις του *ERBB2* ταυτόχρονα με αντικατάσταση της γλυκίνης από κυστεΐνη στο κωδικόνιο 12 (G12C) στο *KRAS*, μεταλλάξεις στο *PDGFRA* (Platelet Derived Growth Factor Alpha gene) ταυτόχρονα με αντικατάσταση της γλυκίνης από ασπαρτικό οξύ στο κωδικόνιο 12 (G12D) στο *KRAS*, και μεταλλάξεις στο *PTEN* ταυτόχρονα με αντικατάσταση της γλυκίνης από βαλίνη στο κωδικόνιο 12 (G12V) ή αντικατάσταση της γλυκίνης από οποιοδήποτε αμινοξύ στο κωδικόνιο 13 (G13X) του *KRAS* σύμφωνα με μια μελέτη των Scheffler και των συνεργατών του. (Scheffler et al., 2019) Τα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα με μεταλλάξεις στο γονίδιο *KRAS* έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τρεις υποομάδες σύμφωνα με ανάλυση transcriptomics. Στην πρώτη υποομάδα παρατηρούνται ταυτόχρονες αλλαγές στο γονίδιο *TP53*, στη δεύτερη μεταλλάξεις στο *STK11* (Serine/Threonine Kinase 11), *KEAP 1* (Kelch-like ECH-Associated Protein 1) και *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated), ενώ στην τρίτη υποομάδα απενεργοποιούνται και τα δύο αλληλίου των γονιδίων *CDKN2A/CDKN2B* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A/2B). Και στις τρεις υποομάδες δε διέφεραν στατιστικά οι μεταλλάξεις *KRAS*, εκτός από την τελευταία υποομάδα όπου παρατηρείται μεγάλο ποσοστό G12D στο *KRAS*. (Skoulidis and Heymach, 2019)



Εικόνα 11 Μεταλλάξεις γονιδίου *KRAS* (Salgia et al., 2021)

3.3 Μέθοδοι ανίχνευσης

Η ανίχνευση των μεταλλάξεων *KRAS* γίνεται μέσω PCR ή NGS στα πλαίσια ευρείας ανάλυσης του μοριακού προφίλ του όγκου. (Roy-Chowdhuri, 2021)

3.4 Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Το γονίδιο του *KRAS* είναι πολύ καλά μελετημένο και μεταλλάξεις αυτού παρατηρούνται στο 20-30% των αδενοκαρκινωμάτων πνεύμονα και στο 5% των καρκινωμάτων εκ πλακωδών κυττάρων πνεύμονα. Μάλιστα τα αδενοκαρκινώματα με συμπαγές πρότυπο ανάπτυξης, με έκφραση TTF-1 και τα βλεννώδη αδενοκαρκινώματα πνεύμονα χωρίς έκφραση TTF-1 έχουν συσχετισθεί με την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *KRAS*. Σύμφωνα με μια κοορτή 4064 ασθενών με μεταστατικό NSCLC που μελετήθηκε από τον Singal και τους συνεργάτες του, το 29% των ασθενών έφεραν μεταλλάξεις στο *KRAS* και το 12% έφερε την G12C. (Singal et al., 2019; Skoulidis and Heymach, 2019)

3.5 Αναστολή

Παρά τη μεγάλη συχνότητα και την ευκολία στην ταυτοποίηση των μεταλλάξεων του γονιδίου *KRAS*, μέχρι στιγμής δεν έχουν εγκριθεί στοχευμένες θεραπείες κατά αυτών. (Pardoll, 2012) Έχουν, όμως, αναπτυχθεί αναστολείς G12C, όπως οι sotorasib και adagrasib, που συνδέονται μη αναστρέψιμα με μια αύλακα στην επιφάνεια της πρωτεΐνης *KRAS* με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη κλειδώνοντας έτσι την πρωτεΐνη στην ανενεργή μορφή της συνδεδεμένη με GDP και αναστέλλοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι. (Thai et al., 2021) Τα πρώτα αποτελέσματα των κλινικών μελετών με αυτούς τους αναστολείς έχουν δείξει ότι παρουσιάζουν δράση στο 30-50% των εγγεγραμμένων ασθενών. (Thai et al., 2021) Σε εξέλιξη είναι κλινικές μελέτες με συνδυασμούς αναστολέων SHP2 (Src Homology region 2 domain Phosphatase), EGFR TKIs και ανοσοθεραπείας. (Thai et al., 2021) Σε μελέτη φάσης II υπήρχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα με τη χορήγηση sotorasib σε ασθενείς με τη μετάλλαξη G12C του *KRAS*. (Skoulidis et al., 2021)

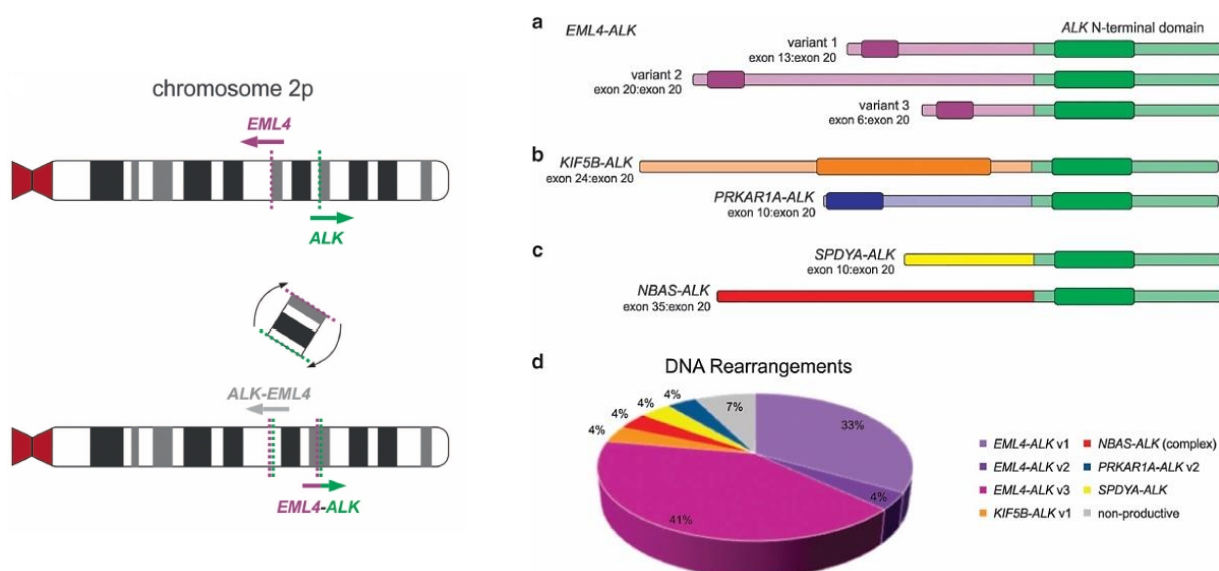
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο - ΓΟΝΙΔΙΟ *ALK*

4.1 Δομή και λειτουργία

Το γονίδιο *ALK* εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2p και κωδικοποιεί έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης ο οποίος μετά τη σύνδεση με το συνδέτη του ομοδιμερίζεται και οδηγεί στην ανάπτυξη του κυττάρου, ιδίως στο νευρικό σύστημα. Φυσιολογικά δεν εκφράζεται στον πνεύμονα. (Rosenbaum et al., 2018)

4.2 Ανασυνδυασμοί *ALK*

Οι ανασυνδυασμοί του γονιδίου *ALK* απαντώνται στο 3-5% των ασθενών με NSCLC και οδηγούν στην παραγωγή πρωτεϊνών με σταθερά ενεργό κινάση που προάγει την ογκογένεση. (Shaw et al., 2009; Soda et al., 2007; Rikova et al., 2007; Roy-Chowdhuri, 2021) Πιο συχνά γίνεται σύντηξη του γονιδίου *ALK* με το γονίδιο *EML4* μέσω αντιστροφής τμήματος του 2p χρωμοσώματος με αποτέλεσμα η 5' περιοχή του γονιδίου *EML4* να συντήκεται με την 3' περιοχή του γονιδίου *ALK*. Ο υποκινητής του *EML4* οδηγεί στην έκφραση του γονιδίου *EML4-ALK* στον πνεύμονα. Με τη σύντηξη αυτή, ταυτόχρονα, η 5' περιοχή του γονιδίου *ALK* συνδέεται με την 3' περιοχή του γονιδίου *EML4*. Καθώς, όμως, διατηρείται ο υποκινητής του *ALK*, δεν εκφράζεται η 3' περιοχή του *EML4*. (Soda et al., 2007; Rikova et al., 2007; Rosenbaum et al., 2018) Πιο σπάνιοι ανασυνδυασμοί γίνονται με τα γονίδια *TFG* (TRK-Tyrosine Receptor Kinase Fused Gene), *KIF5B* (Kinesin Family member 5 B), *PRKAR1A* (Protein Kinase CAMP-Dependent Type I Regulatory Subunit Alpha), *SPDYA* (Speedy/RINGO Cell Cycle Regulator Family Member A) και *NBAS* (NeuroBlastoma Amplified Sequence). (Choi et al., 2010; Rosenbaum et al., 2018)



Εικόνα 12 Ανασυνδυασμοί γονιδίου *ALK* (Rosenbaum et al., 2018)

Έχουν περιγραφεί πάνω από 15 διαφορετικές παραλλαγές *EML4-ALK*. Η πιο συχνή παραλλαγή είναι η παραλλαγή 1 (variant 1) στην οποία γίνεται ανασυνδυασμός του εξωνίου 13 του *EML4* με το εξώνιο 20 του *ALK* (E13;A20) και οι παραλλαγές 3a/b (v3a/b) στις οποίες το εξώνιο 6a/b του *EML4* ανασυνδυάζεται με το εξώνιο 20 του *ALK* (E6a/b;A20). (Lin et al., 2018; Soda et al., 2007) Σε όλες τις παραλλαγές η πρωτεΐνη που προκύπτει περιλαμβάνει την τυροσινική κινάση του *ALK* και την αμινοτελική ελικοειδή περιοχή του *EML4* που είναι απαραίτητη για το διμερισμό και την ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης του *ALK*. (Soda et al., 2007) Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη *ALK* ενεργοποιεί συνεχώς το σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK. (Janku et al., 2011) Έχει βρεθεί in vitro ότι οι διαφορετικές παραλλαγές παρουσιάζουν διαφορετική σταθερότητα της πρωτεΐνης η οποία μεταφράζεται ως διαφορετική ευαισθησία στο crizotinib, χωρίς να έχει επιβεβαιωθεί από κλινικές μελέτες. (Bayliss et al., 2016; Heuckmann et al., 2012; Lei et al., 2016; Lin et al., 2018) Παρ'όλα αυτά, ακόμα δεν έχει μελετηθεί η πιθανή επίδραση των παραλλαγών των ανασυνδυασμών του *ALK* στην αποτελεσματικότητα των τρίτης γενιάς *ALK-TKIs* ή στην ανάπτυξη μηχανισμών αντίστασης. (Lin et al., 2018)

4.3 Μέθοδοι ανίχνευσης

Οι ανασυνδυασμοί *ALK* εντοπίζονται μέσω της μεθόδου FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται ανοσοϊστοχημεία με τα αντισώματα *ALK 5A4* και *D5F3*. Πλέον, με το NGS γίνεται μελέτη πολλών ταυτόχρονα γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης του ανασυνδυασμού *ALK*. (Roy-Chowdhuri, 2021)

4.4 Παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Ο ανασυνδυασμός *EML4-ALK* έχει συσχετισθεί με νεότερη ηλικία (διάμεση ηλικία τα 52 έτη), το γυναικείο φύλο, Ασιατική καταγωγή, απόν ή ελαφρύ ιστορικό καπνίσματος και με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. (Janku et al., 2011; Rosenbaum et al., 2018) Έχουν περιγραφεί σε αδενοκαρκινώματα πνεύμονα με ανασυνδυασμό *ALK* κυτταρική μορφολογία δίκην σφραγιστήρα δακτυλίου (signet-ring), παραγωγή βλέννης, ηθμοειδές πρότυπο ανάπτυξης και ψαμμώδη σωματίδια, χωρίς όμως να είναι σταθερά παρόντα σε κάθε ανασυνδυασμό *ALK*. (Pareja et al., 2014) Επίσης, το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι η πιο συχνή εστία μετάστασης σε ασθενείς με ανασυνδυασμό *ALK*, με συχνότητα 25-40 %. (Drizou, Kotteas and Syrigos, 2017; Rangachari et al., 2015; Toyokawa, Seto, Takenoyama and Ichinose, 2015)

4.5 Αναστολή

Σύμφωνα με τις ανανεωμένες οδηγίες του ESMO, στην πρώτη γραμμή θεραπείας ανήκει ο πρώτης γενιάς αναστολέας ALK crizotinib (σύσταση I,B) και οι δεύτερης γενιάς αναστολείς ALK ceritinib (σύσταση I,B), alectinib, brigatinib και ensartinib (σύσταση I,A), οι οποίοι παρουσιάζουν και ενδοκράνια δραστηριότητα. Σε περίπτωση τοπικής πρόοδου της νόσου, συνιστάται τοπική θεραπεία και συνέχιση της στοχευμένης θεραπείας. Σε συστηματική πρόοδο νόσου, συνιστάται επανάληψη βιοψίας και αν έχει χορηγηθεί crizotinib ως πρώτη γραμμή, χορηγείται alectinib ή ceritinib ή brigatinib, ενώ αν έχει δοθεί ALK TKI διαφορετικός από crizotinib ως πρώτη γραμμή θεραπείας, τότε χορηγείται lorlatinib. Αν αποτύχει και η δεύτερης γραμμής θεραπεία στη συστηματική πρόοδο νόσου, τότε χορηγείται χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, όπως carboplatin με placlitaxel, bevacizumab και atezolizumab. (Planchard et al., 2018) Ο ανασυνδυασμός *PRKARIA-ALK* παρουσιάζει λιγότερη ευαισθησία στους ALK-TKIs πρώτης, δεύτερης και τρίτης γενιάς. (Childress et al., 2018)

4.6 Μηχανισμοί αντίστασης στη θεραπεία

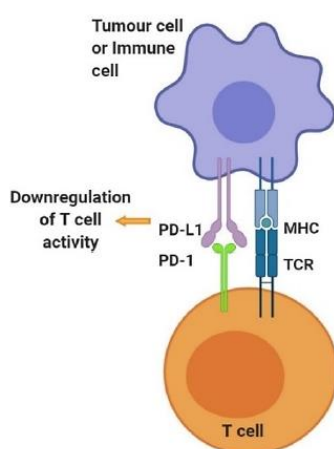
Το 20-40% των ασθενών που εμφανίζουν πρόοδο νόσου παρά τη θεραπεία με crizotinib, παρουσιάζουν δευτερογενείς μεταλλάξεις, οι πιο συχνές εκ των οποίων είναι η αντικατάσταση της λευκίνης από μεθειονίνη στο κωδικόνιο 1196 (L1196M) και η αντικατάσταση γλυκίνης από αλανίνη στο κωδικόνιο 1269 (G1269A) με αποτέλεσμα τη μειωμένη συγγένεια σύνδεσης του TKI με το ATP. Μάλιστα για κάθε διαφορετικό ALK-TKI έχει παρατηρηθεί διαφορετικός μηχανισμός αντίστασης λόγω της διαφορετικής δομής τους. Το 15% εμφανίζει ενίσχυση του γονιδίου *ALK* και το 30% εμφανίζει μεταλλάξεις διαφορετικών γονιδίων, όπως *EGFR*, *KRAS*, *c-KIT*. Παρά την πρόοδο που έχει σημειωθεί στην κατανόηση των μηχανισμών αντίστασης στους ALK-TKIs, το πεδίο δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. (Ziogas et al., 2018)

Σύμφωνα με τους Lin και τους συνεργάτες της, οι ασθενείς με *EML4-ALK* v3 εμφανίζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την παρουσία μεταλλάξεων *ALK*, ιδιαίτερα της αντικατάστασης γλυκίνης από αργινίνη στη θέση 1202 (G1202R) ως μηχανισμός αντίστασης στη θεραπεία με πρώτης και δεύτερης γενιάς ALK TKI. Η μετάλλαξη, όμως, αυτή παρουσιάζει ευαισθησία στο lorlatinib. Λόγω αυτής της σημαντικής συσχέτισης μεταξύ *ALK* v3 και της μετάλλαξης, καθώς και λόγω του γεγονότος ότι οι ασθενείς με *ALK* v3 είχαν μεγαλύτερο PFS σε σχέση με την *ALK* v1 μετά την χορήγηση lorlatinib, γίνεται κατανοητό ότι η διερεύνηση των παραλλαγών του *ALK* είναι πιθανό να έχει εφαρμογή στη θεραπεία του ασθενούς. (Lin et al., 2018)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο - PD-L1

5.1 Δομή και λειτουργία

Το PD-L1 ανήκει στην οικογένεια των B7 πρωτεϊνών και είναι ένας από τους ανασταλτικούς παράγοντες, που ρυθμίζει τη δράση των ανοσολογικών απαντήσεων στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Εκφράζεται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων ή των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που διηθούν τον όγκο και συνδέεται με το PD-1 που εκφράζεται στα ενεργοποιημένα εκτελεστικά T λεμφοκύτταρα. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση της SHP2 και την επακόλουθη απενεργοποίηση της PI3K και του καταρράκτη αυτής. Με την απενεργοποίηση του καταρράκτη αυτού εμποδίζεται η παραγωγή ή η έκκριση κυτταροτοξικών μορίων. (Alard et al., 2020; Chemnitz et al., 2004)



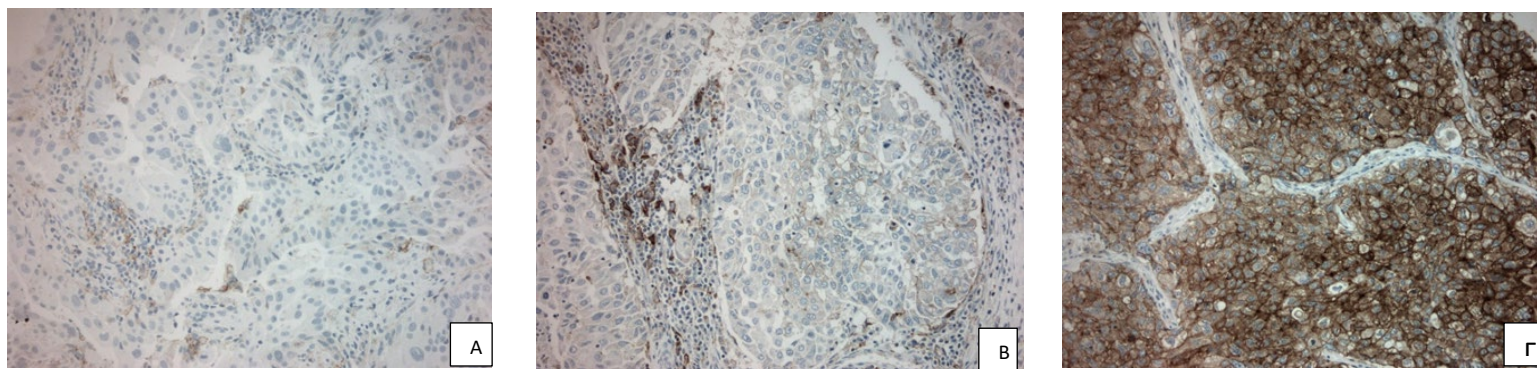
Εικόνα 13 Μηχανισμός δράσης PD-1/PD-L1 (Alard et al., 2020)

5.2 Μέθοδος ανίχνευσης

Για την ανίχνευση της έκφρασης του PD-L1 στη μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος που διηθούν τον όγκο χρησιμοποιείται η ανοσοϊστοχημεία και εφαρμόζεται κατά τη διάγνωση προχωρημένου σταδίου NSCLC. Μετά τη χρώση για το PD-L1, υπολογίζεται το TPS (Tumour Proportional Score), που ορίζεται ως:

$$TPS(\%) = \frac{\text{Αριθμός καρκινικών κυττάρων με έκφραση PD - L1}}{\text{Συνολικός αριθμός ζώντων καρκινικών κυττάρων}} \times 100\%$$

Η έκφραση του PD-L1 στα κύτταρα παρουσιάζει ετερογένεια μέσα στον όγκο αλλά και μεταξύ των όγκων. (Doroshov et al., 2021, Thai et al., 2021)



Εικόνα 14 PD-L1 TPS A: < 1%, B: 1-49% , Γ: ≥ 50% (Αρχείο Π.Φούκα)

5.3 Προγνωστική σημασία

Αντιφατικά είναι τα αποτελέσματα των μελετών που ερευνούν την προγνωστική σημασία της έκφρασης του PD-L1. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση στην οποία συμπεριλήφθηκαν 50 μελέτες με 11383 ασθενείς ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ έκφρασης PD-L1 και βραχύτερου OS σε ασθενείς με NSCLC. (Li et al., 2019)

5.4 Αναστολή

Το PD-L1 αποτελεί τον πιο ανεπτυγμένο και έγκυρο προβλεπτικό βιοδείκτη για την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία. Παρ' όλα αυτά, είναι λιγότερο σαφές αν το PD-L1 είναι έγκυρος βιοδείκτης σε περιπτώσεις συνδυασμού ανοσοθεραπείας με χημειοθεραπεία ή με δεύτερη ανοσοθεραπεία. (Doroshov et al., 2021) Ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία παρατηρείται, όμως, και σε ασθενείς χωρίς έκφραση του PD-L1, πιθανόν λόγω κλινικών παραγόντων, που αφορούν στον ξενιστή και στον ίδιο τον όγκο. (Thai et al., 2021)

Σύμφωνα με τις ανανεωμένες οδηγίες του ESMO, ασθενείς με μη πλακώδες NSCLC, PD-L1 TPS ≥ 50% και PS (Performance Status) 0-1 λαμβάνουν ανοσοθεραπεία με pembrolizumab, ένα αντίσωμα έναντι του PD-1 (σύσταση I,A) ή atezolizumab, ένα αντίσωμα έναντι του PD-L1 (σύσταση I,B).

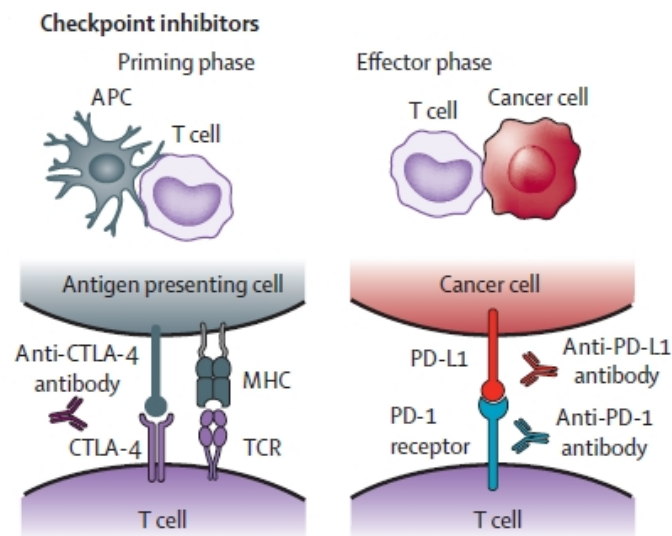
Ανεξαρτήτως έκφρασης PD-L1 και με PS 0-2 χορηγούνται nivolumab, ένα αντίσωμα έναντι του PD-1, ή ipilimumab, ένα αντίσωμα έναντι του CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4), (σύσταση I,A για PD-L1 θετικούς, IIA για PD-L1 αρνητικούς όγκους). Εναλλακτικά, χορηγούνται pembrolizumab με platinum ή pemetrexed κι έπειτα pembrolizumab ή pemetrexed. Άλλο σχήμα θεραπείας είναι δυνατό να περιλαμβάνει χορήγηση atezolizumab με carbo-platinum ή nab-Paclitaxel κι έπειτα atezolizumab. Μια άλλη επιλογή είναι atezolizumab με bevacizumab, ένα αντίσωμα κατά του VEGF, και carboplatin ή paclitaxel, ακολουθούμενα από atezolizumab ή bevacizumab. Εναλλακτικό

θεραπευτικό σχήμα είναι nivolumab ή ipilimumab και platinum ή paclitaxel, ακολουθούμενο από nivolumab ή ipilimumab.

Σε ασθενείς με καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων πνεύμονα, PD-L1 TPS $\geq$ 50% και PS 0-1 χορηγούμε pembrolizumab (σύσταση I,A) ή atezolizumab (σύσταση I,B), όπως στο μη πλακώδες NSCLC.

Ανεξαρτήτως έκφρασης PD-L1 και με PS 0-2 χορηγούνται nivolumab ή ipilimumab (σύσταση I,A για PD-L1 θετικούς, IIA για PD-L1 αρνητικούς όγκους), όπως στο μη πλακώδες NSCLC. Εναλλακτικά, χορηγούνται pembrolizumab με carboplatin ή paclitaxel κι έπειτα pembrolizumab. Μια άλλη επιλογή είναι nivolumab και ipilimumab και χημειοθεραπεία.

Ανεξαρτήτως έκφρασης PD-L1 και με PS 3-4 δίνουμε στους ασθενείς την καλύτερη υποστηρικτική φροντίδα σε όλα τα NSCLC. (Planchard et al., 2018)



Εικόνα 15 Μηχανισμοί ανοσοθεραπείας (Thai et al., 2021)

ΜΕΛΕΤΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο – ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Πληθυσμός μελέτης

Πρόκειται για μια αναδρομική μελέτη παρατήρησης. Από το αρχείο του Β' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ, συγκεντρώθηκαν 833 ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο πνεύμονα και είχε ζητηθεί από τους θεράποντες ιατρούς μοριακή ανάλυση από τον Ιανουάριο του 2010 έως το Σεπτέμβριο του 2021. Από αυτούς εξαιρέθηκαν ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα, ασθενείς χωρίς γνωστή ιστολογική ταξινόμηση και ασθενείς με μετάσταση στον πνεύμονα από αλλαχού εντοπιζόμενο πρωτοπαθές καρκίνωμα. Έτσι, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν τελικά 718 ασθενείς με NSCLC και αποτελέσματα των μοριακών αναλύσεων για ανίχνευση μεταλλάξεων στα γονίδια *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, πιθανό ανασυνδυασμό του γονιδίου *ALK*, και προϋπάρχοντα έλεγχο της έκφρασης του PD-L1. Από τις εκθέσεις ιστολογικής εξέτασης και τα παραπεμπτικά των μοριακών αναλύσεων συγκεντρώθηκαν κλινικοπαθολογοανατομικές πληροφορίες σχετικά με την ηλικία διάγνωσης, το φύλο, το κάπνισμα, τον τύπο του δείγματος (βιοψία, χειρουργικό παρασκεύασμα ή κυτταρολογική εξέταση πλευριτικού υγρού), τον ιστολογικό υπότυπο του NSCLC (αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες, αδеноπλακώδες, μεγαλοκυτταρικό, NSCLC-NOS, σαρκωματοειδές, αδιαφοροποίητο), το βαθμό διαφοροποίησης (υψηλός, μέτριος, χαμηλός), παθολογοανατομική σταδιοποίηση με βάση την 8^η έκδοση του AJCC (American Joint Committee on Cancer) και πιθανή παρουσία μετάστασης. Για τους ασθενείς με ιστολογικές εκθέσεις που δεν αναφερόταν περαιτέρω ταξινόμηση του NSCLC, θεωρήθηκε ότι ανήκουν στο NSCLC-NOS. Με βάση την προηγούμενη αλλά και την τρέχουσα έκδοση της WHO (2015 και 2021) για την ταξινόμηση των όγκων πνεύμονα το βρογχιοκυψελιδικό καρκίνωμα αναφέρεται ως αδενοκαρκίνωμα. Έτσι, ασθενείς που είχαν διαγνωσθεί με βρογχιοκυψελιδικό καρκίνωμα έχουν ταξινομηθεί στη μελέτη ως ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα.

6.2 Μέθοδοι

Τα περισσότερα δείγματα (665) προέρχονται από ιστικά δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε κύβους παραφίνης (FFPE- Formalin - Fixed and Paraffin-Embedded). Τα υπόλοιπα (53) προέρχονται από κύβους παραφίνης, στους οποίους εγκλείστηκε φυγοκεντρηθέν δείγμα προοριζόμενο για κυτταρολογική εξέταση βρογχικών εκκριμάτων ή πλευριτικού υγρού (cell block). Οι κύβοι παραφίνης προέρχονται από το αρχείο του Β' Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής Ε.Κ.Π.Α. ή προέρχονται από άλλα Εργαστήρια και απεστάλησαν από τους θεράποντες ιατρούς στο Εργαστήριο προς διενέργεια μοριακών εξετάσεων.

Η μοριακή ανάλυση για *EGFR* μεταλλάξεις γίνεται με RT PCR (Real Time PCR) μέσω του EGFR RT52 Kit της EntroGen ή μέσω του theascreen EGFR RGQ PCR Kit της QIAGEN® που εντοπίζουν μεταλλάξεις στα εξόνια 18,19,20,21. (EGFR Mutation Analysis Kit For Real-Time PCR, 2017, theascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook, 2019)

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο *BRAF* χρησιμοποιείται από το Εργαστήριο το BRAF Pyro® Kit της QIAGEN® που κάνει ποσοτικές μετρήσεις μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 600 του εξωνίου 15 και στα κωδικόνια 464-469 του εξωνίου 11 του γονιδίου *BRAF* μέσω ανάλυσης από το PyroMark® Q24. (BRAF Pyro® Handbook, 2012) Εναλλακτικά, χρησιμοποιείται το BRAF RT50 Kit της EntroGen που εντοπίζει μεταλλάξεις στο εξόνιο 15. (KRAS/BRAF Mutation Analysis Kit For Real-Time PCR, 2014)

Για μεταλλάξεις του *KRAS* γίνεται PCR με χρήση του KRAS RT50 Kit της EntroGen που εντοπίζει μεταλλάξεις στα εξόνια 2,3,4 (KRAS/BRAF Mutation Analysis Kit For Real-Time PCR, version 3.3 pg 4)

Για την ανίχνευση των ανασυνδιασμών του γονιδίου *ALK* χρησιμοποιείται στο εργαστήριο το Vysis ALK Break Apart FISH Probe kit με δύο ιχνηθέτες που αναγνωρίζουν την περιοχή του γονιδίου ALK. Για την καταλληλότητα του δείγματος μετρώνται περισσότεροι από 100 πυρήνες από αντιπροσωπευτικές περιοχές του νεοπλάσματος και για να είναι θετικό για τον ανασυνδυασμό, θα πρέπει να εκτιμάται σε ποσοστό >15% των νεοπλασματικών κυττάρων.

Σε 5 ασθενείς πραγματοποιήθηκε NGS.

Για την εκτίμηση της έκφρασης του PD-L1 η ανοσοϊστοχημική χρώση γίνεται στο μηχάνημα αυτόματης ανοσοϊστοχημείας Autostainer Link 48 και χρησιμοποιείται το PD-L1 IHC 22C3 pharmDx Kit της DAKO. Στη χρώση περιλαμβάνεται θετικός και αρνητικός μάρτυρας (control side). Το δείγμα θεωρείται επαρκές για την ανάλυση όταν εντοπίζονται ≥ 100 νεοπλασματικά κύτταρα.

6.3 Στατιστικές μέθοδοι

Οι συσχετίσεις μεταξύ μεταλλάξεων *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, ανασυνδυασμού *ALK* και έκφρασης PD-L1 με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους έγιναν σε ένα μέρος του πληθυσμού μελέτης για κάθε μετάλλαξη ξεχωριστά, καθώς δεν είχαν ελεγχθεί όλοι οι ασθενείς για όλες τις μεταλλάξεις. Οι συσχετίσεις έγιναν με Pearson χ^2 ή με Fischer exact test (όπου ήταν κατάλληλο) μέσω του λογισμικού IBM® SPSS®. Η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 5%.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.1 Χαρακτηριστικά ασθενών

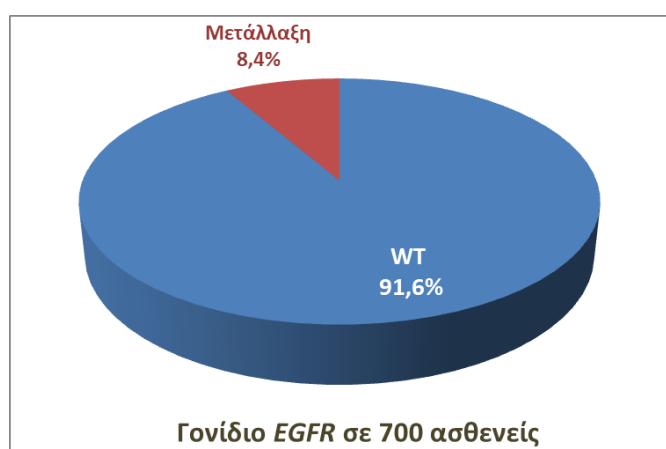
Από τους 718 συνολικά ασθενείς οι περισσότεροι ήταν άνδρες (71.2%), είχαν μέση ηλικία διάγνωσης τα 67 έτη (ελάχιστο 34 και μέγιστο 93) και ιστολογική διάγνωση αδενοκαρκινώματος (80.2%). Στον πληθυσμό της μελέτης υπήρχαν 576 περιπτώσεις με αδενοκαρκίνωμα, 81 με καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων, 13 με αδενοπλακώδες καρκίνωμα, 7 με μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα, 31 με NSCLC-NOS, 1 με σαρκωματοειδές καρκίνωμα και 6 με αδιαφοροποίητο καρκίνωμα. Επίσης, 1 ασθενής είχε πλακώδες καρκίνωμα και συνιστώσα σαρκωματοειδούς καρκινώματος, 1 ασθενής καρκίνωμα, τα χαρακτηριστικά του οποίου εγείρουν θέμα διαφορικής διάγνωσης μεταξύ πλακώδους και αδενοπλακώδους καρκινώματος και 1 ασθενής καρκίνωμα, τα χαρακτηριστικά του οποίου εγείρουν θέμα διαφορικής διάγνωσης μεταξύ αδενοκαρκινώματος και αδενοπλακώδους καρκινώματος. Μόνο για 162 ασθενείς υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για την κατανάλωση καπνού: 69.1% αυτών ήσαν καπνιστές, το 22.8% πρώην καπνιστές και οι υπόλοιποι μη καπνιστές. Όσον αφορά τους 673 ασθενείς, για τους οποίους ήταν διαθέσιμη η πληροφορία για τον τύπο του δείγματος στο οποίο έγινε η μοριακή ανάλυση, το 70.1% ήταν βιοψία, το 28.7% χειρουργικό παρασκεύασμα και το υπόλοιπο προερχόταν από κυτταρολογική εξέταση πλευριτικού υγρού. Για 370 ασθενείς ήταν γνωστός ο βαθμός διαφοροποίησης του NSCLC με το 59.2% αυτών να είναι χαμηλού βαθμού και το 34.9% μέτριου βαθμού διαφοροποίησης. 154 ασθενείς έφεραν μεταστάσεις, ενώ για τους υπόλοιπους δεν υπήρχε η αντίστοιχη πληροφορία. Τα δημογραφικά των ασθενών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα. (n=αριθμός ασθενών)

Χαρακτηριστικό		Αριθμός ασθενών	Ποσοστό	Μέση τιμή
Φύλο (n=718)	Ανδρας	518	72.1%	
	Γυναίκα	200	27.9%	
Ηλικία (έτη)				67
Κάπνισμα (n=162)	Μη καπνιστής	13	8.0%	
	Καπνιστής	112	69.1%	
	Πρώην καπνιστής	37	22.8%	
Τύπος δείγματος (n=673)	Βιοψία	472	70.1%	
	Χειρουργικό παρασκεύασμα	193	28.7%	
	Κυτταρολογική εξέταση πλευριτικού υγρού	8	1.2%	
Ιστολογικός υπότυπος (n=718)	Αδενοκαρκίνωμα	576	80.2%	
	Πλακώδες καρκίνωμα	82	11.4%	
	Αδenoπλακώδες καρκίνωμα	13	1.8%	
	Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα	9	1.3%	
	NSCLC-NOS	31	4.3%	
	Σαρκωματοειδές καρκίνωμα	1	0.1%	
	Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	6	0.8%	
Βαθμός διαφοροποίησης (n=370)	Υψηλός	22	5.9%	
	Μέτριος	129	34.9%	
	Χαμηλός	219	59.2%	

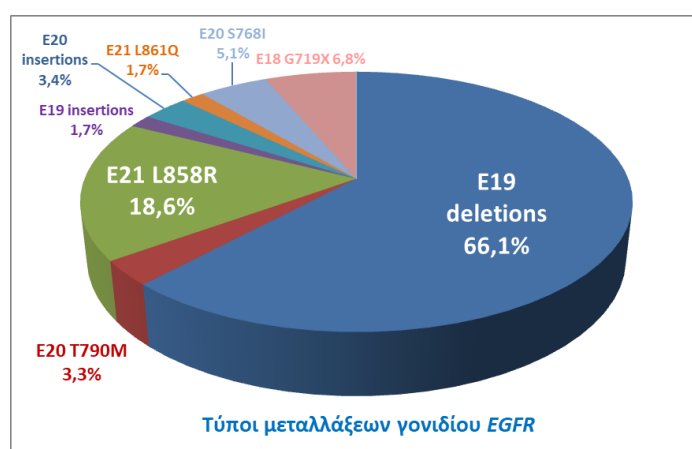
7.2 Συχνότητες γενετικών αλλαγών

126 ασθενείς (17.7% από το συνολικό δείγμα) έφεραν μεταλλάξεις.

59 από αυτές αφορούσαν στο *EGFR*, δηλαδή το 8.7% από τους 700 ασθενείς που είχαν ελεγχθεί για μετάλλαξη στο *EGFR*. Πάνω από τους μισούς ασθενείς με μετάλλαξη στο *EGFR* (38 από τους 59) έφεραν ελλείψεις στο εξόνιο 19. 10 ασθενείς από τους 700 έφεραν την E21 L858R (1.4%), μόνο 2 την E20 T790M (0.3%), 3 παρουσίαζαν E20 ins (0.4%), 1 ασθενής (0.1%) την E21 L861Q και 2 ασθενείς την E20 S768I (0.3%). Μεταλλάξεις στο εξόνιο 18 (E18 G719X) έφεραν 3 ασθενείς (0.4%). 1 ασθενής με E19 del έφερε ταυτόχρονα την E20 T790M και διαφορετικός ασθενής έφερε E19 del και E21 L861Q.

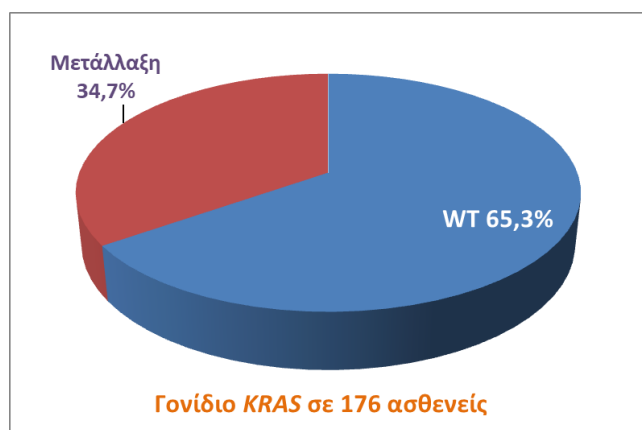


Εικόνα 16 Ποσοστό ασθενών με *EGFR* μετάλλαξη

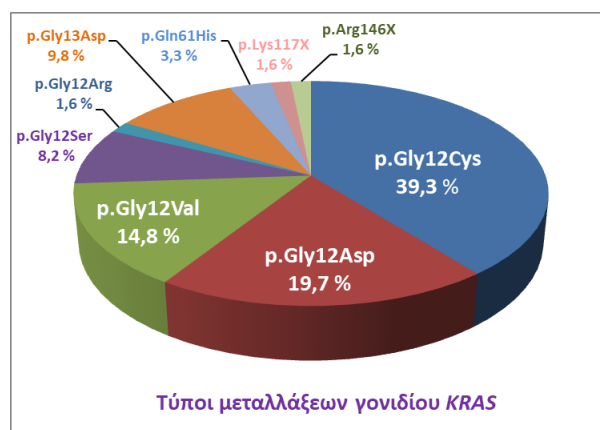


Εικόνα 17 Ποσοστά διαφορετικών τύπων *EGFR* μεταλλάξεων

61 από τις ανιχνευθείσες μεταλλάξεις στη μελέτη αφορούσαν στο *KRAS*, δηλαδή το 34.7% από τους 176 ελέγχους ασθενών για μετάλλαξη στο *KRAS*. Η πιο συχνή μετάλλαξη του *KRAS* ήταν η G12C (24 από τις 61 μεταλλάξεις, 13.6% από τους 176 ασθενείς), 12 ασθενείς έφεραν την G12D (6.8%) και 9 την G12V (5.1%). 5 ασθενείς από τους 176 (2.8%) παρουσίαζαν αντικατάσταση γλυκίνης στη θέση 12 από σερίνη (G12S), 1 ασθενής (0.6%) αντικατάσταση της γλυκίνης στη θέση 12 από αργινίνη (G12R), 6 ασθενείς (3.4%) αντικατάσταση της γλυκίνης στη θέση 13 από ασπαρτικό οξύ (G13D), 2 ασθενείς (2.2%) αντικατάσταση της γλουταμίνης από ιστιδίνη στη θέση 61 (Q61H).



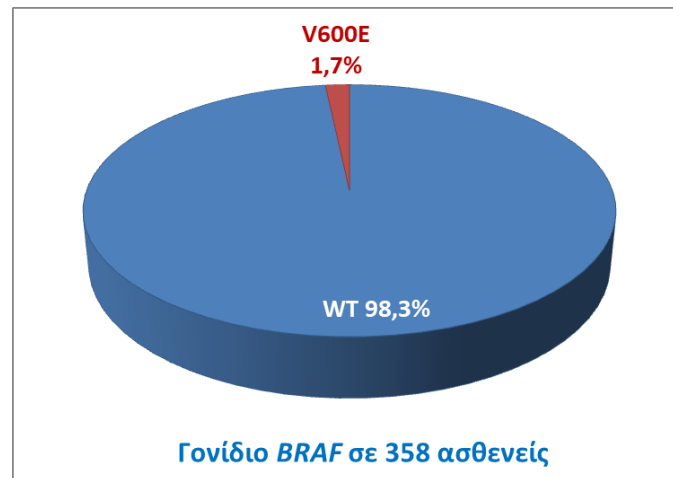
Εικόνα 18 Ποσοστό ασθενών με *KRAS* μεταλλάξεις



Εικόνα 19 Ποσοστά διαφορετικών τύπων *KRAS* μεταλλάξεων

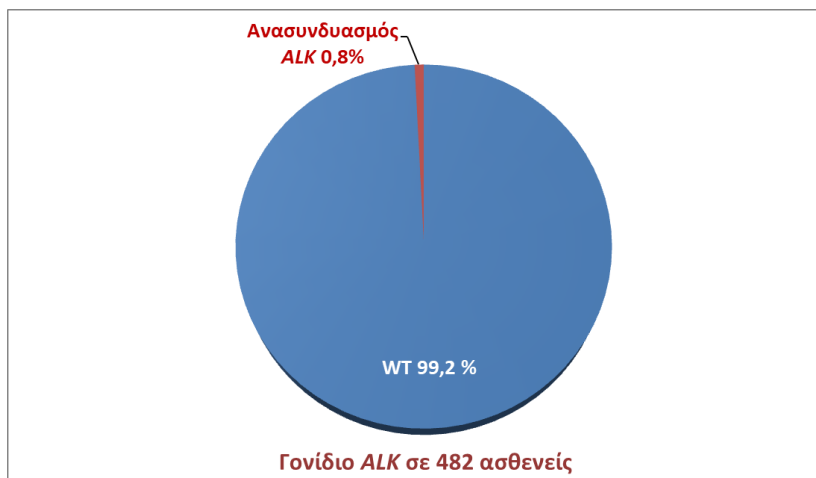
Οι μεταλλάξεις *EGFR* και *KRAS* ήταν αμοιβαίως αποκλειόμενες.

6 από τους 358 ασθενείς (1.7%) που ελέγχθηκαν για μεταλλάξεις στο *BRAF* έφεραν τη μετάλλαξη V600E στο εξόνιο 15.



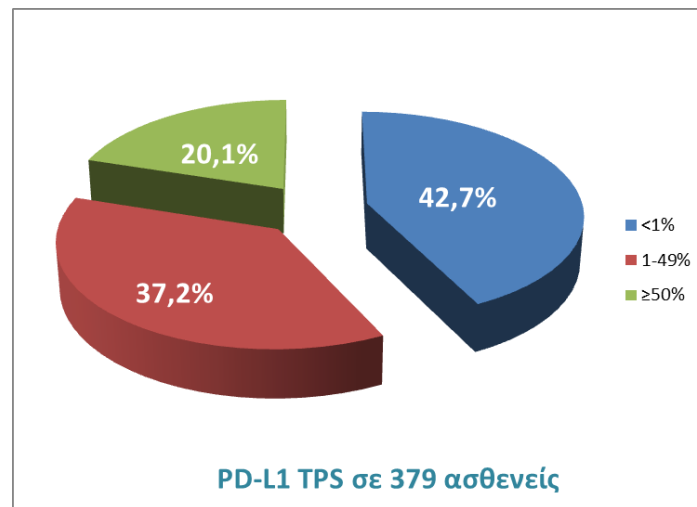
Εικόνα 20 Ποσοστό ασθενών με *BRAF* μεταλλάξεις

Μόνο 4 ασθενείς από τους 482 (0.8%) που ελέγχθηκαν έφεραν ανασυνδυασμό του *ALK*, ενώ αξίζει να σημειωθεί ότι 113 δείγματα ήταν ακατάλληλα για εκτίμηση, κυρίως λόγω ανεπάρκειας υλικού.



Εικόνα 21 Ποσοστό ασθενών με ανασυνδυασμό *ALK*

Από τους 379 ασθενείς που ελέγχθηκαν για την έκφραση του PD-L1, 162 (42.7%) παρουσίαζαν TPS <1%, 141 (37.2%) είχαν TPS 1-49% και 77 (20.3%) είχαν TPS ≥50%.



Εικόνα 22 Ποσοστά ασθενών με διαφορετικά PD-L1 TPS

7.3 Συσχετίσεις

Οι περισσότερες μεταλλάξεις ήταν παρούσες σε μη πλακώδη NSCLC χωρίς όμως να αναδειχθεί με στατιστική σημαντικότητα ($p=0.061$). Στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ παρουσίας μεταλλάξεων και γυναικείου φύλου (28.8% vs. 13.4%, $p<0.001$). Η ηλικία δεν παρουσίασε κάποια συσχέτιση με την παρουσία μεταλλάξεων.

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *EGFR* ήταν πιο συχνές στις γυναίκες (20% vs. 4%, $p<0.001$) και στους μη-καπνιστές (30.8% vs. 0.9% ή 5.6% στους καπνιστές ή στους πρώην καπνιστές, αντίστοιχα, $p<0.001$). Δεν ανευρέθη στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ μετάλλαξης *EGFR* και τύπου δείγματος ($p=0.07$), ιστολογικού υποτύπου ($p=0.598$), βαθμού διαφοροποίησης ($p=0.072$), pT ($p=0.596$), pN ($p=0.932$).

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *KRAS* δεν παρουσίασαν συσχέτιση με το φύλο ($p=0.863$), το κάπνισμα ($p=0.667$), το βαθμό διαφοροποίησης ($p=0.405$), το pT ($p=0.308$), το pN ($p=0.148$) ή τις μεταστάσεις ($p=0.051$). Πιο συχνά ανιχνεύονταν, όμως, στα χειρουργικά παρασκευάσματα (50.8% vs. 25.9% στις βιοψίες, $p<0.05$). Η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο του *KRAS* παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον ιστολογικό υπότυπο ($p<0.001$) και μάλιστα το 43.5% των μεταλλάξεων αυτών παρατηρήθηκε σε αδενοκαρκινώματα.

Η μετάλλαξη V600E του *BRAF* συσχετίστηκε με υψηλού βαθμού διαφοροποίηση (18.2% vs. 1.1% με χαμηλού βαθμού διαφοροποίηση, $p<0.001$). Καμία συσχέτιση δεν ανιχνεύθηκε μεταξύ παρουσίας μεταλλάξεων γονιδίου *BRAF* και των λοιπών κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων.

Καμία συσχέτιση μεταξύ ανασυνδυασμού *ALK* και κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων δεν κατέστη δυνατόν να διεξαχθεί ίσως λόγω του πολύ μικρού αριθμού ασθενών με τεκμηριωμένο ανασυνδυασμό *ALK*.

Καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ PD-L1 TPS και κλινικοπαθολογοανατομικών παραγόντων δεν τεκμηριώθηκε στατιστικά.

7.4 Περιορισμοί μελέτης

Οι περιορισμοί της μελέτης ήταν η έλλειψη κλινικών πληροφοριών που αφορούν το κάπνισμα, καθώς μόνο για 162 από τους 718 ασθενείς ήταν γνωστό αν ήταν καπνιστές. Επίσης, μόνο για 154 ασθενείς ήταν γνωστή η πληροφορία για την παρουσία μετάστασης, οπότε δεν ήταν γνωστή η σταδιοποίηση των ασθενών ώστε να γίνει στατιστική ανάλυση μεταξύ γενετικών αλλαγών των γονιδίων ή της έκφρασης του PD-L1 και του σταδίου νόσου. Δεν έγινε στατιστική ανάλυση για την πιθανή ανάδειξη συσχέτισης των μεταλλάξεων με το ιστολογικό πρότυπο ανάπτυξης. Επιπλέον, δεν ήταν γνωστή η θεραπεία που έλαβαν οι ασθενείς, οπότε δεν κατέστη δυνατό να διεξαχθούν συμπεράσματα για το PFS και το OS αναδρομικά.

7.5 Σύγκριση αποτελεσμάτων με πρόσφατες μελέτες σε ελληνικό πληθυσμό

Στην παρούσα μελέτη η συχνότητα των μεταλλάξεων στο γονίδιο *EGFR* ήταν 8.7% από 700 ασθενείς, ενώ στη μελέτη της Παπαδοπούλου και συν. η αντίστοιχη συχνότητα ήταν 15.83% από 1472 ασθενείς, στη μελέτη της Χατζηανδρέου και συν. η συχνότητα μεταλλάξεων στο *EGFR* ήταν 10.6% από 956 ασθενείς, στη μελέτη του Συρίγου και συν. η αντίστοιχη συχνότητα ήταν 15.7% από 575 ασθενείς και στη μελέτη της Λινάρδου και συν. η συχνότητα ήταν 10.7 % από 421 ασθενείς. (Chatziandreu et al., 2015; Linardou et al., 2019; Papadopoulou et al., 2015; Syrigos et al., 2018)

Όπως ήταν αναμενόμενο, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του *EGFR* παρατηρήθηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό στο γυναικείο φύλο και στους μη καπνιστές με στατιστική σημαντικότητα ($p < 0.001$). Οι ίδιες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν στις μελέτες των Παπαδοπούλου και συν., Χατζηανδρέου και συν., Συρίγου και συν., και Λινάρδου και συν. (Chatziandreu et al., 2015; Linardou et al., 2019; Papadopoulou et al., 2015; Syrigos et al., 2018) Ειδικά, στη μελέτη της Παπαδοπούλου και συν. οι γυναίκες μη καπνίστριες έφεραν μεγαλύτερη συχνότητα μεταλλάξεων *EGFR* σε σχέση με τις καπνίστριες, ενώ στους άνδρες δεν παρατηρήθηκε αυτή η διαφορά. (Papadopoulou et al., 2015)

Η μελέτη αυτή, όπως και του Συρίγου και συν., δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων στο γονίδιο του *EGFR* και τον ιστολογικό υπότυπο ($p = 0.598$), ενώ στις μελέτες των Παπαδοπούλου και συν., Χατζηανδρέου και συν. και Λινάρδου και συν. υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της παρουσίας μετάλλαξης στο γονίδιο του *EGFR* με τον ιστολογικό υπότυπο αδενοκαρκινώματος. (Chatziandreu et al., 2015; Linardou et al., 2019; Papadopoulou et al., 2015; Syrigos et al., 2018)

Από τους 176 ασθενείς που είχαν ελεγχθεί για μεταλλάξεις στο *KRAS* το 34.7% έφερε μεταλλάξεις. Στη μελέτη της Χατζηανδρέου και συν. το αντίστοιχο ποσοστό ήταν 26.5% από 720 ασθενείς, στη μελέτη της Παπαδοπούλου και συν. το ποσοστό ήταν 18.89% από 561 ασθενείς και στη μελέτη της Λινάρδου και συν. η συχνότητα αυτή ήταν 16.6% από 421 ασθενείς με NSCLC. Για τις μεταλλάξεις του *KRAS* στην παρούσα μελέτη, όπως και στις μελέτες της Λινάρδου και συν., και της Χατζηανδρέου και συν., αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0.001$) με τον ιστολογικό υπότυπο με μεγαλύτερη συχνότητα στα αδενοκαρκινώματα. Η παρούσα μελέτη δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων *KRAS* και καπνίσματος ($p = 0.667$). Παρόμοια αυτή η συσχέτιση δεν είχε αναδειχθεί στις μελέτες των Παπαδοπούλου και συν., Χατζηανδρέου και συν., και Λινάρδου και συν. (Chatziandreou et al., 2015; Linardou et al., 2019; Papadopoulou et al., 2015)

Στην τρέχουσα μελέτη το 1.7% από 358 ασθενείς έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο του *BRAF*. Στη μελέτη της Χατζηανδρέου και συν. η συχνότητα αυτή ανερχόταν στο 2.5% από 471 ασθενείς. Η παρουσία μετάλλαξης στο γονίδιο του *BRAF* συσχετίστηκε με υψηλού βαθμού διαφοροποίηση ($p < 0.001$), ενώ αυτή η συσχέτιση δεν είχε αναδειχθεί στη μελέτη της Χατζηανδρέου και συν. Η τρέχουσα μελέτη και η μελέτη Χατζηανδρέου και συν. δεν έχουν αναδείξει συσχέτιση μεταξύ μεταλλάξεων στο *BRAF* και φύλου, ηλικίας, ιστολογικού υπότυπου. (Chatziandreou et al., 2015)

Στη βιβλιογραφία δε βρέθηκαν μελέτες για τη συχνότητα και τις συσχετίσεις του ανασυνδυασμού *ALK* ή της έκφρασης του PD-L1 σε ελληνικό πληθυσμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8^ο - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι 718 ασθενείς με NSCLC που διαγνώστηκαν από το 2010 έως το 2021 και στους οποίους ο γονιδιακός έλεγχος είχε πραγματοποιηθεί στο Π.Γ.Ν. «Αττικών» παρουσίασαν συχνότητες μεταλλάξεων και συσχετίσεις που είναι σύμφωνες με τη βιβλιογραφία.

Την τελευταία δεκαετία οι έρευνες πάνω στο καρκίνωμα του πνεύμονα έχουν συμβάλει στη βαθιά κατανόηση της βιολογίας αυτού, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη θεραπειών και την εφαρμογή τους ακόμα και σε αρχικά στάδια της νόσου. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με καρκίνωμα πνεύμονα φέρουν μεταλλάξεις που δεν έχουν ταυτοποιηθεί. Με τη σταδιακή εδραίωση του NGS στην καθ' ημέρα πράξη, αναλύονται ταυτόχρονα πολλαπλά δείγματα και με υψηλή αξιοπιστία και ακρίβεια παρέχονται πληροφορίες για γενετικές αλλαγές πολλών γονιδίων για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Χρησιμοποιώντας την τεχνολογία αυτή σε μελλοντικές μελέτες στις οποίες θα συμμετέχουν ασθενείς από νοσοκομεία όλης της χώρας θα αποκτήσουμε πιο σαφή εικόνα για τη συχνότητα των πιο γνωστών αλλά και άγνωστων γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση του πνεύμονα στον ελληνικό πληθυσμό.

Κρίνεται αναγκαίο στις επόμενες μελέτες είτε αναδρομικές είτε προοπτικές στον ελληνικό πληθυσμό να υπάρχουν δεδομένα για όλους τους ασθενείς, συγκεκριμένα για το φύλο, την ηλικία, την κατανάλωση καπνού σε πακέτα-έτη ή την κατανάλωση ηλεκτρονικού τσιγάρου, την ιστολογική ταξινόμηση του NSCLC με το αρχιτεκτονικό πρότυπο ανάπτυξης, το βαθμό διαφοροποίησης, την έκφραση TTF-1, τη σταδιοποίηση, τη χειρουργική αντιμετώπιση, τη ληφθείσα θεραπεία (στοχευμένη, ανοσοθεραπεία, χημειοθεραπεία), τα PFS και OS, ώστε να γίνουν συσχετίσεις με τις πιθανές γενετικές αλλαγές που θα ανιχνευθούν μέσω NGS.

Για την υλοποίηση των παραπάνω μελετών χρειάζεται η συνεργασία και η συνεχής επικοινωνία μεταξύ ομάδων αποτελούμενων από πολλές ιατρικές ειδικότητες που εμπλέκονται στην προσέγγιση του ογκολογικού ασθενούς για τη βέλτιστη προσφορά ιατρικής ακριβείας.

Κατακτώντας όλο και περισσότερες γνώσεις πάνω στον NSCLC, θέτονται τα θεμέλια για μια εποχή που το καρκίνωμα πνεύμονα θα είναι μια ιάσιμη μορφή κακοήθειας.

Περίληψη

ΣΤΟΧΟΣ: Ο μοριακός έλεγχος έχει επιτρέψει την εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών στο καρκίνωμα του πνεύμονα. Καθώς η εθνικότητα μπορεί να παίζει ρόλο στο προφίλ μεταλλάξεων των όγκων, αναζητήθηκαν γονίδια που είχαν αναλυθεί σε ασθενείς Ελληνικής εθνικότητας με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα.

ΜΕΘΟΔΟΙ: Έγινε συλλογή 833 ασθενών που είχαν διαγνωσθεί με καρκίνωμα πνεύμονα από τον Ιανουάριο 2010 έως Σεπτέμβριο 2021 στο Τριτοβάθμιο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο «Αττικόν». Εξαιρέθηκαν ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα, χωρίς γνωστή ιστολογία, και με μεταστάσεις στον πνεύμονα, οπότε στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 718 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. Έγινε καταγραφή της κατάστασης των γονιδίων *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* και *ALK*, καθώς και της έκφρασης PD-L1(TPS) και συσχετίστηκαν με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Οι περισσότεροι ασθενείς ήταν άνδρες (72.1%), με μέση ηλικία τα 67 έτη (ελάχιστο 34 και μέγιστο 93 έτη). Συνοψίζοντας, 126 ασθενείς (17.7% του δείγματος) έφεραν μεταλλάξεις. Πιο συγκεκριμένα, 59 ασθενείς (8.4% από 700 ασθενείς) έφεραν μεταλλάξεις στο γονίδιο του *EGFR*, με πιο συχνές τις ελλείψεις στο εξόνιο 19 (5.4%). 61 ασθενείς (34.7% από 176 ασθενείς) είχαν μεταλλάξεις στο γονίδιο του *KRAS*, απ' τις οποίες η πιο συχνή ήταν η G12C (13.6%). Μόνο 6 ασθενείς από 358 ασθενείς που είχαν ελεγχθεί για μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRAF* έφεραν τη μετάλλαξη V600E (1.7%). 4 από 482 ασθενείς (0.8%) είχαν ανασυνδυασμό *ALK*. Από τους 379 ασθενείς που είχε υπολογιστεί το PD-L1 TPS, 162 (42.7%) είχαν TPS <1%, 141 (37.2%) TPS 1-49% και 76 (20.1%) TPS ≥50%. Οι περισσότερες μεταλλάξεις παρατηρήθηκαν σε μη πλακώδη ιστολογία (19.2% vs. 6.2%, p=0.003) και στο γυναικείο φύλο (28.8% vs. 13.4%, p<0.001). Η ηλικία δε συσχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με τις μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *EGFR* ήταν πιο συχνές στις γυναίκες (20% vs. 4%, p<0.001) και στους μη καπνιστές (30.8% vs. 0.9% or 5.6% σε καπνιστές ή πρώην καπνιστές, αντίστοιχα, p<0.001). Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο του *KRAS* ανιχνεύονταν πιο συχνά στα χειρουργικά παρασκευάσματα (50.8% vs. 25.9% στις βιοψίες, p<0.05). Η μετάλλαξη V600E του γονιδίου *BRAF* συσχετίστηκε με υψηλό βαθμό διαφοροποίησης (18.2% vs. 1.1% στο χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης, p<0.001). Ωστόσο, είναι αναγκαίο να διεξαχθεί περαιτέρω μελέτη για να ερευνηθεί η προγνωστική σημασία των ήδη γνωστών και των νέων γονιδίων στόχων στον ελληνικό πληθυσμό με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα.

ABSTRACT

***EGFR, BRAF, KRAS, ALK* GENE STATUS AND PD-L1 EXPRESSION IN A NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA SERIES AT A UNIVERSITY HOSPITAL**

BACKGROUND: Genetic testing has allowed implementation of targeted therapies in lung carcinomas. Given that ethnicity may play a role on the mutational profiling of tumors, we sought to analyze targeted therapies targets in Greek patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC).

METHODS: We recruited 833 patients with lung cancer diagnosed between January 2010 and September 2021 at the University General Hospital “Attikon”. Excluding patients with small cell lung carcinomas, missing histology and metastases in lung, resulted in a final total of 718 patients with NSCLC. *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* status, *ALK* rearrangement and PD-L1 TPS were reanalyzed and associated with clinicopathological features.

RESULTS AND CONCLUSIONS: Most patients were men (72.1%), with mean age 67 years old (minimum 34 and maximum 93). In total, 126 patients (17.7% of sample) presented with mutations. More specifically, 59 patients (8.4% of 700 analyzed patients) had *EGFR* mutations, the most common being exon 19 deletions (5.4%). 61 patients (34.7% of 176 checked patients) had *KRAS* mutations, the most common being Gly12Cys (13.6%). Only 6 patients out of 358 checked patients for *BRAF* mutations had the V600E mutation (1.7%). A total of 4 out of 482 patients (0.8%) presented with *ALK* rearrangements. Out of 379 patients analyzed for PD-L1 TPS, 162 (42.7%) had TPS <1%, 141 (37.2%) TPS 1-49% and 76 (20.1%) TPS >50 %. Most mutations were observed in non-squamous histology (19.2% vs. 6.2%, $p=0.003$) and in females (28.8% vs. 13.4%, $p<0.001$). Age was not statistically significant among mutations. *EGFR* mutations were more common in females (20% vs. 4%, $p<0.001$) and non-smokers (30.8% vs. 0.9% or 5.6% in current or ex-smokers, respectively, $p<0.001$). *KRAS* mutations were more commonly detected in surgical resections (50.8% vs. 25.9% in biopsies, $p<0.05$). V600E mutation of the *BRAF* gene was associated with good differentiation (18.2% vs. 1.1% in poor differentiation, $p<0.001$). Further study is needed to investigate the prognostic significance of the already known and new targetable genes in Greek NSCLC patients.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

2012. BRAF Pyro® Handbook. 2nd ed. QIAGEN, pp.4-5.
2014. KRAS/BRAF Mutation Analysis Kit For Real-Time PCR. 3.3 version. EntroGen, Inc, p.4.
2017. EGFR Mutation Analysis Kit For Real-Time PCR. 2.4 version. EntroGen, Inc, p.8.
2019. theascreen EGFR RGQ PCR Kit Handbook. 2nd version. QIAGEN, p.6.
- Aisner, D. and Riely, G., (2021), *Non-Small Cell Lung Cancer: Recommendations for Biomarker Testing and Treatment*, Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 19(5.5), pp.610-613.
Doi: <https://doi.org/10.6004/jnccn.2021.5020>
- Alard, E., Butnariu, A., Grillo, M., Kirkham, C., Zinovkin, D., Newnham, L., Macciocchi, J. and Pranjol, M., (2020), *Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets*, Cancers, 12(7), p.1826. Doi: <https://doi.org/10.3390/cancers12071826>
- Amgenoncology.com. 2021. Targeting KRAS-G12C to Block Oncogenic Signaling | Amgen. [online] Available at: <<https://www.amgenoncology.com/targets/kras.html>> [Accessed 25 November 2021].
- Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J., Debieuvre, D., Mosser, J., Lena, H., Ouafik, L., Besse, B., Rouquette, I., Westeel, V., Escande, F., Monnet, I., Lemoine, A., Veillon, R., Blons, H., Audigier-Valette, C., Bringuier, P., Lamy, R., Beau-Faller, M., Pujol, J., Sabourin, J., Penault-Llorca, F., Denis, M., Lantuejoul, S., Morin, F., Tran, Q., Missy, P., Langlais, A., Milleron, B., Cadranet, J., Soria, J. and Zalcman, G., (2016), *Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT)*, The Lancet, 387(10026), pp.1415-1426. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00004-0)
- Bayliss, R., Choi, J., Fennell, D., Fry, A. and Richards, M., (2016), *Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs*, Cellular and Molecular Life Sciences, 73(6), pp.1209-1224. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2117-6>
- Boon, T., Cerottini, J., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. and Van Pel, A., (1994), *Tumor Antigens Recognized by T Lymphocytes*. Annual Review of Immunology, 12(1), pp.337-365.
- Brose, M., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., Einhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., Roth, J., Albelda, S., Davies, H., Cox, C., Brignell, G., Stephens, P., Futreal, P., Wooster, R., Stratton, M. and Weber, B., (2002), *BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma*, Cancer Res. 62, pp.6997-7000.
- Burke, A., Aubry, M., Maleszewski, J., Alexiev, B. and Tavora, F., (2016), *Practical thoracic pathology: Diseases of the Lung, Heart & Thymus*, 1st ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (LWW), pp.1330-1331.

- Capper, D., Preusser, M., Habel, A., Sahm, F., Ackermann, U., Schindler, G., Pusch, S., Mechttersheimer, G., Zentgraf, H. and von Deimling, A., (2011), *Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody*, Acta Neuropathologica, 122(1), pp.11-19. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0841-z>
- Carey, K., Garton, A., Romero, M., Kahler, J., Thomson, S., Ross, S., Park, F., Haley, J., Gibson, N. and Sliwkowski, M., (2006), *Kinetic Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Somatic Mutant Proteins Shows Increased Sensitivity to the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Erlotinib*, Cancer Research, 66(16), pp.8163-8171. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0453>
- Chatziandreou, I., Tsioli, P., Sakellariou, S., Mourkioti, I., Giannopoulou, I., Levidou, G., Korkolopoulou, P., Patsouris, E. and Saetta, A., (2015), *Comprehensive Molecular Analysis of NSCLC: Clinicopathological Associations*, PLOS ONE, 10(7), p.e0133859. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133859>
- Chemnitz, J., Parry, R., Nichols, K., June, C. and Riley, J., (2004), *SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation*, The Journal of Immunology, 173(2), pp.945-954. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.945>
- Chen, D. and Mellman, I., (2013), *Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle*. Immunity, 39(1), pp.1-10. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Childress, M., Himmelberg, S., Chen, H., Deng, W., Davies, M. and Lovly, C., (2018), *ALK Fusion Partners Impact Response to ALK Inhibition: Differential Effects on Sensitivity, Cellular Phenotypes, and Biochemical Properties*, Molecular Cancer Research, 16(11), pp.1724-1736. Doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0171
- Choi, Y., Soda, M., Yamashita, Y., Ueno, T., Takashima, J., Nakajima, T., Yatabe, Y., Takeuchi, K., Hamada, T., Haruta, H., Ishikawa, Y., Kimura, H., Mitsudomi, T., Tanio, Y. and Mano, H., (2010), *EML4-ALK Mutations in Lung Cancer That Confer Resistance to ALK Inhibitors*, New England Journal of Medicine, 363(18), pp.1734-1739. Doi: 10.1056/NEJMoa1007478
- Doroshov, D., Bhalla, S., Beasley, M., Sholl, L., Kerr, K., Gnjjatic, S., Wistuba, I., Rimm, D., Tsao, M. and Hirsch, F., (2021), *PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors*, Nat Rev Clin Oncol, 18, pp.345–362. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00473-5>
- Drizou, M., Kotteas, E. and Syrigos, N., (2017), *Treating patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer: mechanisms of resistance and strategies to overcome it*. Clinical and Translational Oncology, 19(6), pp.658-666. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1605-y>

- Eck, M. and Yun, C., (2010), *Structural and mechanistic underpinnings of the differential drug sensitivity of EGFR mutations in non-small cell lung cancer*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(3), pp.559-566. Doi: 10.1016/j.bbapap.2009.12.010
- Engelman, J., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J., Lindeman, N., Gale, C., Zhao, X., Christensen, J., Kosaka, T., Holmes, A., Rogers, A., Cappuzzo, F., Mok, T., Lee, C., Johnson, B., Cantley, L. and Jänne, P., (2007), *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*, *Science*, 316(5827), pp.1039-43. Doi: 10.1126/science.1141478
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D. and Bray, F., (2014), *Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*, *International Journal of Cancer*, 136(5), pp.E359-E386. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Gainor, J. and Shaw, A., (2013), *Emerging Paradigms in the Development of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer*, *Journal of Clinical Oncology*, 31(31), pp.3987-3996. Doi: 10.1200/JCO.2012.45.2029
- Gao, J., Wu, H., Shi, X., Huo, Z., Zhang, J. and Liang, Z., (2016), *Comparison of Next-Generation Sequencing, Quantitative PCR, and Sanger Sequencing for Mutation Profiling of EGFR, KRAS, PIK3CA and BRAF in Clinical Lung Tumors*, *Clinical Laboratory*, 62(4), pp.689-96. Doi: 10.7754/clin.lab.2015.150837
- Garraway, L. and Jänne, P., (2012), *Circumventing Cancer Drug Resistance in the Era of Personalized Medicine*, *Cancer Discovery*, 2(3), pp.214-226. Doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0012
- Gerber, D., Gandhi, L. and Costa, D., (2014), *Management and Future Directions in Non-Small Cell Lung Cancer with Known Activating Mutations*, *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, (34), pp.e353-e365. Doi: 10.14694/EdBook_AM.2014.34.e353
- Girard, N., Bazhenova, L., Minchom, A., Ou, S., Gadgeel, S., Trigo, J., Viteri, S., Li, G., Mahadevia, P., Londhe, A., Backenroth, D., Li, T. and Bauml, J., (2021), *MA04.07 Comparative Clinical Outcomes for Patients with NSCLC Harboring EGFR Exon 20 Insertion Mutations and Common EGFR Mutations*, *Journal of Thoracic Oncology*, 16 (3S), pp. S 145-S146. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.01.228>
- Govindan, R., Ding, L., Griffith, M., Subramanian, J., Dees, N., Kanchi, K., Maher, C., Fulton, R., Fulton, L., Wallis, J., Chen, K., Walker, J., McDonald, S., Bose, R., Ornitz, D., Xiong, D., You, M., Dooling, D., Watson, M., Mardis, E. and Wilson, R., (2012), *Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers* *Cell*, 150(6), pp.1121-34. Doi: 10.1016/j.cell.2012.08.024

- Guibert, N., Pradines, A., Casanova, A., Farella, M., Keller, L., Soria, J., Favre, G. and Mazières, J., (2016), *Detection and Monitoring of the BRAF Mutation in Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in BRAF -Mutated Lung Adenocarcinoma*, Journal of Thoracic Oncology, 11(9), pp.e109-e112. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.001>
- Heuckmann, J., Balke-Want, H., Malchers, F., Peifer, M., Sos, M., Koker, M., Meder, L., Lovly, C., Heukamp, L., Pao, W., Küppers, R. and Thomas, R., (2012), *Differential Protein Stability and ALK Inhibitor Sensitivity of EML4-ALK Fusion Variants*, Clinical Cancer Research, 18(17), pp.4682-4690. Doi: 10.1158/1078-0432.ccr-11-3260
- Janku, F., Garrido-Laguna, I., Petruzella, L., Stewart, D. and Kurzrock, R., (2011), *Novel Therapeutic Targets in Non-small Cell Lung Cancer*, Journal of Thoracic Oncology, 6(9), pp.1601-1612. Doi: <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31822944b3>
- Johnson, D., Menzies, A., Zimmer, L., Eroglu, Z., Ye, F., Zhao, S., Rizos, H., Sucker, A., Scolyer, R., Gutzmer, R., Gogas, H., Kefford, R., Thompson, J., Becker, J., Berking, C., Egberts, F., Loquai, C., Goldinger, S., Pupo, G., Hugo, W., Kong, X., Garraway, L., Sosman, J., Ribas, A., Lo, R., Long, G. and Schadendorf, D., (2015), *Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms*, European Journal of Cancer, 51(18), pp.2792-2799. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.08.022>
- Kim, H., Kim, W., Choi, Y., Choi, C., Rho, J. and Lee, J., (2013), *Epithelial-mesenchymal transition leads to crizotinib resistance in H2228 lung cancer cells with EML4-ALK translocation*, Mol Oncol. 7(6), pp.1093-1102. Doi: 10.1016/j.molonc.2013.08.001
- Kron, A., Riedel, R., Michels, S., Fassunke, J., Merkelbach-Bruse, S., Scheffler, M., Nogova, L., Fischer, R., Ueckerth, F., Abdulla, D., Kron, F., Pauli, B., Kaminsky, B., Braess, J., Graeven, U., Grohe, C., Krueger, S., Büttner, R. and Wolf, J., (2017), *1300PD Impact of co-occurring genomic alterations on overall survival of BRAF V600E and non-V600E mutated NSCLC patients: Results of the Network Genomic Medicine*, Annals of Oncology, 28, pp.v461-v462. Doi: 10.1093/annonc/mdx380.003
- Lantuejoul, S., Sound-Tsao, M., Cooper, W., Girard, N., Hirsch, F., Roden, A., Lopez-Rios, F., Jain, D., Chou, T., Motoi, N., Kerr, K., Yatabe, Y., Brambilla, E., Longshore, J., Papotti, M., Sholl, L., Thunnissen, E., Rekhman, N., Borczuk, A., Bubendorf, L., Minami, Y., Beasley, M., Botling, J., Chen, G., Chung, J., Dacic, S., Hwang, D., Lin, D., Moreira, A., Nicholson, A., Noguchi, M., Pelosi, G., Pileri, C., Travis, W., Yoshida, A., Daigneault, J., Wistuba, I. and Mino-Kenudson, M., (2020), *PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee*, Journal of Thoracic Oncology, 15(4), pp.499-519. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.12.107>

Lei, Y., Yang, J., Zhang, X., Zhong, W., Zhou, Q., Tu, H., Tian, H., Guo, W., Yang, L., Yan, H., Chen, H., Xie, Z., Su, J., Han, J. and Wu, Y., (2016), *Anaplastic Lymphoma Kinase Variants and the Percentage of ALK-Positive Tumor Cells and the Efficacy of Crizotinib in Advanced NSCLC*, *Clinical Lung Cancer*, 17(3), pp.223-231. Doi: 10.1016/j.clcc.2015.09.002

Li, H., Xu, Y., Wan, B., Song, Y., Zhan, P., Hu, Y., Zhang, Q., Zhang, F., Liu, H., Li, T., Sugimura, H., Cappuzzo, F., Lin, D. and Lv, T., (2019), *The clinicopathological and prognostic significance of PD-L1 expression assessed by immunohistochemistry in lung cancer: a meta-analysis of 50 studies with 11,383 patients*, *Translational Lung Cancer Research*, 8(4), pp.429-449. Doi: 10.21037/tlcr.2019.08.04

Lim, Z. and Ma, P., (2019), *Emerging insights of tumor heterogeneity and drug resistance mechanisms in lung cancer targeted therapy*, *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), p.134. Doi: 10.1186/s13045-019-0818-2.

Lin, J., Zhu, V., Yoda, S., Yeap, B., Schrock, A., Dagogo-Jack, I., Jessop, N., Jiang, G., Le, L., Gowen, K., Stephens, P., Ross, J., Ali, S., Miller, V., Johnson, M., Lovly, C., Hata, A., Gainor, J., Iafrate, A., Shaw, A. and Ou, S., (2018), *Impact of EML4-ALK Variant on Resistance Mechanisms and Clinical Outcomes in ALK-Positive Lung Cancer*, *Journal of Clinical Oncology*, 36(12), pp.1199-1206. Doi: 10.1200/JCO.2017.76.2294

Linardou, H., Kotoula, V., Kouvatsas, G., Mountzios, G., Karavasilis, V., Samantas, E., Kalogera-Fountzila, A., Televantou, D., Papadopoulou, K., Mavropoulou, X., Daskalaki, E., Zaramboukas, T., Efstratiou, I., Lampaki, S., Rallis, G., Res, E., Syrigos, K., Kosmidis, P., Pectasides, D. and Fountzilas, G., (2019), *Genotyping KRAS and EGFR Mutations in Greek Patients With Non-small-cell Lung Cancer: Incidence, Significance and Implications for Treatment*, *Cancer Genomics - Proteomics*, 16(6), pp.531-541. Doi: <https://doi.org/10.21873/cgp.20155>

Leonetti, A., Facchinetti, F., Rossi, G., Minari, R., Conti, A., Friboulet, L., Tiseo, M. and Planchard, D., (2018), *BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): pickaxing another brick in the wall*, *Cancer Treatment Reviews*, 66, pp.82-94. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.04.006>

Marchetti, A., Felicioni, L., Malatesta, S., Grazia Sciarrotta, M., Guetti, L., Chella, A., Viola, P., Pullara, C., Mucilli, F. and Buttitta, F., (2011), *Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring BRAF Mutations*, *Journal of Clinical Oncology*, 29(26), pp.3574-3579. Doi: 10.1200/JCO.2011.35.9638

Martin, P., Leighl, N., Tsao, M. and Shepherd, F., (2013), *KRAS Mutations as Prognostic and Predictive Markers in Non-Small Cell Lung Cancer*, *Journal of Thoracic Oncology*, 8(5), pp.530-542. Doi: <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318283d958>

Midha, A., Dearden, S. and McCormack, R., (2015), *EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII)*, *Am J Cancer Res*, 5(9), pp.2892-2911.

Motz, G. and Coukos, G., (2013), *Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression*, Immunity, 39(1), pp.61-73. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.005>

Mulloy, R., Ferrand, A., Kim, Y., Sordella, R., Bell, D., Haber, D., Anderson, K. and Settleman, J., (2007), *Epidermal Growth Factor Receptor Mutants from Human Lung Cancers Exhibit Enhanced Catalytic Activity and Increased Sensitivity to Gefitinib*, Cancer Research, 67(5), pp.2325-2330. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4293

Niederst, M., Sequist, L., Poirier, J., Mermel, C., Lockerman, E., Garcia, A., Katayama, R., Costa, C., Ross, K., Moran, T., Howe, E., Fulton, L., Mulvey, H., Bernardo, L., Mohamoud, F., Miyoshi, N., VanderLaan, P., Costa, D., Jänne, P., Borger, D., Ramaswamy, S., Shioda, T., Iafrate, A., Getz, G., Rudin, C., Mino-Kenudson, M. and Engelman, J., (2015), *RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer*, Nat Commun. 6(6377). Doi: 10.1038/ncomms7377

Ohashi, K., Sequist, L., Arcila, M., Moran, T., Chmielecki, J., Lin, Y., Pan, Y., Wang, L., de Stanchina, E., Shien, K., Aoe, K., Toyooka, S., Kiura, K., Fernandez-Cuesta, L., Fidias, P., Yang, J., Miller, V., Riely, G., Kris, M., Engelman, J., Vnencak-Jones, C., Dias-Santagata, D., Ladanyi, M. and Pao, W., (2012) *Lung cancers with acquired resistance to EGFR inhibitors occasionally harbor BRAF gene mutations but lack mutations in KRAS, NRAS, or MEK1*, Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31), pp.2127-2133. Doi: 10.1073/pnas.1203530109

Paik, P., Arcila, M., Fara, M., Sima, C., Miller, V., Kris, M., Ladanyi, M. and Riely, G., (2011), *Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations*, J Clin Oncol, 29(15), pp.2046-2051. Doi: 10.1200/JCO.2010.33.1280

Papadopoulou, E., Tsoulos, N., Metaxa-Mariatou, V., Tsigoti, A., Apessos, A., Agiannitopoulos, K., Zarogoulidis, K., Zarogoulidis, P., Kasarakis, D., Kakolyris, S., Dahabreh, J., Vlastos, F., Zoublios, C., Rapti, A., Georgatou-Papageorgiou, N., Aravantinos, G., Karavasilis, V. and Nasioulas, G., (2015), *EGFR and KRAS mutational status in Greek NSCLC patients using Sanger sequencing, High Resolution Melting curve analysis and next generation sequencing*. Journal of Clinical Oncology, 33(15_suppl), pp.e22178-e22178. Doi: 10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e22178

Pardoll, D., (2012), *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*, Nature Reviews Cancer, 12(4), pp.252-264. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrc3239>

Pareja, F., Crapanzano, J., Mansukhani, M., Bulman, W. and Saqi, A., (2014), *Cytomorphological features of ALK-positive lung adenocarcinomas: Psammoma bodies and signet ring cells*. Cancer Cytopathology, 123(3), pp.162-170. Doi: 10.1002/cncy.21507

Planchard, D., Popat, S., Kerr, K., Novello, S., Smit, E., Faivre-Finn, C., Mok, T., Reck, M., Van Schil, P., Hellmann, M. and Peters, S., (2018), *Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*, Annals of Oncology, [online] 29(suppl 4), pp.iv192-iv237. Available at: <<https://www.esmo.org/guidelines/lung-and-chest-tumours/clinical-practice-living-guidelines-metastatic-non-small-cell-lung-cancer>>.

Ramalingam, S., Zhou, C., Kim, T., Kim, S., Yang, J., Riely, G., Mekhail, T., Nguyen, D., García Campelo, M., Felip, E., Vincent, S., Jin, S., Bunn, V., Lin, J., Lin, H., Mehta, M. and Janne, P., (2021), *Mobocertinib (TAK-788) in EGFR exon 20 insertion (ex20ins) + metastatic NSCLC (mNSCLC): Additional results from platinum-pretreated patients (pts) and EXCLAIM cohort of phase 1/2 study*, Journal of Clinical Oncology, 39(15_suppl), pp.9014-9014. Doi: 10.1200/JCO.2021.39.15_suppl.9014

Ramalingam, S., Vansteenkiste, J., Planchard, D., Cho, B., Gray, J., Ohe, Y., Zhou, C., Reungwetwattana, T., Cheng, Y., Chewaskulyong, B., Shah, R., Cobo, M., Lee, K., Cheema, P., Tiseo, M., John, T., Lin, M., Imamura, F., Kurata, T., Todd, A., Hodge, R., Saggese, M., Rukazenzov, Y. and Soria, J., (2020), *Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC*, New England Journal of Medicine, 382(1), pp.41-50. Doi: 10.1056/nejmoa1913662

Rangachari, D., Yamaguchi, N., VanderLaan, P., Folch, E., Mahadevan, A., Floyd, S., Uhlmann, E., Wong, E., Dahlberg, S., Huberman, M. and Costa, D., (2015), *Brain metastases in patients with EGFR -mutated or ALK -rearranged non-small-cell lung cancers*, Lung Cancer, 88(1), pp.108-111. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.01.020>

Reddy, V., Gay, L., Elvin, J., Vergilio, J., Suh, J., Ramkissoon, S., Daniel, S., Severson, E., Ali, S., Schrock, A., Chung, J., Frampton, G., Fabrizio, D., Stephens, P., Miller, V. and Ross, J., (2017), *BRAF fusions in clinically advanced non-small cell lung cancer: An emerging target for anti-BRAF therapies*, Journal of Clinical Oncology, 35(15_suppl), pp.9072-9072. Doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9072

Remon, J., Soria, J. and Peters, S., (2021), *Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: an update of the ESMO Clinical Practice Guidelines focusing on diagnosis, staging, systemic and local therapy*, Annals of Oncology, 32(12), pp.1637-1642. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1994>

Riess, J., Gandara, D., Frampton, G., Madison, R., Peled, N., Bufill, J., Dy, G., Ou, S., Stephens, P., McPherson, J., Lara, P., Burich, R., Ross, J., Miller, V., Ali, S., Mack, P. and Schrock, A., (2018), *Diverse EGFR Exon 20 Insertions and Co-Occurring Molecular Alterations Identified by Comprehensive Genomic Profiling of NSCLC*, Journal of Thoracic Oncology, 13(10), pp.1560-1568. Doi: 10.1016/j.jtho.2018.06.019

- Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., Hu, Y., Tan, Z., Stokes, M., Sullivan, L., Mitchell, J., Wetzel, R., MacNeill, J., Ren, J., Yuan, J., Bakalarski, C., Villen, J., Kornhauser, J., Smith, B., Li, D., Zhou, X., Gygi, S., Gu, T., Polakiewicz, R., Rush, J. and Comb, M., (2007), *Global Survey of Phosphotyrosine Signaling Identifies Oncogenic Kinases in Lung Cancer*, Cell, 131(6), pp.1190-1203. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.025>
- Robichaux, J., Elamin, Y., Tan, Z., Carter, B., Zhang, S., Liu, S., Li, S., Chen, T., Poteete, A., Estrada-Bernal, A., Le, A., Truini, A., Nilsson, M., Sun, H., Roarty, E., Goldberg, S., Brahmer, J., Altan, M., Lu, C., Papadimitrakopoulou, V., Politi, K., Doebele, R., Wong, K. and Heymach, J., (2018), *Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer*, Nature Medicine, 24(5), pp.638-646. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0007-9>
- Rosenbaum, J., Bloom, R., Forys, J., Hiken, J., Armstrong, J., Branson, J., McNulty, S., Velu, P., Pepin, K., Abel, H., Cottrell, C., Pfeifer, J., Kulkarni, S., Govindan, R., Konnick, E., Lockwood, C. and Duncavage, E., (2018), *Genomic heterogeneity of ALK fusion breakpoints in non-small-cell lung cancer*, Modern Pathology, 31(5), pp.791-808. Doi: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.181>
- Rotow, J. and Bivona, T., (2017), *Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC*, Nature Reviews Cancer, 17(11), pp.637-658. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.84>
- Roy-Chowdhuri, S., (2021), *Molecular Pathology of Lung Cancer*, Surgical Pathology Clinics, 14(3), pp.369-377. Doi: 10.1016/j.path.2021.05.002
- Salgia, R., Pharaon, R., Mambetsariev, I., Nam, A. and Sattler, M., (2021), *The improbable targeted therapy: KRAS as an emerging target in non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Cell Reports Medicine, 2(1), p.100186. Doi: 10.1016/j.xcrm.2020.100186
- Scheffler, M., Ihle, M., Hein, R., Merkelbach-Bruse, S., Scheel, A., Siemanowski, J., Brägelmann, J., Kron, A., Abedpour, N., Ueckerth, F., Schüller, M., Koleczko, S., Michels, S., Fassunke, J., Pasternack, H., Heydt, C., Serke, M., Fischer, R., Schulte, W., Gerigk, U., Nogova, L., Ko, Y., Abdulla, D., Riedel, R., Kambartel, K., Lorenz, J., Sauerland, I., Randerath, W., Kaminsky, B., Hagmeyer, L., Grohé, C., Eisert, A., Frank, R., Gogl, L., Schaepers, C., Holzem, A., Hellmich, M., Thomas, R., Peifer, M., Sos, M., Büttner, R. and Wolf, J., (2019), *K-ras Mutation Subtypes in NSCLC and Associated Co-occurring Mutations in Other Oncogenic Pathways*. Journal of Thoracic Oncology, 14(4), pp.606-616. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.013>
- Sequist, L., Waltman, B., Dias-Santagata, D., Digumarthy, S., Turke, A., Fidias, P., Bergethon, K., Shaw, A., Gettinger, S., Cosper, A., Akhavanfard, S., Heist, R., Temel, J., Christensen, J., Wain, J., Lynch, T., Vernovsky, K., Mark, E., Lanuti, M., Iafrate, A., Mino-Kenudson, M. and Engelman, J., (2011), *Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors*. Science Translational Medicine, 3(75). Doi: 10.1126/scitranslmed.3002003

Shaw, A., Yeap, B., Mino-Kenudson, M., Digumarthy, S., Costa, D., Heist, R., Solomon, B., Stubbs, H., Admane, S., McDermott, U., Settleman, J., Kobayashi, S., Mark, E., Rodig, S., Chirieac, L., Kwak, E., Lynch, T. and Iafrate, A., (2009), *Clinical Features and Outcome of Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK*, *Journal of Clinical Oncology*, 27(26), pp.4247-4253. Doi: 10.1200/JCO.2009.22.6993

Shi, Y., Au, J., Thongprasert, S., Srinivasan, S., Tsai, C., Khoa, M., Heeroma, K., Itoh, Y., Cornelio, G. and Yang, P., (2014), *A Prospective, Molecular Epidemiology Study of EGFR Mutations in Asian Patients with Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology (PIONEER)*, *Journal of Thoracic Oncology*, 9(2), pp.154-162. Doi: <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000033>

Singal, G., Miller, P., Agarwala, V., Li, G., Kaushik, G., Backenroth, D., Gossai, A., Frampton, G., Torres, A., Lehnert, E., Bourque, D., O’Connell, C., Bowser, B., Caron, T., Baydur, E., Seidl-Rathkopf, K., Ivanov, I., Alpha-Cobb, G., Guria, A., He, J., Frank, S., Nunnally, A., Bailey, M., Jaskiw, A., Feuchtbaum, D., Nussbaum, N., Abernethy, A. and Miller, V., (2019), *Association of Patient Characteristics and Tumor Genomics With Clinical Outcomes Among Patients With Non–Small Cell Lung Cancer Using a Clinicogenomic Database*. *JAMA*, 321(14), p.1391. Doi: 10.1001/jama.2019.3241

Skoulidis, F., Li, B., Dy, G., Price, T., Falchook, G., Wolf, J., Italiano, A., Schuler, M., Borghaei, H., Barlesi, F., Kato, T., Curioni-Fontecedro, A., Sacher, A., Spira, A., Ramalingam, S., Takahashi, T., Besse, B., Anderson, A., Ang, A., Tran, Q., Mather, O., Henary, H., Ngarmchamnanrith, G., Friberg, G., Velcheti, V. and Govindan, R., (2021), *Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation*, *N Engl J Med*, 384, pp.2371-81. DOI: 10.1056/NEJMoa2103695

Skoulidis, F. and Heymach, J., (2019), *Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy*, *Nature Reviews Cancer*, 19(9), pp.495-509. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0179-8>

Soda, M., Choi, Y., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y. and Mano, H., (2007), *Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*, *Nature*, 448(7153), pp.561-566. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature05945>

Syrigos, K., Georgoulas, V., Zarogoulidis, K., Makrantonakis, P., Charpidou, A. and Christodoulou, C., (2018), *Epidemiological Characteristics, EGFR Status and Management Patterns of Advanced Non-small Cell Lung Cancer Patients: The Greek REASON Observational Registry Study*. *Anticancer Research*, 38(6), pp.3735-3744. Doi: <https://doi.org/10.21873/anticancer.12654>

Thai, A., Solomon, B., Sequist, L., Gainor, J. and Heist, R., (2021), *Lung cancer*, *The Lancet*, 398(10299), pp.535-554. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00312-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3)

Toyokawa, G., Seto, T., Takenoyama, M. and Ichinose, Y., (2015), Insights into brain metastasis in patients with ALK+ lung cancer: is the brain truly a sanctuary?, *Cancer and Metastasis Reviews*, 34(4), pp.797-805. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10555-015-9592-y>

Travis, W., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A. and Nicholson, A., (2015), *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*, 4th ed. Lyon: International Agency for Research on cancer, pp.22-25.

Uptodate.com.2021.UpToDate.[online]Available at:<<https://www.uptodate.com/contents/personalized-genotype-directed-therapy-for-advanced-non-small-cell-lung-cancer>> [Accessed 24 November 2021].

U.S. Food and Drug Administration. 2021. FDA grants accelerated approval to amivantamab-vmjw for mNSCLC. [online] Available at: <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-amivantamab-vmjw-metastatic-non-small-cell-lung-cancer>> [Accessed 25 November 2021].

U.S. Food and Drug Administration. 2021. FDA grants accelerated approval to mobocertinib for metastatic non-sma. [online] Available at: <<https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-mobocertinib-metastatic-non-small-cell-lung-cancer-egfr-exon-20>> [Accessed 25 November 2021].

Vyse, S. and Huang, P., (2019), *Targeting EGFR exon 20 insertion mutations in non-small cell lung cancer*, *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0038-9>

Wan, P., Garnett, M., Roe, S., Lee, S., Niculescu-Duvaz, D., Good, V., Project, C., Jones, C., Marshall, C., Springer, C., Barford, D. and Marais, R., (2004), *Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF*, *Cell*, 116(6), pp.855-867. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00215-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00215-6)

Warth, A., Penzel, R., Lindenmaier, H., Brandt, R., Stenzinger, A., Herpel, E., Goeppert, B., Thomas, M., Herth, F., Dienemann, H., Schnabel, P., Schirmacher, P., Hoffmann, H., Muley, T. and Weichert, W., (2013), *EGFR, KRAS, BRAF and ALK gene alterations in lung adenocarcinomas: patient outcome, interplay with morphology and immunophenotype*, *European Respiratory Journal*, 43(3), pp.872-883. Doi: 10.1183/09031936.00018013

Weinberg, R., (2013), *The biology of cancer*, 2nd ed. New York: Garland Science, pp.138-143, 166-167.

Weinstein, I. and Joe, A., (2006), *Mechanisms of Disease: oncogene addiction—a rationale for molecular targeting in cancer therapy*, *Nature Clinical Practice Oncology*, 3(8), pp.448-457. Doi: <https://doi.org/10.1038/ncponc0558>

Witta, S., Gemmill, R., Hirsch, F., Coldren, C., Hedman, K., Ravdel, L., Helfrich, B., Dziadziuszko, R., Chan, D., Sugita, M., Chan, Z., Baron, A., Franklin, W., Drabkin, H., Girard, L., Gazdar, A., Minna, J. and Bunn, P. Jr, (2006), *Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines*, *Cancer Res*, 66(2), pp.944-50. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1988.

Yao, Z., Torres, N., Tao, A., Gao, Y., Luo, L., Li, Q., de Stanchina, E., Abdel-Wahab, O., Solit, D., Poulikakos, P. and Rosen, N., (2015), *BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition*, *Cancer Cell*, 28(3), pp.370-383. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.08.001>

Yousem, S., Nikiforova, M. and Nikiforov, Y., (2008), *The Histopathology of BRAF-V600E-mutated Lung Adenocarcinoma*, *American Journal of Surgical Pathology*, 32(9), pp.1317-1321. Doi: 10.1097/PAS.0b013e31816597ca

Zhang, C., Spevak, W., Zhang, Y., Burton, E., Ma, Y., Habets, G., Zhang, J., Lin, J., Ewing, T., Matusow, B., Tsang, G., Marimuthu, A., Cho, H., Wu, G., Wang, W., Fong, D., Nguyen, H., Shi, S., Womack, P., Nespi, M., Shellooe, R., Carias, H., Powell, B., Light, E., Sanftner, L., Walters, J., Tsai, J., West, B., Visor, G., Rezaei, H., Lin, P., Nolop, K., Ibrahim, P., Hirth, P. and Bollag, G., (2015), *RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation*, *Nature*, 526(7574), pp.583-586. Doi: <https://doi.org/10.1038/nature14982>

Zhang, J., Yang, P. and Gray, N., (2009), *Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors*, *Nat Rev Cancer*, 9(1), pp.28–39. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrc2559>

Ziogas, D., Tsiara, A., Tsironis, G., Lykka, M., Liontos, M., Bamias, A. and Dimopoulos, M., (2018), *Treating ALK-positive non-small cell lung cancer*, *Annals of Translational Medicine*, 6(8), pp.141-141. Doi: 10.21037/atm.2017.11.34