

ΚΛΙΝΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ Microlynaq-TM

Επισκόπηση Μελέτης

Επίσημος τίτλος

Κλινική Μελέτη για τη Θεραπευτική Αποτελεσματικότητα In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων, αναμειγμένων με (NSCLC)-TAAs και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM σε ασθενείς με MMKΠ σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab.

Σύντομη Περίληψη

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως με τον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (MMKΠ) να αφορά στο 85% των περιπτώσεων των ασθενών. Ο καρκίνος του πνεύμονα χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση, ενώ λιγότερο από 18% των ασθενών ξεπερνούν το προσδόκιμο της πενταετούς επιβίωσης. Οι κοινές θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως είναι η χημειοθεραπεία και το χειρουργείο παρατείνουν την επιβίωση ασθενών, χωρίς όμως να παρέχουν σημαντικά και μακροχρόνια θεραπευτικά αποτελέσματα. Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα είναι μία μορφή καρκίνου του πνεύμονα. Παρατηρείται όταν τα φυσιολογικά κύτταρα του πνεύμονα μετατρέπονται σε παθολογικά και πολλαπλασιάζονται αυτόνομα και ανεξέλεγκτα. Υπάρχουν διάφορα είδη καρκίνου του πνεύμονα. Κάποια είδη καρκίνου πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα, ενώ κάποια άλλα πιο αργά. Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου του πνεύμονα. Συνήθως δεν πολλαπλασιάζεται τόσο γρήγορα όσο μία άλλη μορφή πνευμονικού καρκίνου που ονομάζεται μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως και στα δύο φύλα, με 1.8 εκατομμύρια θανάτους εξαιτίας της νόσου να έχουν καταγραφεί για το 2020. Η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται στο 10-20% του συνόλου των περιπτώσεων αυτών, καθ' ότι η πλειονότητα των ασθενών τη στιγμή της διάγνωσης παρουσιάζουν ήδη προχωρημένη ή μεταστατική νόσο, περιορίζοντας τις θεραπευτικές επιλογές του ασθενή και μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα επιβίωσης πέραν των πέντε ετών. Οι στοχευμένες μοριακές θεραπείες και πρόσφατα η ανοσοθεραπεία έχουν βελτιώσει σε σημαντικό βαθμό την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Ειδικότερα η ανοσοθεραπεία, αποτελεί μια καινοτόμο θεραπευτική προσέγγιση για τον μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα, που στοχεύει στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και των στοιχείων του προκειμένου να καταστείλουν τον όγκο. Παρά όμως τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τη χορήγηση ανοσοθεραπείας, τα κλινικά οφέλη περιορίζονται σε ένα μικρό σχετικά ποσοστό ασθενών και επομένως, παραμένει επιτακτική η ανάγκη για την εύρεση νέων και περισσότερο πληροφοριακών προβλεπτικών βιοδεικτών και συνδυαστικών θεραπειών για χρήση στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Εξατομικευμένα εμφυτεύσιμα εμβόλια με αντιγονικά προενεργοποιημένα μακροφάγα

Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αναγνώριση και η καταπολέμηση των αντιγόνων με χυμικές και κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις, με στόχο την εξάλειψη των ξένων ερεθισμάτων και την ανάπτυξη ειδικής μνήμης. Η ανάπτυξη ανοσοαπόκρισης έναντι ενός αντιγόνου έχει αξιοποιηθεί στο πλαίσιο των εμβολίων, τα οποία αποτελούν αντικείμενο ανάπτυξης για την πρόληψη ή βελτίωση των αποτελεσμάτων μελλοντικών παθογόνων μολύνσεων. Προκειμένου να αποφευχθεί η μολυσματικότητα, τα εμβόλια δεύτερης γενιάς κατασκευάστηκαν από καθορισμένα αντιγονικά πεπτίδια ή ανασυνδιασμένες υπομονάδες πρωτεϊνών, τα οποία όμως χρειάζονται ταυτόχρονη χορήγηση ανοσοενισχυτικού για την επαγωγή της ανοσοαπόκρισης. Ωστόσο, τα ανοσοενισχυτικά είναι υπεύθυνα για πολλές παρενέργειες και επιπλέον, λόγω του εκτεταμένου πολυμορφισμού των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, η επιλογή συγκεκριμένων μη λοιμωδών αντιγονικών επιτόπων μπορεί να μην είναι εξίσου αποτελεσματική για όλα τα άτομα. Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη ενός συστήματος που να επιτρέπει τη φυσική "φόρτωση" και παρουσίαση αντιγόνων in vitro και την περαιτέρω ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης in vivo. Μια τέτοια τεχνολογία οδηγεί σε εξατομικευμένα εμφυτεύσιμα εμβόλια, όπου μακροφάγα εμβολιάζονται με το αντιγόνο με φυσικό τρόπο και αφού ενεργοποιηθούν, προσκολλώνται σε εμφυτεύσιμες επιφάνειες και είναι σε θέση να ενισχύσουν την έναρξη ανοσολογικής απόκρισης. Μια τέτοια προσέγγιση εξαλείφει τις παρενέργειες που οφείλονται στη μη ειδική διέγερση των ανοσοενισχυτικών, αφήνοντας το φυσικό μηχανισμό επιλογής "φόρτωσης" αντιγόνου στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ώστε να επιλεγεί ο κατάλληλος αντιγονικός επίτοπος για κάθε άτομο. Οι εμφυτεύσιμες επιφάνειες αποτελούνται από ικρίωματα πυριτίου με τρισδιάστατη μικρο- και νανο- υφή και κατασκευάζονται με τη χρήση λέιζερ υπερταχών παλμών. Η εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής σε ανθρώπους θα είναι μεγάλης σημασίας για το άνοιγμα νέων τομέων στην έρευνα και τη θεραπεία.

Ηλεκτρονικό τσιγάρο, Οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του πνεύμονα και γενετικοί πολυμορφισμοί

Η εφεύρεση του ηλεκτρονικού τσιγάρου για την παροχή νικοτίνης στο πνευμονικό επιθήλιο μέσω ηλεκτρονικής συσκευής έγινε διαθέσιμη προς πώληση το 2007. Ο βασικός μηχανισμός αποτελείται από ένα θερμαντικό πηνίο που λειτουργεί με συσσωρευτή και θερμαίνει το υγρό, συνήθως ένα μείγμα αρωμάτων, διαλύτη και υγρής νικοτίνης, που περιέχεται σε ένα ανταλλακτικό φυσίγγιο. Τα αεροζόλ που περιέχουν νικοτίνη μπορούν να επιτύχουν το μέγιστο επίπεδο νικοτίνης στον ορό του καπνιστή σε λιγότερο από 5 λεπτά. Η ποικιλομορφία των διαθέσιμων προϊόντων καθώς και οι παραλλαγές των πρακτικών αδειοδότησης

κατέστησαν δύσκολη την αποτελεσματική αξιολόγηση της ασφάλειας αυτών των συσκευών και της χρήσης τους. Ο επιπολασμός της χρήσης του ηλεκτρονικού τσιγάρου έφτασε το 3,2% των ενηλίκων το 2016. Οι χρήστες του κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες: νυν καπνιστές που το χρησιμοποιούν σκόπιμα ως μεταβατικό στάδιο διακοπής του καπνίσματος, νυν καπνιστές που κάνουν συνεχή διπλή χρήση και τέλος άτομα που δεν έκαναν ποτέ πριν χρήση του παραδοσιακού τσιγάρου. Η τελευταία κατηγορία επικρατεί ιδιαίτερα στους νέους ενήλικες, καθώς το 40% των χρηστών ηλεκτρονικού τσιγάρου ηλικίας 18-24 ετών δεν ήταν ποτέ καπνιστές. Οι κλινικές δοκιμές υποστηρίζουν ότι τα ηλεκτρονικά τσιγάρα που περιέχουν νικοτίνη είναι πιο αποτελεσματικά για την διακοπή του καπνίσματος από τα ηλεκτρονικά τσιγάρα που δεν περιέχουν νικοτίνη. Ωστόσο, δεν υπάρχει αποδεδειγμένο όφελος έναντι άλλων βοηθημάτων διακοπής της νικοτίνης. Για τη διπλή χρήση, η οποία ορίζεται ως η συνέχιση του καπνίσματος παραδοσιακών τσιγάρων καπνού και ηλεκτρονικού τσιγάρου, δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι προσφέρει κλινικό όφελος. Οι καπνιστές που έγιναν αποκλειστικοί χρήστες ηλεκτρονικού τσιγάρου, αξιολογήθηκαν σε μια 2ετή μελέτη που δεν ανέφερε σημαντικά ανεπιθύμητα συμβάντα για τους συμμετέχοντες μετά τη μετάβαση στο ηλεκτρονικό τσιγάρο με νικοτίνη. Ωστόσο, υπάρχει έλλειψη βραχυπρόθεσμων ή μακροπρόθεσμων δεδομένων ασφάλειας. Αν και τα συστατικά του αεροζόλ στο ηλεκτρονικό τσιγάρο διαφέρουν από αυτά του παραδοσιακού τσιγάρου, τα διαθέσιμα δεδομένα δείχνουν ότι η φορμαλδεΐδη, η ακεταλδεΐδη και τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου υπάρχουν σε επαρκείς συγκεντρώσεις για να προκαλέσουν φλεγμονώδη βλάβη στον αεραγωγό και στο πνευμονικό επιθήλιο. Το αεροζόλ του ηλεκτρονικού τσιγάρου μπορεί επίσης να περιέχει πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, νιτροζαμίνες και ιχνοστοιχεία, αν και οι συγκεντρώσεις ποικίλλουν. Επιπροσθέτως, η νικοτίνη που περιέχεται στους ατμούς του ηλεκτρονικού τσιγάρου μπορεί να προκαλέσει εξάρτηση σε χρήστες που δεν ήταν ήδη καπνιστές. Το πιο ανησυχητικό δεδομένο είναι η αύξηση της χρήσης του ηλεκτρονικού τσιγάρου κατά 900% στους μαθητές δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης μεταξύ 2011 και 2015, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι η νικοτίνη μπορεί να βλάψει την ανάπτυξη του εγκεφάλου σε εφήβους. Το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του πνεύμονα έχει βρεθεί ότι αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου σε αρκετές μελέτες, οι οποίες αναφέρουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου σε άτομα με θετικό οικογενειακό ιστορικό. Ακόμα και όταν έγινε προσαρμογή με βάση το ιστορικό καπνίσματος των συγκεκριμένων ατόμων, ο σχετικός κίνδυνος παρέμεινε σημαντικά υψηλός. Όσον αφορά το γονιδιακό προφίλ των ασθενών, το γονίδιο που εμπλέκεται άμεσα στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα είναι το RGS17 και συγκεκριμένα ο τόπος 6q23-25. Ο κίνδυνος του καρκίνου του πνεύμονα αυξάνεται επίσης στο πλαίσιο του συνδρόμου Li Fraumeni, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεταλλάξεων στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53. Πρόσφατες μελέτες ανάλυσης γονιδιώματος έχουν καταφέρει να εντοπίσουν πολλούς γενετικούς πολυμορφισμούς που σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα, χρησιμοποιώντας έως και ένα εκατομμύριο επισημασμένους πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphism, SNP) για τον εντοπισμό κοινών γενετικών παραλλαγών. Οι τρεις κύριοι γενετικοί τύποι που εντοπίστηκαν βρίσκονται στις περιοχές 15q25, 5p15 και 6p21. Αν και οι μελέτες εξηγούν μόνο ένα μικρό ποσοστό της συνολικής γενετικής διακύμανσης που σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα, το γεγονός ότι αρκετοί καπνιστές δεν αναπτύσσουν καρκίνο υποστηρίζει την υπόθεση ότι η γενετική προδιάθεση συμβάλλει σημαντικά στην καρκινογένεση. Τρεις διαφορετικές μελέτες ανάλυσης γονιδιώματος για τον καρκίνο του πνεύμονα παρείχαν αρκετές πληροφορίες για τον τόπο 15q25.1, ο οποίος περιέχει έξι αναγνωρισμένες γονιδιακές περιοχές, συμπεριλαμβανομένων και των τριών γονιδίων CHRNA3, HRNA5 και CHRNA4, που κωδικοποιούν νικοτινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης σε διάφορους ιστούς. Οι παραλλαγές στον τόπο 15q25 συνδέονται επίσης με την αυξημένο εθισμό στο κάπνισμα αλλά και την εν γένει συμπεριφορά καπνίσματος, και συγκεκριμένα με την αύξηση του αριθμού των τσιγάρων που καπνίζονται ανά ημέρα. Ο γονιδιακός τόπος 15q25 είναι ο μόνος που έχει επανειλημμένως καταγραφεί σε όλους τους 34 ιστολογικούς τύπους καρκίνου του πνεύμονα. Αντίθετα, ένας άλλος νέος γονιδιακός τόπος στο 9p21 που έχει καταγραφεί κυρίως στους Καυκάσιους, περιορίζεται αποκλειστικά στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Ο γονιδιακός τόπος στο 5p15.33 αντιπροσωπεύει μια περιοχή που περιλαμβάνει τα γονίδια TERT και CLPTM1L. Δύο παραλλαγές στην περιοχή αυτή, rs402710 και rs2736100, οι οποίες δεν συνδέονται ισχυρά μεταξύ τους, φαίνεται να σχετίζονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα. Το γονίδιο TERT κωδικοποιεί το ένζυμο αναστροφή μεταγραφάσης της τελομεράσης που είναι απαραίτητο για την ενζυμική δραστηριότητα της τελομεράσης και τη συντήρηση του μήκους των τελομερών. Έως και 90% των ανθρώπινων όγκων παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα τελομεράσης. Ορισμένες αναλύσεις επικεντρώθηκαν στις προσεγγίσεις που βασίζονται σε μονοπάτια για να συμπληρώσουν την ανάλυση SNP με την ενσωμάτωση βιολογικών γνώσεων. Μια μετα-ανάλυση έξι μελετών για τη διερεύνηση συσχετίσεων μεταξύ 7650 γενετικών παραλλαγών στα 720 γονίδια που σχετίζονται με τις οδούς φλεγμονής και στον κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα εντόπισε μια νέα παραλλαγή (rs2741354 σε EPHX2 στο 8q21.1), ενώ επιβεβαίωσε τις συσχετίσεις μεταξύ των περιοχών 5p και 6p με τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου. Άλλες μελέτες χρησιμοποίησαν συγκεντρωτικά δεδομένα από μελέτες ανάλυσης γονιδιώματος σε Ευρωπαίους και αναγνώρισαν σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην ανάπτυξη πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα και στις σπάνιες παραλλαγές BRCA2 p.Lys3326X (rs11571833) και CHEK2 p.Ile157Thr (rs17879961).

Ο ρόλος των microRNAs στη Ρύθμιση του Αντικαρκινικής Ανοσολογικής Απόκρισης

Είναι πλέον γνωστό ότι οι όγκοι προκαλούν διαταραχή στην περιφερική ανοσολογική απάντηση η οποία σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου και με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών. Επομένως, η ανάλυση βιομοριών, που έχουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και της αντικαρκινικής ανοσίας, σε δείγματα περιφερικού αίματος ως υλικού “υγρής βιοψίας” από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, θα μπορούσε να αποκαλύψει και να αναδείξει αποτελεσματικούς ή εύκολα προσβάσιμους βιοδείκτες. Προς αυτή την κατεύθυνση, η μελέτη των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (miRNAs) αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας καθώς η έκφραση τους έχει βρεθεί να προσδιορισθεί σε απορυθμισμένη σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένου του MMKP, ενώ παράλληλα ολοένα και περισσότερα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την ανοσολογική απάντηση κατά του όγκου, επηρεάζοντας την γονιδιακή έκφραση ανοσορυθμιστικών μορίων, σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, στον όγκο και τα ανοσοκύτταρα. Λόγω της συμμετοχής των miRNAs στα διάφορα στάδια έναρξης και εξέλιξης του όγκου, τα μόρια αυτά εξετάζονται ως πιθανοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες στον καρκίνο. Η αποτελεσματικότητα των miRNAs ως βιοδείκτες έγκειται στην υψηλή ειδικότητα τους και στο μοτίβο έκφρασης τους το οποίο διαφέρει μεταξύ φυσιολογικής και παθολογικής κατάστασης. Σημαντικά πλεονεκτήματά τους είναι ότι

εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους (19-24 νουκλεοτίδια), είναι εξαιρετικά σταθερά και μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν σε δείγματα πλάσματος με μεγάλη επαναληψιμότητα. Το πλάσμα αποτελεί μια δεξαμενή miRNAs που εκκρίνονται από διαφορετικά σημεία του αρχικού όγκου ή των μεταστατικών εστιών, αντανakλώντας την ετερογένεια του όγκου. Ως αποτέλεσμα, αλλαγές στην έκφραση των miRNAs προτείνουν ένα χρήσιμο εργαλείο για έγκαιρη διάγνωση και πρόβλεψη της έκβασης των ασθενών με καρκίνο. Δεδομένων των παραπάνω, στόχος της παρούσας κλινική μελέτης αναμένεται να είναι η ανάλυση της έκφρασης και η κλινική αξιολόγηση κυκλοφορούντων miRNAs, που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση στο μικροπεριβάλλον του όγκου, στο πλάσμα ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ. Η ανοσοθεραπεία, δηλαδή η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων που δρουν ως αναστολείς, αποτελεί μια πρωτοποριακή θεραπευτική προσέγγιση της ογκολογίας, η οποία ενισχύει ανοσοποιητικό, με σκοπό τον περιορισμό της ανάπτυξης του όγκου, την παρεμπόδιση της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων σε άλλα σημεία του σώματος και την αύξηση της αποτελεσματικότητας του ίδιου του ανοσοποιητικού, μέσω στόχευσης των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (immune checkpoints), όπως είναι το CTLA-4 και ο άξονας PD1 / PD-11. Δεδομένα ερευνών έχουν συσχετίσει την καλύτερη επιβίωση με έντονη ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα σημεία ελέγχου χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό με σκοπό διατήρηση της ανοχής έναντι των εαυτών αντιγόνων, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση ώστε να προστατεύουν τους ιστούς κατά τη λοίμωξη και μπορούν να απορρυθμιστούν στον όγκο. Τα καρκινικά κύτταρα ιδιοποιούνται τους μηχανισμούς αυτούς ώστε να διαφεύγουν της αναγνώρισης από τα κυτταροτοξικά T- λεμφοκύτταρα. Κλινικοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά όπως το ιστορικό καπνίσματος, η γενική κατάσταση του ασθενούς, η παρουσίαση οδηγών μεταλλάξεων στον όγκο καθώς και το γενικό φορτίο μεταλλάξεων του όγκου, έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στους αναστολείς αυτούς, χωρίς όμως κάποιο από αυτά να εφαρμόζεται στην κλινική πράξη για την επιλογή των ασθενών. Κατά συνέπεια, η επιλογή αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική με σκοπό να αυξηθεί αποτελεσματικότητα της θεραπείας, άρα η εύρεση αξιόπιστων βιοδεικτών με βάση τους οποίους θα διαχωρίζονται οι ασθενείς που θα επωφεληθούν είναι αναγκαία. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα miRNAs ελέγχουν τη ρύθμιση μιας πληθώρας βιολογικών διαδικασιών και η απορρύθμιση της έκφρασης τους έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη όγκων. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η έκφραση των miRNAs απορρυθμίζεται περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αλλαγές μεταγραφικού ελέγχου, επιγενετικές αλλαγές και αλλαγές στο μηχανισμό της βιογένεσης των miRNAs. Οι Hanahan και Weinberg πρότειναν ότι τα γεγονότα που οδηγούν στον καρκίνο αποτελούνται από 6 βιολογικές ιδιότητες ορόσημα, οι οποίες αποκτώνται κατά την ανάπτυξη του όγκου. Αυτές περιλαμβάνουν τη διατήρηση των σημάτων κυτταρικού πολλαπλασιασμού (sustaining proliferative signaling), τη διαφυγή από την καταστολή της ανάπτυξης (evading growth suppressors), την αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο (evading cell death), την ενεργοποίηση της αντιγραφικής αθανασίας (enabling replicative immortality), την ενεργοποίηση της μεταναστευτικής ικανότητας (activating invasion and metastasis) και τέλος την επαγωγή της αγγειογένεσης (inducing angiogenesis). Η απορρύθμιση των miRNAs στον καρκίνο θεωρείται ότι επηρεάζει ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω μονοπάτια και ανάλογα με τη λειτουργία του mRNA στόχου, τα miRNAs χαρακτηρίζονται είτε ως ογκογόνα (oncogenes), είτε ως ογκοκατασταλτικά (tumor suppressors). Ανάμεσα στα γεγονότα που οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου περιλαμβάνεται και η αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση (anticancer immune response). τελευταία χρόνια αυξημένο ενδιαφέρον έχει συγκεντρωθεί στην αποσαφήνιση του ρόλου των miRNAs στη ρύθμιση των αντικαρκινικών ανοσολογικών αποκρίσεων και πως αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των καρκινικών κυττάρων προκαλούν τόσο προ-ογκογονικές, όσο και αντι-ογκογονικές επιδράσεις, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά την πορεία της εξέλιξης του όγκου. Τα miRNAs εμπλέκονται στη μεσολάβηση και ρύθμιση των διάφορων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης ελέγχουν και μηχανισμούς που αφορούν στις ανοσοολογικές αποκρίσεις. Αναφέρεται ότι τα miRNAs ελέγχουν τη διαφοροποίηση, ενεργοποίηση και δραστική λειτουργία των κυττάρων της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης, οι οποίες επηρεάζουν την πρόοδο του όγκου. Πιο συγκεκριμένα, στην έμφυτη ανοσία τα miRNAs ελέγχουν την ενεργοποίηση και πόλωση των μακροφάγων (Mφ) προς M1 ή M2 φαινότυπο, προωθώντας ή καταστέλλοντας την αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση, αντίστοιχα, ενώ συμμετέχουν και στον έλεγχο της ωρίμανσης και δραστηριότητας των κυττάρων φυσικών φονέων (NK cells). Η ρύθμιση της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης από τα miRNAs αφορά κυρίως στη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των διαφορετικών T κυτταρικών πληθυσμών, T βοηθητικά CD4⁺, T κυτταροτοξικά CD8⁺, T ρυθμιστικά Tregs. Σχετικά με τα σημεία ελέγχου, τα miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση των PD-1 και PD-L1 και κατά συνέπεια τις διάφορες λειτουργίες κυτταρικών πληθυσμών. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου μια πληθώρα παραγόντων συμβάλλουν στη δημιουργία και διατήρηση ενός ανοσοκατεσταλμένου φαινοτύπου, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής συγκέντρωσης ανοσορρυθμιστικών κυττάρων, όπως είναι για παράδειγμα τα κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs), τα T ρυθμιστικά Tregs και τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (TAMs). Στο μικροπεριβάλλον, τα miRNAs παίζουν καίριο ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου, καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι διαμορφώνουν την ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου, ρυθμίζοντας στρατολόγηση, την ενεργοποίηση και τις δραστικές λειτουργίες των διάφορων τύπων των ανοσοκυττάρων.

Αλληλεπίδραση των ανοσοκυττάρων και των miRNAs στο μικροπεριβάλλον του όγκου

Στην παρούσα κλινική μελέτη θα ελεγχθούν miRNAs που ρυθμίζουν την ανοσολογική απάντηση στον ΜΚΚΠ. Τα miRNAs που θα επιλεγούν αφορούν σε αυτά που ρυθμίζουν τα σημεία ελέγχου κλασική οδό βιογένεσης (mitrons) στον ΜΚΚΠ. Αυτά τα miRNAs, επειδή συνήθως βρίσκονται εντός εσωνίων γονιδίων που εκφράζονται, εκμεταλλεύονται το μηχανισμό ωρίμανσης του γονιδίου (μάτισμα), ξεπερνώντας με τον τρόπο αυτό την ωρίμανση του πρώτου σταδίου που διαμεσολαβείται από το ένζυμο Drosha. Στο κυτταρόπλασμα, το πρόδρομο miRNA επεξεργάζεται περαιτέρω από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο RLC (RISC loading complex), το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη Dicer, που έχει δράση Νάσης τύπου III, και από πρωτεΐνες που προσδένουν δίκλωνο RNA, όπως είναι η TRAP (Tar RNA binding protein), και από την πρωτεΐνη αργοναΐτη-2 (Ago-2). Η Dicer απομακρύνει από το μόριο τη δομή της θηλιάς, το miRNA πλέον έχει δομή δίκλωνου μορίου, μήκους περίπου 22 ζευγών βάσεων, ενώ στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας υπάρχουν από 2 νουκλεοτίδια που προεξέχουν. Η μία εκ των δύο αλυσίδων που θα αποτελέσει το ώριμο miRNA ονομάζεται οδηγός αλυσίδα (guide strand) και η συμπληρωματική αναφέρεται ως συνοδός

αλυσίδα (passenger strand) και συμβολίζεται miRNA". Όταν ολοκληρωθεί η ωρίμανση του miRNA, η οδηγός αλυσίδα προσδένεται στην Ago-2 για να σχηματίσει το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) και η συνοδός αλυσίδα αποδομείται. Το σύμπλεγμα miRNA-Ago καθοδηγεί το σύμπλοκο RISC. Το miRNA συνδέεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) των mRNA στόχων με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων (base pairing), ενώ η πρωτεΐνη-αργοναύτης λειτουργεί ως τελεστής στρατολογώντας και άλλες πρωτεΐνες, προκαλώντας βράχυνση των πολύ (A) ουρών των mRNAs (αποαδενυλίωση), καταστέλλοντας τη μετάφραση και αποσταθεροποιώντας το μόριο. Δεδομένου ότι η αλληλουχία αναγνώρισης είναι πολύ μικρή, σημειώνεται ότι κάθε miRNA μπορεί στοχεύει πολλά mRNAs που αποτελούν μετάγραφα διαφορετικών γονιδίων, ενώ ένας τύπος mRNA μπορεί να αποτελεί στόχο διαφορετικών μορίων miRNAs 1248-251). Η αναγνώριση των mRNA στόχων εξαρτάται από μια αλληλουχία στο miRNA που βρίσκεται στο 5' άκρο και ονομάζεται «σπόρος» (seed) και εκτείνεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων. Καθοδικά της αλληλουχίας-σπόρου, τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στη θέση 8 και στις θέσεις 13-16 είναι επίσης πρωτεύουσας σημασίας προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύζευξη μέσω της συμπληρωματικότητας των βάσεων. Η μερική ή απόλυτη συμπληρωματικότητα μεταξύ των miRNAs και των mRNA-στόχων οδηγεί σε καταστολή της μετάφρασης ή σε αποδόμηση του mRNA, αντίστοιχα.

Ο Ρόλος των microRNAs στον Καρκίνο του Πνεύμονα

Το 2004, οι Takamizawa et al., συσχέτισαν ισχυρά την έκφραση των miRNAs με την καρκινογένεση στον πνεύμονα. Στους καρκινικούς ιστούς και κύτταρα του πνεύμονα, τα miRNAs παρουσιάζουν ένα αλλοιωμένο πρότυπο έκφρασης σε σχέση με τον υγιή ιστό. Στον καρκίνο του πνεύμονα τα miRNAs μπορεί να έχουν ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική δράση και μπορούν να ρυθμίζουν την κυτταρική εισβολή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη βιωσιμότητα των κυττάρων, την επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (ΕΜΠ), τη μετάσταση, και την αντίσταση στη θεραπεία. Στην έρευνα αυτή στόχος αναμένεται να είναι η ανάλυση της έκφρασης των miRNAs σε καρκινικά κύτταρα και βιολογικά υλικά, όπως το αίμα, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ελάχιστα επεμβατική και ταυτόχρονα προσφέρει υψηλές δυνατότητες, ακόμη και για πρόωμη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα. Συνεπώς, τα miRNAs μπορεί να χρησιμεύσουν ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάγνωση, πρόγνωση ή θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Στο πλαίσιο αυτό θεωρείται ότι συμβάλλει η εύρεση μοριακών υπογραφών miRNAs, προσδιορίζοντας επακριβώς το επίπεδο έκφρασης πολλών miRNAs ταυτόχρονα. Σε μελέτες που συμμετείχαν ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα βρέθηκαν μοριακές υπογραφές miRNAs με εφαρμογή στη διάγνωση, οι οποίες παρέχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Παράλληλα, το μεγαλύτερο ποσοστό μελετών που χρησιμοποίησαν κυκλοφορούντα miRNAs που προσδιορίστηκαν από το πλάσμα ή τον ορό ασθενών, διαπίστωσαν ότι τα μόρια αυτά είναι αξιόπιστα για την πρόωμη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα. Επιπλέον, ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της αξιοποίησης των μορίων αυτών είναι ότι η αλλοίωση του φυσιολογικού προτύπου έκφρασης μπορεί να γίνει αντιληπτή οποιοδήποτε στάδιο, δηλαδή από την έναρξη της απορρύθμισης και καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης, προσφέροντας τη δυνατότητα παρατήρησης των δυναμικών αλλαγών σε πραγματικό χρόνο. Δεδομένου ότι ο καρκίνος του πνεύμονα προσδιορίζεται σε μια νόσος που εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και τα miRNAs που εκφράζονται σχετίζονται με τον τύπο του καρκίνου του πνεύμονα, πιστεύεται ότι τα miRNAs μπορούν να βοηθήσουν στην ταξινόμηση των υπότυπων της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει ότι το προφίλ έκφρασης για τα miRNAs είναι ειδικό για κάθε ιστολογικό υπότυπο καρκίνου και άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα miRNAs μπορούν να διακρίνουν μεταξύ των υπότυπων του καρκίνου του πνεύμονα. Τα miRNAs που θα εξετασθούν στην παρούσα κλινική μελέτη έχουν μελετηθεί επαρκώς στον MMKΠ και αφορούν σε αυτά που ρυθμίζουν τα σημεία ελέγχου (miR-34a, miR-200b, miR-200c), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων Tregs (miR-155, miR-146) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223), και τέλος, σε αυτά που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων προς M1 ή M2 φαινότυπο (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202).

Μοριακή βάση του MMKΠ

- Η μοριακή βάση του καρκίνου του πνεύμονα είναι ετερογενής και πολύπλοκη.
- Η καλύτερη κατανόηση στις μοριακές αλλαγές και στις λειτουργικές συνέπειες που αυτές προκαλούν, θα οδηγήσει στη βελτίωση τόσο της διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα, όσο και στην πρόγνωση αλλά και τη θεραπεία.

Οι βιολογικοί, μοριακοί και γενετικοί δείκτες που αναζητούνται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι οι εξής:

- ☐ Καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο (CEA)
- ☐ Καρκινικό αντιγόνο 15-3 (CA 15-3)
- ☐ Κυτταροκερατίνη 21-1 (CYFRA 21-1)
- ☐ Νευροενδοκρινική ενολάση (NSE)
- ☐ B-B Κρεατινική κινάση (B-B creatine kinase)
- ☐ Αντιγόνο πλακώδους καρκινώματος (SCC)
- ☐ Ιστικό πολυπεπτιδικό αντιγόνο (TPA)

- ☐ Ειδικό Ιστικό Πολυπεπτιδικό Αντιγόνο (TPS)
- ☐ Υποδοχείς ορμονικών υποδοχέων στεροειδικών ορμονών
- ☐ Ογκογονίδια, ογκοπρωτεΐνες, ογκοκατασταλτικά γονίδια
- ☐ Αυξητικοί παράγοντες του όγκου
- ☐ Προσδιορισμός τελομεράσης

Μεταλλάξεις στον καρκίνο του πνεύμονα

• Τα καρκινογόνα που δρουν στα κύτταρα του αναπνευστικού επιθηλίου προκαλούν μεταλλάξεις στα γονίδια που ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη με δύο τρόπους: – Ενεργοποίηση γονιδίων που αυξάνουν την κυτταρική ανάπτυξη (αυξητικοί παράγοντες **και** πρωτο-ογκογονίδια). – Απενεργοποίηση των γονιδίων καταστολής του όγκου.

• Κλινικά έκδηλοι καρκίνοι του πνεύμονα συνήθως έχουν ήδη συσσωρεύσει 10-20 διαφορετικές μεταλλάξεις τόσο σε πρωτο-ογκογονίδια όσο **και** σε ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Μεταλλάξεις σε γονίδια που αυξάνουν την κυτταρική ανάπτυξη

• Η καρκινογένεση σχετίζεται με την ενεργοποίηση γονιδίων που αυξάνουν την κυτταρική ανάπτυξη, όπως: – KRAS – EGFR – BRAF – HER2 – PI3K / AKT / mTOR – ROS1

KRAS

- Ανήκει στην οικογένεια RAS (KRAS, NRAS και HRAS στους ανθρώπους).
- Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη G, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της μεταγωγής του σήματος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και επιβίωση.
- Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες Ras είναι ανενεργές σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία.
- Όταν ενεργοποιηθούν λόγω αυξητικών παραγόντων, ενεργοποιούν με τη σειρά τους πολλά μονοπάτια, όπως το RAS / RAF / MEK / MAPK και το PI3 K[PI3K / AKT / mTOR].
- Οι KRAS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος που έχει προκληθεί από πολλούς αυξητικούς παράγοντες, όπως ο EGFR καθώς και στην ενεργοποίηση πρωτεϊνών που δεν απαιτούν την ύπαρξη αυξητικών παραγόντων για τη μεταγωγή του σήματος.

Μεταλλάξεις του KRAS

- Μεταλλάξεις στο γονίδιο του KRAS οδηγούν στη δημιουργία παθολογικών πρωτεϊνών Ras, οι οποίες δεν αδρανοποιούνται, με αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένη μεταγωγή σήματος που εμπλέκεται στην αύξηση του κυττάρου.
- Μεταλλάξεις στο KRAS ογκογονίδιο είναι οι συχνότερα ευρισκόμενες μεταλλάξεις στο αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα που ανιχνεύονται σε ποσοστό 25%-40% όλων των περιπτώσεων. – Οι μεταλλάξεις φαίνεται να συνδέονται στενά με το κάπνισμα. – Πολύ σπανιότερες είναι οι μεταλλάξεις σε HRAS και NRAS. – Οι διαφορές στην επικράτηση των μεταλλάξεων του KRAS στον καρκίνο του πνεύμονα φαίνεται πως σχετίζονται με τις διαφορετικές ομάδες πληθυσμού, καθώς οι μεταλλάξεις του KRAS είναι συχνότερες σε Ευρωπαίους ασθενείς σε σχέση με Ασιάτες, ενώ είναι πιο συχνό σε άνδρες και σε καπνιστές. – Σε ασθενείς με αδеноκαρκίνωμα που είναι μη-καπνιστές, μεταλλάξεις του KRAS ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό 0-15% όλων των περιπτώσεων. – Οι μεταλλάξεις του KRAS είναι πολύ σπάνιες έως και ανύπαρκτες σε περιπτώσεις πλακώδους ή μικροκυτταρικού καρκινώματος.
- Οι μεταλλάξεις στο KRAS συναντώνται στα αρχικά στάδια του αδеноκαρκινώματος, ιδιαίτερα στην άτυπη κυψελιδική υπερπλασία που θεωρείται προκακοήθης μορφή.
- Έτσι, η ανάδειξη των μεταλλάξεων αυτών θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη στην πρόιμη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα.
- Η μεγάλη συχνότητα της ανεύρεσης μεταλλάξεων του KRAS το κάνει ιδανικό θεραπευτικό στόχο, αλλά δυστυχώς κλινικές μελέτες που στόχευαν σε αυτό δεν είχαν τα αναμενόμενα επιθυμητά αποτελέσματα.

EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)

- Μεταλλάξεις στο γονίδιο του EGFR εμπλέκονται στην παθογένεια πολλών καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου και του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος.
- Ο EGFR είναι μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη με δράση τυροσινικής κινάσης.
- Όταν συνδεθεί ο EGF με τον EGFR, τότε προκαλείται ομο- ή ετερο διμερισμός (με άλλα μέλη της οικογένειας EGFR) που οδηγεί στην ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης.
- Η μεταγωγή σήματος που προκαλείται από τον EGFR προκύπτει από τα μονοπάτια PI3K / AKT / mTOR, RAS / RAF / MAPK και JAK / STAT.
- Ο EGFR εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών ογκογενετικών λειτουργιών, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση, η νεοαγγείωση καθώς και η μετάσταση.

Μεταλλάξεις του EGFR

- Μεταλλάξεις στο γονίδιο του EGFR οδηγούν σε συνεχή ενεργοποίηση της δράσης της τυροσινικής κινάσης, είτε λόγω αυξημένης έκφρασης της πρωτεΐνης είτε λόγω αυξημένης αντιγραφής του γονιδίου.
- Οι μεταλλάξεις του EGFR έχουν ανιχνευθεί σε 10%-15% σε Ευρωπαίους ασθενείς, ενώ το ποσοστό αυτό γίνεται 30%-40% όταν αναφερόμαστε σε Ασιάτες ασθενείς. – Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στους διαφορετικούς πληθυσμούς, μπορεί όμως να ευθύνεται **και** η διαφορετικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάδειξή τους στις διάφορες μελέτες.
- Στον καρκίνο του πνεύμονα, σχεδόν όλες οι μεταλλάξεις του EGFR εντοπίζονται στο αδενοκαρκίνωμα, αν **και** μερικές μπορεί να βρεθούν **και** σε περιπτώσεις αδενοπλακώδους καρκινώματος.
- Οι μεταλλάξεις του EGFR είναι πιο συχνές σε ασθενείς που είναι: – γυναίκες, – μη-καπνιστές, – νεότεροι σε ηλικία.
- Η υπερέκφραση του EGFR στους πνευμονικούς καρκίνους αποτελεί τη βάση για θεραπευτικές στρατηγικές με σκοπό τη διακοπή της σηματοδοτικής οδού του, με χρήση αντισωμάτων που κατευθύνονται έναντι του EGFR.

BRAF

- Το γονίδιο BRAF κωδικοποιεί μία πρωτεϊνική κινάση που συνεργάζεται με το μονοπάτι που ενεργοποιείται από την KRAS, ενώ εκείνη με τη σειρά της ενεργοποιεί το μονοπάτι μεταγωγής σήματος MAPK που εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επιβίωσης.
- Μόλις ενεργοποιηθεί, η πρωτεΐνη BRAF φωσφορυλιώνει τους διαβιβαστές MEK1 και MEK2, οι οποίοι στη συνέχεια ενεργοποιούν τους ERK1 και ERK2 που εμπλέκονται στη ρύθμιση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αύξηση, όπως είναι η c-JUN και η ELK1.
- Μεταλλάξεις του BRAF οδηγούν σε αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης, με αποτέλεσμα συνεχόμενη σηματοδότηση αύξησης του κυττάρου.
- Οι μεταλλάξεις του BRAF είναι συχνές στο μελάνωμα.
- Στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα, ανιχνεύονται σε ποσοστό περίπου 3%.
- Οι μεταλλάξεις του γονιδίου BRAF, όταν συμβούν, ανιχνεύονται σχεδόν πάντα στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα.
- Παρόλο που δεν είναι συχνές, οι μεταλλάξεις αυτές αποτελούν ένα σημαντικό θεραπευτικό στόχο, λόγω της διαθεσιμότητας παραγόντων που χρησιμοποιούνται ήδη για τη θεραπεία του μελανώματος.
- Η δοκιμή για τη θεραπεία του μη-μικροκυτταρικού καρκινώματος είναι ακόμα σε στάδιο κλινικών μελετών.

HER2

- Το γονίδιο του ανθρώπινου υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (HER2 / ERBB2) κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που βρίσκεται στη μεμβράνη με δράση τυροσινικής κινάσης και η οποία ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων ERBB, συμπεριλαμβανομένου και του EGFR.
- Σε αντίθεση με τους άλλους υποδοχείς, ο υποδοχέας αυτός ενεργοποιείται από τη σύνδεσή του με άλλους υποδοχείς της ίδιας οικογένειας.
- Η ενεργοποίησή του οδηγεί σε μεταγωγή του σήματος μέσω διάφορων μονοπατιών, όπως PI3, MAPK και JAK / STAT.
- Η ενεργοποίηση του HER2 συμβαίνει σε λίγες περιπτώσεις στον καρκίνο του πνεύμονα, με υπερέκφρασή του σε ποσοστό περίπου 20% όλων των περιπτώσεων μη μικροκυτταρικού καρκινώματος.
- Οι μεταλλάξεις προκύπτουν συχνότερα στο αδενοκαρκίνωμα και ,σε μερικές μελέτες, έχουν συσχετισθεί με το γυναικείο φύλο, την Ασιατική καταγωγή και την απουσία καπνίσματος.

PI3K / AKT / mTOR

- Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος PI3K / AKT / mTOR παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της επιβίωσης, διαφοροποίησης και κινητικότητας.
- Εναλλαγές στο μονοπάτι αυτό προκύπτουν και στο μη μικροκυτταρικό και στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα.
- Το μονοπάτι ενεργοποιείται από διάφορες ενεργοποιημένες τυροσινικές κινάσες, συμπεριλαμβανομένου του EGFR, HER2, insulin-like growth factor receptor κ.λπ.
- Ενεργοποιημένες τυροσινικές κινάσες συγκεντρώνουν στην κυτταρική μεμβράνη PI3K, όπου φωσφορυλιώνουν το PI2 σε PI3.
- Το PI3, με τη σειρά του, "στρατολογεί" την κινάση σερίνης / θρεονίνης AKT στη μεμβράνη, όπου φωσφορυλιώνεται από την κινάση PI3 και mTOR (κινάση σερίνης / θρεονίνης).
- Η ενεργοποιημένη AKT δρα σε πολλούς στόχους, με απώτερο σκοπό τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση του κυττάρου.
- Το μονοπάτι αυτό συχνά απορυθμίζεται σε πολλούς όγκους, συμπεριλαμβανομένου και του 50%-70% των μη μικροκυτταρικών καρκινωμάτων.
- Η ανώμαλη ενεργοποίησή του προκύπτει από διάφορους μηχανισμούς, όπως ενεργές μεταλλάξεις του EGFR, KRAS, PI3K, AKT ή λόγω απώλειας της αρνητικής ρύθμισης από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN.

ROS1

- Το γονίδιο ROS1 είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6q22 και που κωδικοποιεί μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που έχει υψηλή ομολογία με την AKT.
- Η ενεργοποίησή του ROS1 οδηγεί στη μεταγωγή του σήματος από τα μονοπάτια PI3K / AKT / mTOR, STAT3 και RAS / MAPK / ERK.

•Οι μεταλλάξεις του ROS1 φαίνεται να παρουσιάζονται συχνότερα σε ασθενείς που είναι νέοι, ποτέ-καπνιστές και Ασιατικής καταγωγής.

Μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια

•Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης. •Η απώλεια της λειτουργίας ογκοκατασταλτικού γονιδίου αποτελεί σημαντικό μηχανισμό της καρκινογένεσης και απαιτεί την απενεργοποίηση και των δύο αλληλόμορφων του γονιδίου.

Μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια

•Στον καρκίνο του πνεύμονα, τα εμπλεκόμενα ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορεί να είναι τα εξής: – TP53, – RB1, – PTEN.

TP53

•Το γονίδιο TP53 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17q13 και κωδικοποιεί μία πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη 53 kDa, η οποία αναγνωρίζει και δεσμεύει περιοχές βλάβης του DNA.

•Δρα ως μεταγραφικός παράγοντας, ενεργοποιώντας την έκφραση άλλων γονιδίων και είναι υπεύθυνο για τη καθήλωση στη G1 ή / και την απόπτωση των κυττάρων που έχουν υποστεί καταστροφή του DNA.

•Η απενεργοποίηση του TP53 από μετάλλαξη είναι μία από τις πιο σημαντικές ανωμαλίες που πραγματοποιούνται στον καρκίνο του πνεύμονα. – Επιτρέπει στα κύτταρα με ανώμαλο DNA να διαφεύγουν τον έλεγχο και να συνεχίζουν τον πολλαπλασιασμό.

•Συμβαίνει στο 90% του μικροκυτταρικού καρκινώματος και στο 65% περίπου του μη-μικροκυτταρικού καρκινώματος. – Στο μη-μικροκυτταρικό, η απώλεια της λειτουργίας του TP53 έχει συσχετισθεί με ιστορικό καπνίσματος ή παθητικής έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου.

•Η μετάλλαξη του TP53 συμβαίνει νωρίς στις προδιθητικές αλλοιώσεις και είναι ένας από τους καλύτερους τρόπους να προβλέπεται η εξέλιξη σε διηθητικές αλλοιώσεις.

p16INK4a-cyclin D1-CDK4-RB μονοπάτι

•Το μονοπάτι p16INK4a / RB ρυθμίζει τη μετάβαση στον κυτταρικό κύκλο από τη φάση G1 στην S.

•Το RB αποτελεί ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί την πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη RB, η οποία ελέγχει το πέρασμα του κυττάρου από τη φάση G1 στην S, μέσω δέσμευσης του παράγοντα E2F1. – Η φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη RB απελευθερώνει τον E2F1, οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες της φάσης S και τη μετάβαση από τη G1 στην S.

•Το γονίδιο RB1 ήταν το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που περιγράφηκε στον καρκίνο του πνεύμονα.

•Είναι ανενεργό σε ποσοστό 90% του μικροκυτταρικού καρκινώματος, αλλά μόνο στο 10%-15% σε περιπτώσεις μη μικροκυτταρικού καρκινώματος.

•Στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα, το μονοπάτι συνήθως απορυθμίζεται εξαιτίας ανωμαλιών της κυκλίνης D1, του CDK4 και του CDKN2A. p16INK4a-cyclin D1-CDK4-RB μονοπάτι

•Το p16INK4a αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης RB που εξαρτάται από την κυκλίνη D1, με αποτέλεσμα την αποφυγή της μετάβασης του κυττάρου από τη φάση G1 στην S.

•Το p16INK4a είναι ανενεργό στο 80% των μη-μικροκυτταρικών καρκινωμάτων και ειδικά στο 72% των περιπτώσεων πλακώδους καρκινώματος.

•Επιπλέον, υπάρχει υπερέκφραση της κυκλίνης D1 στο 40% των μη-μικροκυτταρικών καρκινωμάτων.

•Η κυκλίνη D1 είναι το προϊόν ενός ογκογονιδίου, η υπερέκφραση του οποίου επιτρέπει τη διατάραξη της καθήλωσης του κυττάρου στην G1, λόγω φωσφορυλίωσης της RB.

•Η υπερέκφραση αυτή παρατηρείται στο 43% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα.

Διήθηση και μετάσταση όγκων

•Η απόκτηση της ικανότητας διήθησης μετάστασης είναι απαραίτητη για την περαιτέρω ανάπτυξη των όγκων.

•Οι μεταλλοπρωτεάσες είναι ένζυμα που αποδομούν τη θεμέλια ουσία και εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα για να προάγουν τη μετανάστευσή τους. – Μεταλλοπρωτεάση 2 και 9, – Στρομελυσίνη 3.

•Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων παίζει η αγγειογένεση, η οποία έχει συσχετισθεί τόσο με το στάδιο του καρκίνου όσο και με την πρόγνωση. – Κυριότεροι αγγειογενετικοί παράγοντες: Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), Βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF).

Η σταδιοποίηση του καρκίνου είναι ένας τρόπος με τον οποίο οι γιατροί περιγράφουν το πόσο προχωρημένος είναι ένας καρκίνος. Τα στάδια του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι 4 συνολικά και ονομάζονται ως εξής: Στάδιο 1(I), 2(II), 3(III) και 4(IV). Κάποιες φορές οι σταδιοποίησης περιλαμβάνει παγίδες, δηλαδή μπορεί ο γιατρός να πιστεύει ότι έχετε στάδιο II πριν το χειρουργείο, αλλά μετά την επέμβαση να αποδειχθεί ότι τελικά το στάδιο ήταν για παράδειγμα III.

Κάποιες από τις κύριες διαφορές των σταδίων περιλαμβάνουν τις παρακάτω:

Στο στάδιο 1, ο καρκίνος του πνεύμονα αφορά είτε στον αριστερό είτε στο δεξιό πνεύμονα. Δεν έχει επεκταθεί πέραν των πνευμόνων ή σε κάποιους λεμφαδένες. Ο καρκίνος του πνεύμονα σταδίου 1 έχει μικρό μέγεθος.

Στο στάδιο 2, ο καρκίνος έχει επεκταθεί σε άλλα μέρη, π.χ. στους λεμφαδένες των πνευμόνων. Μπορεί να έχει διάφορα μεγέθη και συνήθως μεγαλύτερα του σταδίου 1.

Στο στάδιο 3, ο καρκίνος μπορεί να είναι μεγάλος ή / και να έχει επεκταθεί στους λεμφαδένες της μέσης γραμμής του θώρακα, μεταξύ του δεξιού και αριστερού πνεύμονα.

Στο στάδιο 4, ο καρκίνος έχει επεκταθεί και στον άλλο πνεύμονα, ή σε άλλα μέρη του σώματος, όπως για παράδειγμα ο εγκέφαλος και τα οστά. Μπορεί επίσης σε αυτό το στάδιο να συνοδεύεται από υπεζωκοτική συλλογή ή περικαρδιακή συλλογή (υγρό γύρω από τους πνεύμονες ή την καρδιά αντιστοίχως). Η θεραπεία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σταδιοποίηση του Μη Μικροκυτταρικού Καρκίνου Πνεύμονα. Ο MMKP μπορεί να προκύψει σε οποιοδήποτε σημείο του ιστού που επενδύει τις αεροφόρους οδούς στον πνεύμονα. Όποτε είναι δυνατόν, ο MMKP διαιρείται περαιτέρω σε πλακώδη (καρκίνος εκ πλακωδών κυττάρων) και μη-πλακώδη (κυρίως αδenoκαρκίνωμα) καρκίνο με βάση τα ιδιαίτερα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά* που έχουν σημαντικές θεραπευτικές συνέπειες. Αυτή η κλινική μελέτη επικεντρώνεται αποκλειστικά στο MMKP, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 80 έως 85% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα.

Στις ανεπτυγμένες περιοχές, όπως στη Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο δεύτερος και ο τρίτος πιο συχνά εμφανιζόμενος καρκίνος στους άνδρες και τις γυναίκες, αντίστοιχα. Επίσης, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τη πιο συχνή αιτία θανάτων που σχετίζονται με καρκίνο και στα δύο φύλα σε όλο τον κόσμο. Στην Ευρώπη, περίπου 291.000 άνδρες και 100.000 γυναίκες διαγνώστηκαν με καρκίνο του πνεύμονα το 2008. Κάθε χρόνο, 93 στα 100.000 άτομα διαγιγνώσκονται με καρκίνο του πνεύμονα. Υπάρχουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των διαφόρων χωρών στην Ευρώπη, οι οποίες αντανακλούν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα κατά τη διάρκεια τη ζωής ενός ατόμου. Μεταξύ της γέννησης και της ηλικίας των 75 ετών, λιγότεροι από 3 στους 100 Σουηδούς άνδρες και περίπου 4 στους 100 Πορτογάλους άνδρες θα αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα, ποσοστά τα οποία είναι τα χαμηλότερα στην Ευρώπη. Η εκτίμηση αυτή ανέρχεται σε πάνω από τους 9 σε κάθε 100 άνδρες στη Κροατία και 10 σε κάθε 100 άνδρες σε ορισμένες περιοχές της Πολωνίας. Οι διακυμάνσεις αυτές δεν παρατηρούνται μόνο μεταξύ των χωρών αλλά και εντός των χωρών. Στις γυναίκες, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα είναι μικρότερος και ποικίλει μεταξύ των χωρών και εντός των χωρών. Οι βόρειες χώρες έχουν τα υψηλότερα ποσοστά (έως 4 σε κάθε 100 γυναίκες στην Ισλανδία, τη Δανία και το Ηνωμένο Βασίλειο), ενώ τα χαμηλότερα ποσοστά παρατηρούνται στην Ισπανία (με λιγότερο από 1 σε κάθε 100 γυναίκες). Οι διακυμάνσεις αυτές εξηγούνται κυρίως από τις συνήθειες καπνίσματος πριν από δεκαετίες. Ως εκ τούτου, στη πλειονότητα των ευρωπαϊκών χωρών η συχνότητα συνεχίζει να αυξάνεται στις γυναίκες και να μειώνεται στους άνδρες. Η τάση αυτή τείνει να είναι πιο αργή στη Νότια και Ανατολική Ευρώπη, από ό, τι στις βόρειες περιοχές. Οι διακυμάνσεις αυτές αντανακλούν τις διαφορετικές συνήθειες καπνίσματος μεταξύ των περιοχών. Ο MMKP αντιπροσωπεύει το 80 με 85% όλων των καρκίνων του πνεύμονα. Περίπου το 90% των καρκίνων του πνεύμονα στους άνδρες και το 80% μεταξύ των γυναικών σχετίζεται με το κάπνισμα. Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος του πνεύμονα είναι διαδικασία πολλαπλών σταδίων, στην οποία ενέχονται γενετικοί και επιγενετικοί μηχανισμοί. Ενεργοποίηση ογκογονιδίων συμβαίνει σε όλους τους βρογχοπνευμονικούς καρκίνους με αποτέλεσμα την αύξηση των μιτοχόνδριων σημάτων. Στον καρκίνο του πνεύμονα τα πιο συχνά ενεργοποιημένα ογκογονίδια είναι τα EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERbB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, και BCL2. Επίσης, η απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι ιδιαίτερα σημαντική στην πνευμονική καρκινογένεση και είναι συνήθως αποτέλεσμα απενεργοποίησης και των δυο αλληλόμορφων. Συχνά απενεργοποιημένα ογκοκατασταλτικά γονίδια στον καρκίνο του πνεύμονα είναι TP53, RB1, STK11, CDKN2A, FHIT και PTEN. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την μεθυλίωση του DNA, την τροποποίηση των ιστονών και τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω των microRNAs. Τα microRNAs είναι μικρά, μη κωδικοποιούντα μόρια RNA που εμπλέκονται στην αρνητική μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Μελέτες έχουν αποδείξει το ρόλο των miRNAs στην φυσιολογική πνευμονική ανάπτυξη και ομοιόσταση αλλά και τον ενεργό ρόλο τους στην παθογένεια πνευμονικών νοσημάτων όπως είναι ο καρκίνος του πνεύμονα. Η δημιουργία ωρίμων, λειτουργικών microRNAs απαιτεί τη συντονισμένη δράση μιας ομάδας πρωτεϊνών που στο σύνολο τους απαρτίζουν το μηχανισμό ρύθμισης των microRNA (microRNA machinery). Ο μηχανισμός ελέγχου των microRNA ρυθμίζει μέσω των παραγομένων microRNAs την έκφραση πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ογκογονιδίων. Κύρια συστατικά του μηχανισμού ρύθμισης των microRNA είναι οι ριβονουκλεάσες Drosha, Dicer και AGO2. Τα αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης στο PD θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την αντίσταση στο osimertinib ενώ οι διαφορές μεταξύ ctDNA και CTCs υποδεικνύουν τη σημασία της συνδυαστικής τους ανάλυσης. Η ανοσοθεραπεία παρουσιάζεται ως μία πρόσφατη, στην ιατρική, θεραπευτική προσέγγιση σε ποικίλους τύπους καρκινώματος όπως επίσης και στον καρκίνο του πνεύμονα. Σήμερα, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μορφές ανοσοθεραπείας, οι οποίες είναι ευρέως γνωστές και διαθέσιμες στην κλινική πράξη. Εκτεταμένη αναφορά γίνεται στους αναστολείς ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου και ειδικότερα στο μονοπάτι PD-1 / PD-L1. Τέλος, αναλύεται η δομή και οι μοριακοί μηχανισμοί των μορίων αυτών, καθώς και ο ρόλος τους στα υγιή και στα καρκινικά κύτταρα. Ακολούθως, αναδεικνύεται η χρησιμότητα της αναστολής των μορίων PD-1 / PD-L1, μέσω της φαρμακευτικής παρεμπόδισης του μονοπατιού αυτού. Η μελέτη και η αξιολόγηση των κλινικών δοκιμών, σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, με διάφορους φαρμακευτικούς αναστολείς, αποκαλύπτει πληθώρα ευεργετικών αποτελεσμάτων κάτω από συγκεκριμένες προϋποθέσεις. Για αυτό το λόγο η ανάπτυξη προγνωστικών βιοδεικτών κρίνεται επιτακτική ανάγκη, προσδοκώντας μία πιο στοχευμένη και ελεγχόμενη εφαρμογή της ανοσοθεραπείας. Τέλος, υπογραμμίζεται η σημασία της χρήσης συνδυασμού θεραπευτικών σχημάτων τόσο μεταξύ διαφόρων μορφών ανοσοθεραπείας όσο και μεταξύ της ανοσοθεραπείας με άλλες μεθόδους θεραπείας, λόγω της αυξημένης ανταπόκρισης και βελτίωσης των ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα. Έτσι, οι συνδυαστικές θεραπείες αποτελούν γνώμονα εξέλιξης των στρατηγικών αντιμετώπισης του καρκίνου και των μελλοντικών προοπτικών. Η χρήση βιολογικών παραγόντων που μιμούνται ορισμένα από τα φυσικά σήματα που χρησιμοποιούν τα κύτταρα του σώματος για τον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου ονομάζεται ανοσοθεραπεία. Αυτοί οι φυσικοί βιολογικοί παράγοντες μπορούν τώρα να παραχθούν στο εργαστήριο και περιλαμβάνουν, τις ιντερφερόνες, τις ιντερλευκίνες, τις κυτοκίνες, τους ενδογενείς αγγειοαναστολείς και τα αντιγόνα (Sudhakar,

n.d.). Ο τομέας της ανοσοθεραπείας στην αντιμετώπιση του καρκίνου έχει γνωρίσει εναλλασσόμενες περιόδους ευδοκίας και αποτυχίας στην ανάπτυξη και εφαρμογή στρατηγικών θεραπείας για τον καρκίνο. Στα τέλη του 19ου αιώνα, ο William Coley αντιμετώπιζε ασθενείς με καρκίνο με τοπική ένεση με βακτηριακές τοξίνες, οι οποίες προκάλεσαν αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις σε ένα πλήθος ασθενών. Στη δεκαετία του 1960, οι Thomas και Burnet διατύπωσαν τη θεωρία της ανοσολογικής επιτήρησης του καρκίνου, όπου το ανοσοποιητικό σύστημα αντιμετωπίζει επιτυχώς τα κακοήγη κύτταρα με ειδικό τρόπο, πιθανότατα μέσω της αναγνώρισης των ειδικών αντιγονικών μορίων που προέρχονται από τον όγκο. Ακολούθησε η αποσαφήνιση της λειτουργίας των Τ λεμφοκυττάρων στις αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις που οδήγησαν στην κλινική χρησιμότητα του αυξητικού παράγοντα των Τ λεμφοκυττάρων, την ιντερλευκίνη-2 (IL-2). Η IL-2 πήρε έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκινώματος των νεφρικών κυττάρων το 1991 και για το μεταστατικό μελάνωμα, το 1998. Ωστόσο, οι θεραπείες με τη χρήση της IL-2 παρήγαγαν υψηλή τοξικότητα και απέδωσαν σχετικά μειωμένο ποσοστό απόκρισης, υπογραμμίζοντας την ανάγκη ανάπτυξης βελτιωμένων ανοσοθεραπευτικών στρατηγικών (van den Bulk et al., 2018). Η μετάβαση στην ένταξη της πιο στοχευμένης ανοσοθεραπείας έγινε με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του υβριδώματος, το 1975, στην οποία στηρίχθηκε η παραγωγή και ανάπτυξη των μονοκλωνικών αντισωμάτων. Αμέσως, δημιουργήθηκαν φαρμακευτικές θεραπείες που βασίζονται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Η πρώτη έγκριση του FDA λήφθηκε το 1997 για το rituximab, για τη θεραπεία του λεμφώματος από τα Β-κύτταρα. Το rituximab είναι ένα γενετικά τροποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει έναντι του αντιγόνου CD20 το οποίο εκφράζεται σε όλα τα Β κύτταρα. Προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο με κυτταροτοξικότητα που πυροδοτείται από τα αντισώματα, ενεργοποιεί το συμπλήρωμα και επιφέρει την άμεση επαγωγή της απόπτωσης (van den Bulk et al., 2018). Πιο πρόσφατα, αναπτύχθηκε ένα πλήθος ειδικών μορίων-αντισωμάτων που στοχεύουν τα κυτταρικά σημεία έλεγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. τα μόρια PD-1 / PD-L1 και CTLA-4) για την προώθηση της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων και τον παράλληλο έλεγχο του κακοήθους όγκου από το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτή η θεραπευτική στρατηγική έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική σε όγκους με υψηλό φορτίο μετάλλαξης, θέτοντας τα μεταλλαγμένα αντιγόνα του όγκου (νεοαντιγόνα) στο επίκεντρο, της ανοσοθεραπείας του καρκίνου (van den Bulk et al., 2018). Σήμερα, οι διάφορες μορφές ανοσοθεραπείας έναντι των νεοπλασματικών κακοηθειών στοχεύουν σε μηχανισμούς αποτροπής της διαφυγής του όγκου. Έτσι, χρησιμοποιούν τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος, για να ενεργοποιήσουν τις αντικαρκινικές ανοσοαποκρίσεις και να αποτρέψουν την ανοχή των καρκινικών κυττάρων (Kennedy & Salama, 2020). Η απόλυτη επιτυχημένη εφαρμογή των ανοσοθεραπευτικών μεθόδων πρέπει να καθορίζεται από την ικανότητα επίτευξης ισχυρών αποκρίσεων του ανοσοποιητικού συστήματος και της αυξημένης επιβίωσης των ασθενών. Τόσο στα αρχικά στάδια διάγνωσης της νόσου όσο και σε τελικού σταδίου καρκινώματα. Ωστόσο, πρέπει να αντιμετωπιστούν πολλές προκλήσεις για την επίτευξη αυτού του στόχου (Hegde & Chen, 2020). Οι βασικές προκλήσεις που καλείται να διαχειριστεί η επιστημονική κοινότητα είναι: η ανάπτυξη προκλινικών μοντέλων που βοηθούν στην κατανόηση της ανθρώπινης ανοσίας. Η αποσαφήνιση των κυρίαρχων λειτουργιών της ανοσίας του καρκίνου και η διαλεύκανση των ανοσολογικών μηχανισμών του όγκου. Η κατανόηση των μοριακών και κυτταρικών μονοπατιών της πρωτογενούς έναντι της δευτερογενούς ανοσολογικής διαφυγής. Η διευκρίνιση του οφέλους της ενδογενούς έναντι της συνθετικής ανοσίας και η αποτελεσματική – αποδοτική αξιολόγηση των συνδυασμών ανοσοθεραπείας έναντι του καρκίνου μέσα από κλινικές μελέτες πρώιμης φάσης. Ο πλήρης χαρακτηρισμός της επίδρασης των στεροειδών και των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου και στις αυτοάνοσες τοξικότητες. Η μεγιστοποίηση εξατομικευμένων και πιο ειδικών προσεγγίσεων στην ανοσοθεραπεία μέσω των πολύτιμων βιοδεικτών. Τέλος η βελτιστοποίηση της μακροπρόθεσμης επιβίωσης των ασθενών με συνδυαστικά σχήματα ανοσοθεραπείας (Hegde & Chen, 2020).

Τα δενδριτικά κύτταρα (DC)

Τα δενδριτικά κύτταρα (DC) περιγράφονται ως μια συλλογή κυττάρων του φυσικού ανοσοποιητικού που διεισδύουν στους όγκους και παρουσιάζουν αντιγόνα που προέρχονται από όγκους σε κύτταρα Τ μετά τη διαδικασία. Τα δενδριτικά κύτταρα περιγράφηκαν για πρώτη φορά από τον Ralph Steinman σχεδόν τριάντα χρόνια πριν, με την εύρεση ενός πληθυσμού κυττάρων δενδριτικού σχήματος στο σπλήνα. Λίγο αργότερα έγινε σαφές ότι δενδριτικά κύτταρα υπάρχουν σε όλους τους λεμφοειδείς και τους περισσότερους μη λεμφοειδείς ιστούς. Κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970, οι περισσότεροι ανοσολόγοι θεωρούσαν ότι τα μακροφάγα είναι ο κύριος τύπος ΑΠΚ στο ανοσοποιητικό σύστημα. Σε σύγκριση με τα δενδριτικά κύτταρα, τα μακροφάγα ήταν πιο άφθονα, πιο ομοιόμορφα κατανομημένα σε όλο το σώμα ενώ ήταν είναι γνωστό ότι έχουν ικανότητα παρουσίασης αντιγόνου (ΑΠΚ). Δεδομένου ότι τα δενδριτικά κύτταρα ήταν τόσο σπάνια, οι αρχικές μελέτες ήταν δύσκολες μέχρι το 1980 που έγινε ευρέως αποδεκτό ότι αποτελούν «επαγγελματικά-εξειδικευμένα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (ΑΠΚ)» (Wieder E., 2003). Το εμβόλιο με δενδριτικά κύτταρα παίζει ένα ζωτικό ρόλο στην προϋπόθεση της ανοσίας των κυττάρων Τ κατά των όγκων και αποτελεί έναν πρωταρχικό στόχο θεραπείας για την πλειονότητα της ανοσοθεραπείας του καρκίνου. Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η αναγνώριση και η καταπολέμηση των αντιγόνων με χυμικές και κυτταρικές ανοσοαποκρίσεις, με στόχο την εξάλειψη των ξένων ερεθισμάτων και την ανάπτυξη ειδικής μνήμης. Η ανάπτυξη ανοσοαπόκρισης έναντι ενός αντιγόνου έχει αξιοποιηθεί στο πλαίσιο των εμβολίων, τα οποία θα αποτελέσουν αντικείμενο ανάπτυξης για την πρόληψη ή βελτίωση των αποτελεσμάτων μελλοντικών παθογόνων μολύνσεων. Προκειμένου να αποφευχθεί η μολυσματικότητα, τα εμβόλια δεύτερης γενιάς κατασκευάστηκαν από καθορισμένα αντιγονικά πεπτίδια ή ανασυνδυασμένες υπομονάδες πρωτεϊνών, τα οποία όμως χρειάζονται ταυτόχρονη χορήγηση ανοσοενισχυτικού για την επαγωγή της ανοσοαπόκρισης. Η θεραπεία με δενδριτικά κύτταρα είναι ένα είδος ανοσοθεραπείας για ασθενείς με καρκίνο. Η θεραπεία με δενδριτικά κύτταρα (DCT) παίζει ένα ουσιαστικό ρόλο στην αρχή και τον έλεγχο της ανοσοθεραπείας κατά του καρκίνου. Περίπου 6.000 κύτταρα καρκίνου υποτίθεται ότι εμφανίζονται καθημερινά ακόμα και στο σώμα των υγιών ανθρώπων. Ωστόσο, ο καρκίνος δεν πλησιάζει όλους επειδή το ανοσοποιητικό μας σύστημα επιτίθεται στα κύτταρα του καρκίνου. Το 2011, ο Ralph Steinman κέρδισε το Βραβείο Nobel για την αποκάλυψη της θεραπευτικής δύναμης των δενδριτικών κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα. Η θεραπεία με δενδριτικά κύτταρα (DCV) είναι γνωστή ως μία από τις επαναστατικές μεθόδους για την καταπολέμηση του καρκίνου, αφού χρησιμοποιεί τους πόρους του οργανισμού μας για την αντίσταση στα κακοήγη κύτταρα. Η ανοσοθεραπεία με δενδριτικά κύτταρα είναι ασφαλής και μπορεί να προωθήσει ανοσοαντικαρκινικές αντιδράσεις και επίμονη επιβίωση ασθενών

με καρκίνο. Η θεραπεία με DC έχει χρησιμοποιηθεί στην ιατρική από το 2010. Πάνω από 4.500 άνθρωποι έχουν περάσει από αυτήν από τότε. Χρησιμοποιείται αποτελεσματικά στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, του προστάτη, του σαρκόματος, του μελανώματος, του γλίομα και άλλων καρκίνων. Ωστόσο, τα ανοσοεπιταχυντικά είναι υπεύθυνα για πολλές παρενέργειες και επιπλέον, λόγω του εκτεταμένου πολυμορφισμού των αντιγόνων ιστοσυμβατότητας, η επιλογή συγκεκριμένων μη λοιμωδών αντιγονικών επιτόπων μπορεί να μην είναι εξίσου αποτελεσματική για όλα τα άτομα. Για να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη ενός συστήματος που να επιτρέπει τη φυσική "φόρτωση" και παρουσίαση αντιγόνων *in vitro* και την περαιτέρω ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης *in vivo*. Μια τέτοια τεχνολογία οδηγεί σε εξατομικευμένα εμφυτεύσιμα εμφύσματα, όπου μακροφάγα εμβολιάζονται με το αντιγόνο με φυσικό τρόπο και αφού ενεργοποιηθούν, προσκολλώνται σε εμφυτεύσιμες επιφάνειες και είναι σε θέση να ενισχύσουν την έναρξη ανοσολογικής απόκρισης. Μια τέτοια προσέγγιση εξαλείφει τις παρενέργειες που οφείλονται στη μη ειδική διέγερση των ανοσοεπιταχυντικών, αφήνοντας το φυσικό μηχανισμό επιλογής "φόρτωσης" αντιγόνου στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα ώστε να επιλεγεί ο κατάλληλος αντιγονικός επίτοπος για κάθε άτομο. Οι εμφυτεύσιμες επιφάνειες θα αποτελέσουν από ικρίσματα πυριτίου με τρισδιάστατη μικρο- και νανο- υφή και κατασκευάζονται με τη χρήση λέιζερ υπερταχέων παλμών. Η εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής σε ανθρώπους θα είναι μεγάλης σημασίας για το άνοιγμα νέων τομέων στην έρευνα και τη θεραπεία. Η περιορισμένη εύρεση δενδριτικών κυττάρων αποτελούσε μεγάλο πρόβλημα στη μελέτη των κυττάρων αυτών έως το 1990. Τη χρονιά αυτή οι ερευνητές κατάφεραν να παράγουν μεγάλους αριθμούς δενδριτικά κύτταρα από CD34+ πρόδρομα κύτταρα του μυελού των οστών ή από CD14+ μονοκύτταρα *in vitro*. Η ικανότητα παραγωγής των δενδριτικών κυττάρων *in vitro* έδωσε στους ερευνητές τη δυνατότητα να μελετήσουν τα κύτταρα αυτά, να κατανοήσουν τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασής τους με το ανοσοποιητικό σύστημα και να αρχίσουν τις πιλοτικές εφαρμογές των δενδριτικών κυττάρων για θεραπεία στην κλινική πράξη (Kindt T, 2007).

Ανοσοφαινοτυπική ταυτοποίηση δενδριτικών κυττάρων

Τα ώριμα δενδριτικά κύτταρα ορίζονται από βασικά μορφολογικά χαρακτηριστικά καθώς και από την παρουσία ή την απουσία διαφόρων μορίων στην κυτταρική τους επιφάνεια. Το βασικό μορφολογικό χαρακτηριστικό τους είναι οι προεκβολές σε μορφή δενδριτών ή νευρώνων. Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό τους είναι ότι περιέχουν άφθονες ενδοκυτταρικές δομές που σχετίζονται με την επεξεργασία αντιγόνου συμπεριλαμβανομένων ενδοσωμάτων, λυσοσωμάτων και κοκκίων Birbeck. Εμπόδιο στην ανίχνευση των δενδριτικών κυττάρων είναι ότι δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί κάποιος δείκτης κυτταρικής επιφάνειας που εκφράζεται επιλεκτικά και εξειδικευμένα σε αυτά. Παρόλα αυτά ένας συνδυασμός μορίων που εμφανίζονται ή απουσιάζουν απ' την κυτταρική επιφάνεια των δενδριτικών κυττάρων συμβάλλουν στη διαδικασία ταυτοποίησής τους. Σε αυτά περιλαμβάνεται η παρουσία μεγάλων ποσοτήτων μορίων MHC τάξης II και η απουσία δεικτών όπως οι CD3 (T-λεμφοκύτταρα), CD14 (μονοκύτταρα), CD19 (B λεμφοκύτταρα), CD56 (NK κύτταρα) και CD66b (ουδετερόφιλα). Τα δενδριτικά κύτταρα εκφράζουν επίσης μία μεγάλη ποικιλία μορίων προσκόλλησης όπως τα CD11a (LFA-1), CD11c, CD50(ICAM-2), CD54(ICAM-1), CD58(LFA-3) και CD102(ICAM-3). Μόρια όπως τα CD80(B7.1) και CD86(B7.2) υπερεκφράζονται κατά την ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων, ενώ το CD86 χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης της πρώιμης ωρίμανσής τους σε αντίθεση με τον δείκτη των ώριμων κυττάρων CD80. Στα ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα δύο επιπλέον δείκτες είναι ο CD83, που εκφράζεται και από τα B κύτταρα και ο CMRF 44 που εμφανίζεται εξίσου στα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα. Δεδομένης αυτής της τεράστιας ποικιλομορφίας δεικτών, το θέμα της ταυτοποίησης φαίνεται να είναι δύσκολη υπόθεση. Στην πράξη ωστόσο η ταυτοποίηση περιορίζεται στην ανίχνευση μορίων MHC τάξης II και CD80 ή την απουσία CD3 και CD14. Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής για την απουσία ή παρουσία αντίστοιχα δύο εκ των παραπάνω δεικτών είναι τις περισσότερες φορές αρκετή. Ωστόσο ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση είναι πιθανό να απαιτούνται περισσότερες αναλύσεις. Η έκφραση χαρακτηριστικών υποδοχέων TLRs συμβάλλει εν μέρει στην ανοσοφαινοτυπική ταυτοποίηση των δύο βασικότερων τύπων δενδριτικών κυττάρων. Έτσι τα μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα1) χαρακτηρίζονται από την έκφραση των TLR-2,-3,-4 και -7 ώστε να διαφοροποιούνται και να ωριμάζουν κατά την αντιγονοπαρουσίαση όπου και εκκρίνουν κυτοκίνες επάγοντας Th1 ή Th2 ανοσολογική απόκριση. Τα λεμφοειδή ή πλασματοειδή δενδριτικά κύτταρα (δενδριτικά κύτταρα2) αντίστοιχα, εκφράζουν μόνο τους TLR-7 και -9 υποδοχείς, δίνοντας το έναυσμα παραγωγής ιντερφερόνης-α (INF-α) μετά την εισβολή ιών στα κύτταρα. Οι δύο αυτοί υποπληθυσμοί δενδριτικών κυττάρων δενδριτικά διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη σύνδεση της έμφυτης με την ειδική ανοσία μέσω μοναδικών μοτίβων έκφρασης TLRs και έκκρισης κυτοκινών (Wieder E., 2003) - INF-γ - Λύση καρκινικών κυττάρων - INF-γ - Έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων (περφορίνη κ.ά) - INF-γ - T και B ανοσία - Λύση μέσω συμπληρώματος - Αντιγονοπαρουσίαση μέσω MHC-II Στόχευση καρκινικών και διαμολυσμένων με ιούς κυττάρων.

Οι βασικές λειτουργίες των δενδριτικών κυττάρων

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

Ενεργοποίηση T κυττάρων

Τα δενδριτικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την επεξεργασία και παρουσίαση του εκάστοτε αντιγόνου για ενεργοποίηση των CD4+ και CD8+ T κυττάρων. Αυτός είναι και ο πιο σημαντικός ρόλος των δενδριτικών κυττάρων δεδομένου ότι είναι τα μοναδικά κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να ενεργοποιούν «μη έμπειρα» (naïve) T-λεμφοκύτταρα. Τα ανώριμα δενδριτικά

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

Ανοσοποιητική ανοχή

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

Ενεργοποίηση B κυττάρων

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

Τα διάφορα κυτταροτοξικά κύτταρα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Τα αντιγονοειδικά κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs).
2. Τα μη ειδικά σε αποκρίσεις κύτταρα, όπως είναι τα φυσικά φονικά (NK) κύτταρα και τα μακροφάγα.

Στη 2η κατηγορία κυττάρων, που συμμετέχουν στις κυτταρομεσολαβητικού τύπου αποκρίσεις, περιλαμβάνονται οι πληθυσμοί CD4⁺ T λεμφοκυττάρων (TH1 και TH2), οι οποίοι ρυθμίζουν τις αντιδράσεις Κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα υπερευαίσθησίας επιβραδυνόμενου τύπου (Goldsby R., 2013).

Τα CTLs προέρχονται από τη διαδικασία ενεργοποίησης των T κυτταροτοξικών κυττάρων (TC). Αυτού του είδους τα κύτταρα έχουν ως κύριο χαρακτηριστικό τους τη λυτική ικανότητα και επιτελούν καθοριστικό ρόλο στην αναγνώριση και θανάτωση των μεταλλαγμένων κυττάρων (όπως είναι τα κύτταρα μολυσμένα από ιούς και τα καρκινικά κύτταρα). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα CTLs ανήκουν στην τάξη των CD8⁺ και συνεπώς αναγνωρίζουν μόρια συνδεδεμένα στα MHC τάξης I (Goldsby R., 2013). Το γεγονός ότι όλα σχεδόν τα εμπύρνητα κύτταρα του σώματος εκφράζουν μόρια MHC τάξης I αποδυνκνύει ότι, ένα CTL μπορεί να αναγνωρίζει και να καταστρέφει σχεδόν κάθε σωματικό κύτταρο που φέρει το ειδικό αντιγόνο. Αυτό αναγνωρίζεται από το συγκεκριμένο CTL, σε συνδυασμό με ένα μόριο MHC τάξης I. Η ανοσολογική απόκριση μέσω των CTLs, διακρίνεται σε 2 στάδια:

Στο 1ο στάδιο, πραγματοποιείται ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των παρθένων TC κυττάρων, σε δραστικά CTLs.

Στο 2ο στάδιο, τα δραστικά πλέον CTLs αναγνωρίζουν συμπλέγματα αντιγόνου-MHC τάξης I στην κυτταρική επιφάνεια συγκεκριμένων κυττάρων στόχων, έχοντας ως συνέπεια την καταστροφή τους (Kai ersen et al., 2006; Goldsby R., 2013).

Τα CTLs μπορούν να εξουδετερώσουν τα κακοήγη κύτταρα με τρεις διαφορετικούς τρόπους, ο ένας μέσω της χυμικής ενεργοποίησης και οι άλλοι δύο με άμεση επαφή των κυττάρων στόχων με τα CTLs :

□Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει τη διαμεσολάβηση κυτταροκινών, όπως είναι η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α), που παράγονται και εκκρίνονται λόγω της διέγερσης του υποδοχέα TCR. Αυτές οι κυτταροκίνες επηρεάζουν το κύτταρο στόχο ή τα κύτταρα που βρίσκονται σε απόσταση από το τελεστικό T κύτταρο, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο(Kai ersen et al., 2006; del Vecchio et al., 2021). Τα κύρια στάδια, των επακόλουθων δύο μηχανισμών, στο μεσολαβούμενο από CTL κυτταρικό θάνατο είναι η δημιουργία συζεύγματος, η επίθεση στη μεμβράνη, η αποσύνδεση του CTL από το κύτταρο και τέλος η θανάτωση του κυττάρου στόχου(Goldsby R., 2013).

□Ο δεύτερος τρόπος δράσης των CTLs περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση των Fas / FasL. Τα δραστικά CTLs εκφράζουν στην επιφάνειά τους συνδέτες Fas, οι οποίοι συνδέονται με τους υποδοχείς Fas (Fas, CD95) που εκφράζονται στα κύτταρα στόχους(Kai ersen et al., 2006). Αυτή η αλληλεπίδραση ενεργοποιεί σηματοδοτικά μόρια τα οποία πυροδοτούν το μηχανισμό της απόπτωσης μέσω του καταρράκτη των κασπασών. Συγκεκριμένα, ενεργοποιούνται οι προκασπάσες 8 και 10, οι οποίες έπειτα ενεργοποιούν τις τελεστικές κασπάσες 3, 6 και 7, έχοντας ως αποτέλεσμα την απόπτωση. Μόλις, ολοκληρωθεί η θανάτωση του πρώτου κυττάρου στόχου τα κυτταροτοξικά CD8+ T κύτταρα μετακινούνται στην προσπάθεια εντοπισμού ενός νέου στόχου, ώστε να επιτελέσουν πάλι την ίδια διαδικασία(del Vecchio et al., 2021).

□Ο τρίτος μηχανισμός δράσης των CTLs είναι μέσω της απελευθέρωσης κυτταροτοξικών κοκκίων στα κύτταρα στόχους(del Vecchio et al., 2021). Με τη βοήθεια του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχει ανακαλυφθεί η ύπαρξη πυκνών αποθηκευτικών κοκκίων, σε ποικίλους κλώνους CTL κυττάρων. Αυτά τα κοκκία έχουν απομονωθεί με τη διαδικασία της κλασμάτωσης και έχειδειχθεί ότι μεσολαβούν στην καταστροφή επιλεγμένων κυττάρων. Η εργαστηριακή ανάλυση του περιεχομένου των κοκκίων, απέδειξε ότι εμπεριέχουν μονομερή 65 kDa μίας πρωτεΐνης με την ικανότητα να σχηματίζει πόρους που ονομάζεται περφορίνη, καθώς και αρκετές πρωτεάσες σερίνης, που αποκαλούνται θρυμματίνες(Goldsby R., 2013).

Pembrolizumab

Το Pembrolizumab, προηγουμένως γνωστό ως Lambrolizumab, είναι ένα πολύ υψηλής συγγένειας ανθρωποποιημένο αντίσωμα IgG4 που στρέφεται κατά του ανθρώπινου PD-1(Bardhan et al., 2016; Ohaegbulam et al., 2015). Είναι επίσης το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει το PD-1 στο οποίο έχει χορηγηθεί επιταχυνόμενη έγκριση από τον FDA (Ohaegbulam et al., 2015). Στη δοκιμή KEYNOTE-001 Φάσης I, η οποία ξεκίνησε το 2008 και δημοσιεύτηκε το 2015(Cohen et al., 2019; Garon et al., 2019), πήραν μέρος 495 ασθενείς με προχωρημένο μη εγχειρήσιμο ή μεταστατικό MKKΠ, οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με pembrolizumab. Τα βασικά κριτήρια αποκλεισμού των ασθενών περιλάμβαναν ιστορικό πνευμονίτιδας, προηγούμενη συστηματική ανοσοκατασταλτική θεραπεία ή ενεργό αυτοάνοσο νόσημα. Η αρχική επιλογή των ασθενών αφορούσε άτομα ηλικίας ≥ 18 ετών με επαρκή λειτουργία οργάνων και δεν απαιτούσε έλεγχο για μεταλλάξεις EGFR ή αναδιατάξεις ALK(Garon et al., 2015). Ωστόσο, μια μεταγενέστερη τροποποίηση του πρωτοκόλλου επέβαλε έλεγχο για αυτές τις γενετικές εκτροπές. Η μετάλλαξη EGFR ήταν θετική στο 1,5% των ασθενών που εξετάστηκαν και η μετατόπιση ALK στο 2% των ασθενών που δοκιμάστηκαν. Το καρκίνωμα ήταν μη πλακώδες στο 81% των ασθενών και πλακώδες στο 17% των ασθενών. Οι περισσότεροι ασθενείς έλαβαν pembrolizumab σε 10 mg / kg κάθε 2 ή 3 εβδομάδες (N = 489) και πολύ λίγοι σε δόση 2 mg / kg κάθε 3 εβδομάδες (N = 6). Το ORR ήταν 19,4% και η διάμεση διάρκεια ανταπόκρισης ήταν 12,5 μήνες. Η διάμεση PFS ήταν 3,7 μήνες για όλους τους ασθενείς και η διάμεση OS ήταν 12 μήνες. Μετά από διερευνητική ανάλυση στην ομάδα που λάμβανε τη θεραπεία, επικυρώθηκε μια αποκοπή θετικότητας PDL1 $\geq 50\%$ σε 204 ασθενείς ως δυνητικός βιοδείκτης για την πρόβλεψη των αποκρίσεων στο pembrolizumab. Για ασθενείς με όγκους που εμφανίζουν $\geq 50\%$ κύτταρα θετικά σε PDL1, 1–49% κύτταρα θετικά σε PDL1 και 50% των κυττάρων, η μέση επιβίωση ήταν 14,9 μήνες για το pembrolizumab 2mg / kg και 17,3 μήνες για το pembrolizumab 10mg / kg. Η μελέτη αυτή έδωσε την έγκριση στο pembrolizumab για χρήση ως θεραπεία 2ης γραμμής, σε ασθενείς που είναι θετικοί για το PD L1>1%(D. Cortinovis et al., 2017). Στη μελέτη KEYNOTE-024 το pembrolizumab αξιολογήθηκε ως μονοθεραπεία πρώτης γραμμής σε καρκινοπαθείς με προχωρημένο MKKΠ με έκφραση του PD-L1 $\geq 50\%$ έναντι της επιλογής με χημειοθεραπεία με βασικό συστατικό την πλατίνα. Στην ομάδα του pembrolizumab, τόσο η μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) όσο και η 6 μηνών συνολική επιβίωση βελτιώθηκαν σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία, οδηγώντας στην έγκριση του FDA για το pembrolizumab για αυτόν τον πληθυσμό. Η ανάλυση εντόπισε όφελος στους ασθενείς στην ομάδα του pembrolizumab σε αντίθεση με εκείνους της ομάδας χημειοθεραπείας (διάμεση OS 30,0 έναντι 14,2 μηνών)(Doroshov et al., 2019). Επεκτείνοντας τον ίδιο σχεδιασμό σε ασθενείς με έκφραση του PD-L1 $\geq 1\%$, η μελέτη KEYNOTE-042 βρήκε ένα συνολικό όφελος επιβίωσης σε όλους τους ασθενείς, με διάμεση OS 16,7 έναντι 12,1 μηνών. Ωστόσο, μια διερευνητική ανάλυση καρκινοπαθών ασθενών με PD-L1 $\geq 1-49\%$ δεν βρήκε σημαντικές διαφορές στο OS σε αυτόν τον πληθυσμό, υποδηλώνοντας ότι η θεραπεία πρώτης γραμμής με μοναδικό φάρμακο το pembrolizumab θα πρέπει να περιορίζεται σε ασθενείς με έκφραση του PD-L1 $\geq 50\%$ ή περισσότερο. Ωστόσο, σε ασθενείς που δεν είναι υπονήφιοι για χημειοθεραπεία με βάση την κατάσταση απόδοσης τους ή με άλλες συννοσηρότητες, το pembrolizumab από μόνο του μπορεί να είναι μια λογική επιλογή ανοσοθεραπείας (Doroshov et al., 2019). Συμπερασματικά, το pembrolizumab έχει δείξει σημαντική αποτελεσματικότητα για το MKKΠ ανθεκτικό στη συμβατική χημειοθεραπεία, μια κακοήθεια όπου πριν υπήρχαν λίγες επιλογές θεραπείας. Τον Οκτώβριο του 2015, ο FDA των ΗΠΑ ενέκρινε το pembrolizumab για τη θεραπεία των μεταστατικών MKKΠ που εκφράζουν το PD-L1, τα οποία δείχνουν εξέλιξη της νόσου κατά ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα(Kwok et al., 2016). Το pembrolizumab έχει επιδείξει πολλά υποσχόμενη κλινική δράση σε κλινικές μελέτες πρώιμης φάσης για τη θεραπεία ασθενών με υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό SCLC που είχαν υποβληθεί στο παρελθόν σε δύο ή περισσότερες σειρές θεραπειών. Στη φάση Ib, της μελέτης πολυκοόρτης KEYNOTE-028, έλαβαν μέρος ασθενείς που προηγουμένως είχαν υποβληθεί σε θεραπεία για θετικό PD-L1 υποτροπιάζον ή μεταστατικό SCLC, που έλαβαν μονοθεραπεία με pembrolizumab. Στη φάση II, ανοικτής μελέτης KEYNOTE-158, έλαβαν μέρος ασθενείς με υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό SCLC ανεξάρτητα από την

κατάσταση PD-L1 τους, οι οποίοι έλαβαν μονοθεραπεία με pembrolizumab. Και στις δύο μελέτες, το pembrolizumab επέδειξε ένα ευνοϊκό προφίλ ασφάλειας, σύμφωνο με αυτό που παρατηρήθηκε για μονοθεραπεία με pembrolizumab σε άλλους τύπους όγκων. Οι ασθενείς έλαβαν pembrolizumab (10 mg / kg κάθε 2 εβδομάδες στην KEYNOTE-028 και 200 mg κάθε 3 εβδομάδες στην KEYNOTE-158) για έως και 2 χρόνια ή έως ότου τεκμηριωθεί η εξέλιξη της νόσου, η μη αποδεκτή τοξικότητα, η παροδική ασθένεια που εμποδίζει την περαιτέρω θεραπεία της μελέτης ή την απόσυρση από τη μελέτη (Chung et al., 2020). Η μονοθεραπεία με pembrolizumab παρέχει μια θεραπευτική επιλογή που είναι καλύτερα ανεκτή από τη χημειοθεραπεία στο πλαίσιο της τρίτης γραμμής σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε ισχυρή προθεραπεία. Με βάση τα αποτελέσματα των μελετών KEYNOTE-028 και KEYNOTE-158, το pembrolizumab εγκρίθηκε πρόσφατα από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ για τη θεραπεία ασθενών με μεταστατικό SCLC με εξέλιξη της νόσου κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνη και τουλάχιστον μία άλλη προηγούμενη γραμμή θεραπείας (Chung et al., 2020). Οι αναστολείς PD-(L)1 έχει επίσης αποδειχθεί ότι βελτιώνουν τα αποτελέσματα σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει θεραπεία στο μεταστατικό πλακώδες ΜΚΚΠ σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. Η κλινική μελέτη KEYNOTE-407, περιλάμβανε ασθενείς με μεταστατικό πλακώδες ΜΚΚΠ που δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία, οι οποίοι τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν 4 κύκλους θεραπείας με carboplatin και με taxane με ή χωρίς pembrolizumab. Οι ασθενείς στην ομάδα που περιείχε pembrolizumab είχαν σημαντική βελτιωμένη διάμεση OS σε σύγκριση με εκείνους που έλαβαν χημειοθεραπεία μόνο (15,9 έναντι 11,3 μηνών). Το όφελος παρατηρήθηκε σε όλες τις ομάδες PD-L1 TPS. Το γεγονός αυτό, οδήγησε στην έγκριση του FDA και στην καθιέρωση αυτής της τριπλέτας ως ένα καινούριο πρότυπο φροντίδας για αυτή την πληθυσμιακή ομάδα ασθενών. Ανεπιθύμητες ενέργειες βαθμού ≥ 3 παρατηρήθηκαν στο 69,8% των ασθενών που έλαβαν pembrolizumab έναντι του 68,2% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία μόνο με 128 χημειοθεραπεία, γεγονός που υποδηλώνει ότι η προσθήκη pembrolizumab δεν αύξησε σημαντικά την τοξικότητα (Doroshov et al., 2019; Jotte et al., 2020).

Εμβόλια

Η χρησιμοποίηση πεπτιδικών εμβολίων με σκοπό την επαγωγή αντικαρκινικής T-κυτταρικής απόκρισης πλεονεκτεί ως προς το ότι είναι δυνατόν να επιτευχθεί η καταστροφή των καρκινικών κυττάρων χωρίς να επηρεαστούν οι φυσιολογικοί ιστοί. Επίσης, η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός τους είναι σχετικά εύκολος και όπως φαίνεται από κλινικές μελέτες που έγιναν τα εμβόλια αυτά είναι ασφαλή. Η συνύπαρξη τάξης I και τάξης II επιτόπων που προέρχονται από το ίδιο καρκινικό αντιγόνο έχει βρεθεί ότι ενισχύει την ποιότητα της ανοσολογικής απόκρισης, προκαλεί μακράς διάρκειας ανοσία και ενδυναμώνει την αντικαρκινική δράση. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα CD4 T κύτταρα ενεργοποιούν τα αντιγονοπαρουσιαστικά (δενδριτικά) κύτταρα μέσω αλληλεπίδρασης των CD40 και των προσδετών τους και με τη σειρά τους τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα μπορούν να παρουσιάσουν το αντιγόνο στα CD8 T κύτταρα. Πιθανόν να μην υπάρχει άλλη ιατρική καινοτομία που να έχει πιο σημαντικό αντίκτυπο στην ιατρική και στην παγκόσμια υγεία από την εφεύρεση και την ανάπτυξη των εμβολίων. Ακριβώς όπως το ανοσοποιητικό μας σύστημα εργάζεται ασταμάτητα για την πρόληψη των λοιμώξεων και μας προστατεύει από δυνητικά επιβλαβή παράσιτα, ιούς, και βακτήρια έτσι παίζει επίσης κεντρικό ρόλο στην πρόληψη του καρκίνου. Είναι δυνατό να ενισχυθεί αυτή η ικανότητά του, είτε αποτρέποντας τη μόλυνση, είτε «διδάσκοντας» στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος πως να αναγνωρίζουν και να σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα μόλις αυτά εμφανιστούν στο σώμα. Αρκετά εγκεκριμένα από τον FDA εμβόλια πρόληψης του καρκίνου έχουν χρησιμοποιηθεί τα τελευταία είκοσι χρόνια. Αυτά περιλαμβάνουν το εμβόλιο για την ηπατίτιδα B (HBV) και το εμβόλιο για τους ιούς των ανθρωπίνων θηλωμάτων (HPV), τα οποία αποτρέπουν τη μόλυνση από ογκογόνους ιούς, που προκαλούν καρκίνο. Ο αντίκτυπος της ιογενούς καρκινογένεσης γίνεται ολοένα και πιο εμφανής και η πρόληψη μέσω του εμβολιασμού είναι ο πιο σημαντικός και αποτελεσματικός τρόπος μείωσης αυτής της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου. Εκτός από τον προληπτικό ρόλο των εμβολίων όπως τα εμβόλια HPV και HBV, υπάρχει επίσης εντατική, συνεχής έρευνα από τους καρκινογενετιστές και τους ανοσοογκολόγους για εμβόλια που στοχεύουν στον ήδη υπάρχοντα καρκίνο. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει συστηματική έρευνα για την καλύτερη κατανόηση των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που σχετίζονται με την ανάπτυξη του μεταστατικού πλακώδους ΜΚΚΠ σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία με στόχο την ανεύρεση μοριακών δεικτών με προγνωστική και προβλεπτική σημασία. Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, έχει γίνει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που εξετάζουν θεραπευτικές και προφυλακτικές στρατηγικές εμβολιασμού που εκθέτουν το ανοσοποιητικό σύστημα σε μοριακό επίπεδο ώστε να θεραπεύσει ή να αποτρέψει διάφορους τύπους καρκίνων. Οι ανοσοθεραπευτικές στρατηγικές γίνονται τώρα αποδεκτές λόγω της εξειδίκευσης που προσφέρουν στη στόχευση μόνο των καρκινικών κυττάρων σε αντιδιαστολή με την υπάρχουσα χημειοθεραπεία ή την ακτινοβολία που είναι λιγότερο εξειδικευμένες και σχετίζονται με πολλές παρενέργειες. Η αρχή στην οποία βασίζονται τα αντικαρκινικά εμβόλια είναι ότι το ανοσοποιητικό σύστημα είναι ικανό να επάγει αντικαρκινική απόκριση και να ενεργοποιεί μια σειρά αμυντικών μηχανισμών ενάντια στα καρκινικά κύτταρα. Ενίσχυση της ικανότητας του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει η καρκινικά κύτταρα ως ξένα, είτε με ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω της αύξησης της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων. Γενικά, ο στόχος των αντικαρκινικών εμβολίων είναι να εισάγουν το αντιγόνο ανοσογόνο στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και να επάγουν μακράς διάρκειας ανοσία. Ο σχεδιασμός πεπτιδικών εμβολίων για την επαγωγή αντικαρκινικής κυτταρικής απόκρισης παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα. Είναι δυνατή η σύνδεση διαφορετικών πεπτιδίων στο ίδιο μόριο φορέα επιτρέποντας έτσι την παρασκευή πολυδύναμων συνθετικών εμβολίων. Επίσης, υπάρχει περιορισμός στην ανάπτυξη μη ειδικών αντισωμάτων από αντιγόνα προσμίξεις λόγω της υψηλής καθαρότητας των συνθετικών πεπτιδίων. Επιπλέον, τα εμβόλια αυτά έχουν ενδογενή ανοσοενισχυτική δράση. Τέλος, υπάρχει η δυνατότητα σύνθεσης πεπτιδίων που να ξεπερνά γενετικούς περιορισμούς στην παραγωγή αντισωμάτων. Το σκεπτικό της ανοσοθεραπείας του καρκίνου εισήχθηκε πρώτη φορά από τον William Coley πριν ένα αιώνα περίπου. Παρόλα αυτά χρειάστηκε να περάσουν πολλά χρόνια ώστε να γίνει εφικτή η κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ανοσοποιητικού συστήματος με τα καρκινικά κύτταρα. Πρόσφατες ανακαλύψεις στην κυτταρική και μοριακή ανοσολογία έφεραν στην επιφάνεια σημαντικές ενδείξεις για την ικανότητα του ανοσοποιητικού συστήματος να αναγνωρίζει τα καρκινικά κύτταρα ως ξένα να επάγει ανοσολογική απόκριση που οδηγεί στη μείωσή τους. Η πρόγνωση για τους ασθενείς με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΚΚΠ) παρα-συνδυασμούς έχει φτάσει σε ένα πλατώ αποτελεσματικότητας, προ κλινικά και κλινικά στοιχεία υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η αναστολή πολλαπλών βιολογικών μονοπατιών που διαμεσολαβούν

στην ανάπτυξη του όγκου μπορεί να αποτελεί μια αποτελεσματική θεραπευτική στρατηγική. Η πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου και των μηχανισμών της ογκογένεσης επέτρεψε την ανάπτυξη θεραπειών έναντι συγκεκριμένων μοριακών στόχων, όπως ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF), οι οποίοι εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον καρκίνο του πνεύμονα. Τα αντικαρκινικά εμβόλια λειτουργούν στέλνοντας μία οδηγία ή ένα ειδικό σήμα στα κύτταρα του ασθενούς προκειμένου να παράξει αντιγόνα ή πρωτεΐνη που θα διαχωρίσει τα καρκινικά κύτταρα από τα φυσιολογικά. Τα εμβόλια ενεργοποιούν το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού ώστε να ενεργήσει το ανοσοποιητικό σύστημα διεγείροντας την ειδική για τον όγκο αντιδραστικότητα Τ-κυττάρων που οδηγεί στην ενίσχυση της στόχευσης του όγκου. Από τη στιγμή που το σώμα του ασθενή έχει δημιουργήσει αρκετά <<αντιβιοτικά>> μπορεί να αναγνωρίσει πότε και αν θα επιστέψει η νόσος. Οι επιστήμονες μελετούν πολλά διαφορετικά είδη αντικαρκινικών εμβολίων και πώς αυτά θα μπορέσουν να λειτουργήσουν σε διαφορετικές μορφές καρκίνου. Ωστόσο απαιτείται ακόμα περισσότερη έρευνα για να πουν πόσο καλά λειτουργούν τα εμβόλια και ποιες μορφές καρκίνου μπορούν να αντιμετωπίσουν. Οι ειδικοί ωστόσο θεωρούν ότι τα εξατομικευμένα εμβόλια μπορούν να είναι αποτελεσματικά σε μία ευρεία κλίμακα καρκίνων, μεταξύ αυτών του καρκίνου του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος και των νεφρών. Οι γιατροί έχουν ξεκινήσει ήδη δοκιμές και για το πρώτο εξατομικευμένο εμβόλιο mRNA για το μελάνωμα, με την ελπίδα της μόνιμης θεραπείας του καρκίνου του δέρματος. Κατά τη φάση 2 των δοκιμών αποδείχθηκε πως τα εμβόλια μειώνουν σημαντικά το ρίσκο του καρκίνου που επανεμφανίζεται σε ασθενείς με μελάνωμα. Αρκετές πλατφόρμες εμβολίων νεοαντιγόνων αξιολογούνται σε κλινικές δοκιμές για κακοήθειες όπως το μελάνωμα, ο καρκίνος του παγκρέατος, ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του πνεύμονα και το ΜΜΚΠ, μεταξύ άλλων. Από τις πολλές προσεγγίσεις που διερευνώνται, τα προγράμματα εμβολίων κατά του καρκίνου υφίστανται αναγέννηση λόγω της τεχνολογικής πρόόδου και της εξατομικευμένης φύσης του σύγχρονου σχεδιασμού τους. Τα εμβόλια νεοαντιγόνων είναι μια μορφή ανοσοθεραπείας που περιλαμβάνει τη χρήση DNA, mRNA και πρωτεϊνών που προέρχονται από μεταλλάξεις που ανιχνεύονται σε δείγματα ιστού όγκου ασθενών για να διεγείρουν την ειδική για τον όγκο αντιδραστικότητα Τ-κυττάρων που οδηγεί στην ενίσχυση της στόχευσης του όγκου. Η παρούσα κλινική μελέτη αφορά τη μελέτη των νεοαντιγόνων ως θεραπευτικών στόχων η οποία έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, με τη συνήθη εφαρμογή εργαλείων τεχνητής νοημοσύνης (AI) που βελτιστοποιούν τις αλληλουχίες γονιδίων που βρίσκονται στα εμβόλια mRNA ως μια εναλλακτική λύση λήψης αποφάσεων για την εξαγωγή πολύτιμων πληροφοριών από κλινικά δεδομένα για τη δημιουργία εμβολίων με μεγαλύτερη ισχύ και σταθερότητα, που θα μπορούσαν να φτάσουν σε όλο τον κόσμο. Σε αυτήν την κλινική μελέτη, θα εξετάσουμε λεπτομερώς την ταυτοποίηση των νεοαντιγόνων, MS PCR—methylation-specific PCR; NGS—next generation sequencing; TAS—targeted analysis sequencing; WES—whole exome sequencing; WGS—whole genome sequencing, ddPCR—droplet digital PCR; MAF—mutant allelic frequency; EpCAM—epithelial cell adhesion molecule; FISH—fluorescence in situ hybridization; qPCR—quantitative polymerase chain reaction τις πρώιμες εμπειρίες που στοχεύουν αυτούς τους επιτόπους σε κλινικές μελέτες εμβολίων και μερικές από τις μελλοντικές κατευθύνσεις που είναι απαραίτητες για την επιτάχυνση της περαιτέρω ανάπτυξης αυτού του τομέα. Ο πρωταρχικός στόχος αυτής της κλινικής μελέτης είναι να αξιολογήσει την ασφάλεια, την ανεκτικότητα και την αποτελεσματικότητα των Εμβολίων Microlynaq-TM σε ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσμένο ΜΜΚΠ που χρησιμοποιούν προσεγγίσεις ανοσογονιδιοματικής καρκίνου στο ΜΜΚΠ, διερευνώντας τα ειδικά για τη νόσο αντιγόνα όγκου του ίδιου του ασθενή (όπως τα νεοαντιγόνα), δηλαδή τα μόρια που βρίσκονται στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων και διακρίνονται από τα φυσιολογικά κύτταρα για το σχεδιασμό αποτελεσματικών και εξατομικευμένων στρατηγικών εμβολιασμού κατά του καρκίνου.

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

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

□ Ο δεύτερος τύπος εμβολίων κατά του καρκίνου, τα αλλογενή εμβόλια, βασίζονται σε κύτταρα που αναπτύσσονται αποκλειστικά στο εργαστήριο (μη εαυτά κύτταρα). Αυτός ο τύπος εμβολίου είναι πιο δύσκολο να αναπτυχθεί αλλά πιο ελκυστικός επειδή είναι δυνητικά λιγότερο δαπανηρή η κατασκευή του. Ο στόχος είναι να ενεργοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα αντί να επιτεθεί σε ένα συγκεκριμένο καρκινικό κύτταρο, έτσι ώστε αυτή η μορφή θεραπείας να έχει δυνατότητες ενάντια σε κάθε τύπο καρκίνου. Παρά τη σημαντική ερευνητική προσπάθεια μέσω των κλινικών δοκιμών, κανένα δεν έχει ακόμη αποδειχθεί αρκετά αποτελεσματικό για την έγκριση του FDA (Dobosz & Dzieciatkowski, 2019). Τα εμβόλια κατά του καρκίνου χρησιμοποιούν ειδικά αντιγόνα όγκου για να πυροδοτήσουν αντικαρκινικές ανοσοαποκρίσεις που προκαλούνται από Τ-κύτταρα. Οι βασικές μελέτες προήλθαν από την ταυτοποίηση των MZ2-E και MZ2-D, τα οποία είναι αντιγόνα που προέρχονται από κύτταρα μελανώματος και κωδικοποιούνται από την οικογένεια γονιδίων MAGE (Melanoma-associated antigen) και μπορούν να αναγνωριστούν από τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα για να πυροδοτήσουν αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Ταυτόχρονα, ένα άλλο αντιγόνο ανθρώπινου μελανώματος, το gp100, αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με την απόρριψη όγκου in vivo επάγοντας ανοσολογικές αποκρίσεις που προκαλούνται από διηθητικά λεμφοκύτταρα (Tumor-Infiltrating Lymphocytes- TILs) σε ασθενείς με μελάνωμα. Αυτά τα ευρήματα άνοιξαν το δρόμο για τη χρήση αντιγόνων προερχόμενων από όγκους ως εμβόλια στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου (Y. Zhang & Zhang, 2020). Εκτός από τα αντιγόνα όγκου, ο Εμβολιασμός με βάση τα δενδριτικά κύτταρα έδειξε επίσης σημαντικά κλινικά αποτελέσματα. Τα δενδριτικά κύτταρα (DCs) είναι τα καλύτερα εξοπλισμένα

αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην πρόκληση αντικαρκινικής ανοσίας. Συγκεκριμένα, μετά την ενεργοποίηση από αντιγόνα όγκου, τα DCs μπορούν να εσωτερικεύσουν, να επεξεργαστούν και στη συνέχεια να παρουσιάσουν τους επεξεργασμένους επίτοπους στα T κύτταρα και να επάγουν κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTL) (Y. Zhang & Zhang, 2020). Το 2010 ο FDA ενέκρινε το Provenge ως το πρώτο αυτόλογο εμβόλιο κατά του καρκίνου, γνωστό και ως sipuleucel-T, για τη θεραπεία του ανθεκτικού καρκίνου του προστάτη, μια ανοσοθεραπεία με βάση τα δενδριτικά κύτταρα (Igarashi & Sasada, 2020). Μια άλλη πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου περιλαμβάνει τη χρήση εξατομικευμένων εμβολίων που έχουν σχεδιαστεί για να πυροδοτούν de novo αποκρίσεις T-λεμφοκυττάρων έναντι των νεοαντιγόνων που προσδίδουν υψηλή εξειδίκευση στον ασθενή. Τα νεοαντιγόνα είναι αντιγόνα που κωδικοποιούνται από μεταλλαγμένα γονίδια που υπάρχουν στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων (termed tumour-associated antigens – TAAs). Επομένως εδώ και αρκετά χρόνια έχουν μελετηθεί εκτενώς λόγω του πρωταρχικού τους ρόλου στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Ως αποτέλεσμα σωματικών μεταλλάξεων ειδικών για τον όγκο, τα νεοαντιγόνα δεν υπάρχουν στην επιφάνεια των κυττάρων του φυσιολογικού ιστού. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως μπορεί να εκφραστούν και σε μη κακοήθεις ιστούς, γεγονός που αυξάνει τον κίνδυνο αυτοάνοσων τοξικοτήτων που προκαλούνται από το εμβόλιο. Όντας εξαιρετικά ανοσογονικά, μπορούν να ενεργοποιήσουν την ανοσολογική απόκριση των CD8+ T κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων, παρέχοντας έναν τέλειο στόχο για ανοσοθεραπείες καρκίνου με βάση τα T κύτταρα. Η παρουσίαση και το φορτίο των νεοαντιγόνων έχουν συσχετιστεί θετικά με την πρόγνωση σε ασθενείς, σε ποικίλους τύπους καρκίνων και με το όφελος από τους αναστολείς του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου (ICIs), σε ασθενείς με μελάνωμα, μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (MKKΠ) ή καρκίνο του παχέος εντέρου να αυξάνεται (Blass & Ott, 2021).

Η παρούσα κλινική μελέτη θα περιλαμβάνει το πειραματικό μέρος, στο οποίο θα παρατίθενται η σύνθεση των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων των (Microlynaq™ &3)-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών αποτελεσμάτων των κλινικο-εργαστηριακών συσχετίσεων των επιπέδων της κλινικής ανταπόκρισης μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των *EGFR*, *CDA*, *RRM1*, *RRM2*, *dCK*, *hENT1*, *ERbB2*, *MYC*, *KRAS*, *MET*, *CCND1*, *CDK4*, *EML4-ALK fusion*, *BCL2* και *VEGF* όπως και των επιπέδων της διαφορικής έκφρασης των *miR-26a*, *miR-30d*, *miR-34a*, *miR-146a*, *miR-155*, *miR-195*, *miR-200b*, *miR-200c*, *miR-202* και *miR-223* μεταξύ των ασθενών της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου στον ιστό και το πλάσμα αυτών των ασθενών με πρωτοδιαγνωσμένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Σε αυτή την κλινική μελέτη γίνεται αναφορά στη μοριακή βάση της ανοσίας, δηλαδή στην ικανότητα του οργανισμού να αμύνεται στην επίδραση διαφόρων αντιγόνων. Αυτή η κλινική μελέτη αναφέρεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και στην ανοσολογική απόκριση που επάγεται από την ενεργοποίησή τους. Επισημαίνεται η σημαντικότητα του καθορισμού πολλών αντιγόνων καρκινικών κυττάρων που αναγνωρίζονται από T κύτταρα και συγκεκριμένα των καρκινικών αντιγόνων των CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1. Επίσης, θα γίνεται αναφορά στην ασθένεια του MMKΠ καρκίνου και στην καταπολέμηση αυτού μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς επίσης και στα νεοαντιγονικά αντικαρκινικά πεπτιδικά εμβόλια. Σε αυτή την κλινική μελέτη περιγράφονται οι μέθοδοι ενίσχυσης της αντιγονικότητας / ανοσογονικότητας των ταξινομημένων νεοεπιτοπικών πεπτιδίων του εξατομικευμένου νεοαντιγονικού εμβολίου του (Microlynaq™-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1).

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

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα υγείας που αντιμετωπίζουν οι ανεπτυγμένες χώρες είναι ο καρκίνος. Η πολυπλοκότητα της ασθένειας καθιστά πολύ δύσκολη την αντικαρκινική θεραπεία και κυρίως τη χημειοθεραπεία καθώς, τα ήδη υπάρχοντα φάρμακα αντιμετωπίζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Επιπλέον η διαδικασία εύρεσης νέων φαρμάκων είναι κοστοβόρα και χρονοβόρα με αποτέλεσμα να έχει στραφεί το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας σε διαφορετικές προσεγγίσεις. Η Κλινική αυτή μελέτη έχει ως βασικό αντικείμενο την ανάπτυξη νέων υπολογιστικών μεθόδων και αλγορίθμων με στόχο το σχεδιασμό νέων πεπτιδικών μοριακών δομών με βελτιωμένα ανοσογονικά χαρακτηριστικά (δραστικότητα / ιδιότητες) εστιάζοντας κυρίως στην κατανόηση της συσχέτισης μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών και της δραστηριότητας / ιδιοτήτων που εμφανίζουν τα νέα συνθετικά πεπτιδικά μόρια, πληροφορίες οι οποίες δε θα πρέπει να αγνοούνται κατά το στάδιο του σχεδιασμού νέων εμβολίων-φαρμάκων. Η ανάπτυξη νέων εργαλείων και μεθοδολογιών σχεδιασμού νέων δραστικών πεπτιδικών μορίων και συμπλόκων μέσω ηλεκτρονικών υπολογιστών (Computer Aided Molecular Design - CAMD), που θα ελαχιστοποιήσουν τον παράγοντα τύχη και τα χρονοβόρα και δαπανηρά πειράματα της σύνθεσης και του βιολογικού ελέγχου νέων ουσιών, αποτελεί έναν από τους ουσιαστικούς στόχους της προσπάθειας αυτής. Σε αυτό το μέρος της κλινικής μελέτης θα γίνεται μια κβαντομοριακή ποσοτικοποίηση των σχέσεων μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών και της δραστηριότητας των ιδιοτήτων των μορίων από τα οποία θα αποτελούνται τα εμβόλια-φάρμακα της παρούσας κλινικής μελέτης. Στη συνέχεια θα παρουσιάζονται οι βασικότεροι δείκτες που θα χρησιμοποιούνται ως μεταβλητές στις ποσοτικές αναλύσεις και οι επιπλέον παρουσιάζονται μεθοδολογίες επιλογής μεταβλητών, μοντελοποίησης και εικονικού βιολογικού ελέγχου. Στο ίδιο μέρος θα παρουσιάζεται η αντιμετώπιση συγκεκριμένων προβλημάτων μοντελοποίησης, πρόβλεψης και εικονικού ελέγχου. Κατά την αναζήτηση της βέλτιστης μεθοδολογίας σε κάθε περίπτωση θα αναλύθούν και θα αξιολογηθούν όλα τα διαθέσιμα δεδομένα με στόχο την εύρεση της καταλληλότερης υπολογιστικής προσέγγισης για την επίλυση ενός συγκεκριμένου προβλήματος, του σχεδιασμού ενός σύμπλοκου αντιγονο-παρουσιαστικών Microlynaq™ πεπτιδίων ταξινομημένων κβαντομοριακά με τα ανοσογονικά αντιγονικά πεπτιδικά των TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογο δενδριτικό DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Συγκεκριμένα θα αναπτυχθούν και θα δημοσιευτούν ποσοτικές

σχέσεις δομής - τοξικότητας (QSTR, Quantitative Structure Toxicity Relationships) για την τοξικότητα της αλληλεπίδρασης των νέο-αντιγονικών πεπτιδίων με τα φάρμακα της Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Στην ενότητα αυτή θα διενεργηθούν ποσοτικές σχέσεις δομής-δραστικότητας (QSAR, Quantitative Structure Activity Relationships), και εικονικού βιολογικού ελέγχου για την αναστολή της πρόσδεσης επί των υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERbB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, και BCL2 και VEGF όπως και των επιπέδων διαφορικής έκφρασης των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 μικρο-γονιδίων στόχων. Σε όλες τις περιπτώσεις θα παρουσιάσεται η διαδικασία αξιολόγησης του μοντέλου που αναπτύχθηκε. Επίσης, βασικό σκοπός αυτής της κλινικής μελέτης είναι να εξαχθούν συμπεράσματα για τους μηχανισμούς με τους οποίους οι χημικές ουσίες που εμπεριέχονται στα Νεοαντιγονικά Εμβόλια MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab, θα μπορούν να τροποποιούν τη λειτουργία των πρωτεϊνών των S100A2, ERCC1 & RRM1, RCAS1, p73, της γλουταθειόνη-s, της τρανσφεραση-π (gst-π), της π-γλυκοπρωτεΐνη (p-gr), των (HNRNP) A2 / B1 και των BRCA1, συμπεριλαμβανομένων των RRM1 και RRM2 σε κυτταρολογικά παρασκευασματα ογκων ασθενων, δημιουργώντας ένα ρόλο ανοσο-φαρμακευτικής δράσης. Στην παρούσα κλινική μελέτη θα γίνει χρήση ενός επιλεγμένου δείγματος τριδιάστατων δομών από την PDB (Protein Data Bank) με σκοπό να διερευνηθεί η παρουσία γενικών κανόνων και σχέσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε in silico σχεδιασμό εμβολίων-φαρμάκων. Θα γίνει συνδυασμός μιας μεγάλης ποικιλίας τεχνικών όπως: νευρωνικών δικτύων, στατιστικής ανάλυσης, περιγραφικής ανάλυσης τριδιάστατων δομών, μοριακών προσομοιώσεων, ενεργειακών υπολογισμών (που συνήθως χρησιμοποιούνται μεμονωμένες). Στα πλαίσια της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να δοκιμαστεί ένα μεγάλο εύρος υπολογισμών που παλινδρομήθηκαν με τα θερμοδυναμικά κατώφλια (που προέκυψαν μετά από προσομοίωση και μετά από προσομοίωση και ενεργειακή ελαχιστοποίηση) προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο διάφορων ΜΚΚΠ μηχανισμών που ενδεχομένως ερμηνεύουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης - υποκαταστάτη. Στα πλαίσια της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να επισημανθούν κάποιοι ισχυροί μηχανισμοί στον σχηματισμό των παρατηρούμενων ενεργειακών κατωφλίων όπως είναι το μέγεθος του θύλακα σε σχέση με το αριθμό ατόμων του υποκαταστάτη και των μορίων νερού, η αναλογία υδρόφοβων αμινοξέων προς πολικά, οι αναλογίες των διάφορων τύπων ατόμων του υποκαταστάτη, η αναλογία ατόμων νερού προς άτομα υποκαταστάτη στο θύλακα και η παρουσία ακινητοποιημένων μορίων νερού. Στα πλαίσια της πορείας της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να συνδεθεί η σημασία των ακινητοποιημένων μορίων νερού με τη διαμερισματοποίηση του θύλακα κατά την αλληλεπίδραση με τον υποκαταστάτη σε περιοχές ισχυρής και μη ισχυρής πρόσδεσης (ή ακόμη και απώθησης) και έτσι θα εξεταστεί η συμβολή των ακινητοποιημένων μορίων νερού στη διαφοροποίηση του μηχανισμού αγωνιστή – ανταγωνιστή των μοριακών υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERbB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF. Τα αποτελέσματα αναμένεται να παρουσιάζουν ισχυρή στατιστική σημαντικότητα παρά το μικρό σχετικά δείγμα. Κατόπιν τα αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νευρωνικού δικτύου με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο είναι ικανά να προβλέψουν τη σύσταση και την ανοσογονική δράση του υποκαταστάτη νεοαντιγονικού πεπτιδίου MicrolynaqTM. Για αυτό τον λόγο περιπτώσεις από τους υποκαταστάτες ταξινομημένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM θα τεθούν εκτός των ομάδων προπόνησης (training) και αξιολόγησης (validating) του νευρωνικού δικτύου, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η ανοσογονική πρόβλεψη πλησιάζει την πραγματική σύσταση των κβαντομοριακώς ταξινομημένων υποκαταστατών των νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM με τη μέγιστη αντιγόνο-παρουσιαστική δράση και φαίνεται ότι τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Στο τέλος θα εξεταστούν προοπτικές επέκτασης των ανοσογονικών προβλέψεων με νευρωνικά δίκτυα, με σκοπό την πρόβλεψη αν ένας υποκαταστάτης ταξινομημένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM αποτελεί αγωνιστή ή ανταγωνιστή υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERbB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF αλλά και των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 στοχεύοντας ταυτόχρονα τα πρωτεϊνικά μοριακά μονοπάτια των S100A2, ERCC1 & RRM1, RCAS1, p73, της γλουταθειόνη-s, τρανσφεραση-π (gst-π), της π-γλυκοπρωτεΐνη (p-gr), των (HNRNP) A2 / B1 και των BRCA1, RRM1 και RRM2 τα οποία ανιχνεύθηκαν στον ιστό και το πλάσμα ασθενών των Ομάδων και της ομάδας ελέγχου με πρωτοδιαγνωσμένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα λαμβάνοντας υπόψιν και την παράμετρο των ακινητοποιημένων μορίων νερού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το εμβόλιο νεοαντιγόνου, βασισμένο σε εξατομικευμένες μεταλλάξεις DNA όγκου, θα μπορούσε να προκαλέσει ειδική διήθηση Τ κυττάρων όγκου στο σημείο του όγκου, ασκώντας ισχυρή αποτελεσματικότητα κατά του όγκου. Σε αυτή την κλινική μελέτη θα αξιολογηθεί η σκοπιμότητα και η ασφάλεια μιας νέας στρατηγική συνδυαστικής αντικαρκινικής θεραπείας προσθέτοντας εμβόλιο νεοαντιγόνου στο σχήμα του bevacizumab και του αντισώματος αντι-PD-1. Πρώτον, (60) εξήντα ανοσογόνα ΜΚΚΠ αντιγόνα TAAs και (15-27) δεκαπέντε με είκοσι επτά νέο-ανοσογονικά νέο-επιτοπικά συνθετικά πεπτίδια νεοαντιγόνου εντοπίστηκαν και αναπτύχθηκαν για το εμβόλιο νεοαντιγόνου (MicrolynaqTM), το οποίο μπορεί να προκαλέσει ισχυρή αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση in vivo. Επιπλέον, η αξιολόγηση του ανοσοποιητικού μικροπεριβάλλοντος του όγκου έδειξε επίσης ότι η αναλογία των ειδικών για το νεοαντιγόνο Τ κυττάρων στο αίμα θα μπορούσε να προκληθεί δραματικά από τη συνδυασμένη θεραπεία. Και μια μεγάλη ποσότητα νεοαντιγόνων-ειδικών Ki67-θετικών CD8 + Τ κυττάρων βρέθηκαν σε ιστούς όγκων, οι οποίοι προκαλούν Η ανοσοθεραπεία σε διάφορους τύπους καρκίνου και κυρίως στον καρκίνο του πνεύμονα έχει έναν πολλά υποσχόμενο ρόλο. Η έκφραση συγκεκριμένων βιοδεικτών από τα καρκινικά κύτταρα αποτελεί βασική προϋπόθεση στην αποτελεσματική εφαρμογή των ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αξίας της ανίχνευσης των βιοδεικτών PD-1 και PD-L1 στην αποτελεσματική εφαρμογή της ανοσοθεραπείας στον καρκίνο του πνεύμονα μέσω των βιβλιογραφικών αναφορών. Στο πλαίσιο αυτό, γίνεται εκτεταμένη αναφορά στον καρκίνο του πνεύμονα και στους μηχανισμούς με τους οποίους

τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν ανοσία και διαφεύγουν από τον έλεγχο του ανοσοποιητικού συστήματος. Ακόμα, τονίζεται η σπουδαιότητα της ανακάλυψης και της κατανόησης της λειτουργίας των μορίων PD 1 και PD-L1, στην εξέλιξη του τομέα της ανοσοθεραπείας. Ο αποκλεισμός των μορίων αυτών, μέσω ειδικά σχεδιασμένων ανασταλτικών φαρμάκων, αποτελεί μία από τις βασικές μεθόδους ανοσοθεραπείας που χρησιμοποιείται σήμερα στην κλινική πράξη. Η παρουσία των βιοδεικτών PD-1 και PD-L1 χρησιμοποιείται σε πολλές κλινικές μελέτες, ως κατευθυντήριος οδηγός για την χορήγηση ποικίλων ανασταλτικών φαρμάκων, σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα προχωρημένου σταδίου.

Στόχος αυτής της μελέτης είναι η σύγκριση κάθε στοχευμένης θεραπείας ξεχωριστά (Pembrolizumab, MicrolynaqTM & DCTs) συγχωρηγούμενη με την κλασική χημειοθεραπεία Paclitaxel 200 mg / m² & Carboplatin AUC 6 (IV), με το συνδυασμό τους και σε σύγκριση με την κυτταροτοξική χημειοθεραπεία μόνη της σε ασθενείς με νεοδιαγνωσθέντα, προχωρημένο μη-πλακώδη ΜΜΚΠ, μετά από χορήγηση αυτών των παραγόντων και ως θεραπεία συντήρησης. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, θα αξιολογηθεί ο ρόλος της ακτινολογικής απάντησης των ασθενών στη συνδυαστική χημειοθεραπεία / ανοσοθεραπεία ως προγνωστικός παράγοντας. Τέλος, θα διενεργηθεί προσδιορισμός των επιπέδων της κλινικής ανταπόκρισης μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων έκφρασης των EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERbB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF όπως και των επιπέδων της διαφορικής έκφρασης των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 μεταξύ των 69 ασθενών της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου των ανεμβολίαστων ασθενών στον ιστό και το πλάσμα αυτών των ασθενών με πρωτοδιαγνωσμένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Στόχος της παρούσας Κλινικής Μελέτης θα αποτελεί η κλινική αξιολόγηση της Θεραπευτικής Αποτελεσματικότητας των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε ασθενείς με ΜΜΚΠ σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab, όπως και η κλινική συσχέτιση αυτών με το διάστημα επιβίωσης χωρίς υποτροπή της νόσου και την συνολική επιβίωση των ΜΜΚΠ ασθενών. Δεδομένων των παραπάνω, ο στόχος της παρούσας κλινική μελέτης αναμένεται να είναι η ανάλυση της έκφρασης και η διαλεύκανση του ρόλου των κυκλοφορούντων miRNAs miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 που συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης σε ΜΜΚΠ ασθενείς που τους χορηγήθηκαν εξατομικευμένα νεοαντιγονικά εμβολία MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Τα miRNAs που θα αναλύθούν αφορούν σε αυτά που ρυθμίζουν τα σημεία ελέγχου (miR-34a, miR-2001, miR-220c), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων Tregs (miR-155, miR-146) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223), και τέλος, σε αυτά που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων προς M1 ή M2 φαινότυπο (let 7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-2021).

Ασθενείς και Μέθοδοι

Στη μελέτη αυτή θα συμμετέχουν 69 ασθενείς των κλινικών και των νοσοκομείων που θα συμμετέχουν σε αυτή την κλινική μελέτη, με πρόσφατα διαγνωσμένο, σταδίου IIIB ή IV, ιστολογικά ή κυτταρολογικά επιβεβαιωμένο, μη-πλακώδες ΜΜΚΠ. Η ένταξη των ασθενών θα λάβει χώρα από τον Σεπτέμβριο του 2025 έως τον Δεκέμβριο του 2028. Ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης αναμένεται να είναι 440 ημέρες. Άλλα κριτήρια ένταξης αναμένεται να είναι η ηλικία, η κατα Eastern Cooperative Oncology Group κλινική κατάσταση του ασθενούς 0 ή 1, καθώς επίσης η επαρκής αιματολογική, ηπατική και νεφρική λειτουργία (συμπεριλαμβανομένης και της απέκκρισης από τα ούρα 500 mg πρωτεΐνης ανά ημέρα). Στα κριτήρια αποκλεισμού περιλαμβάνονται η αιμόπτυση, ιστορικό τεκμηριωμένης αιμορραγικής διάθεσης ή διαταραχή της πήξης, λήψη θεραπευτικής αντιπηκτικής αγωγής, ακτινοθεραπεία εντός 20 ημερών πριν από την ένταξη ή μείζονα χειρουργική επέμβαση εντός 28 ημερών από την ένταξη, κλινικά σημαντική καρδιαγγειακή νόσος, μη ελεγχόμενη φαρμακευτικά υπέρταση, προηγηθείσα συστηματική λήψη χημειοθεραπείας για το ΜΜΚΠ και συμπτωματική ή μη αντιμετωπισθείσα μεταστατική νόσος στον εγκέφαλο. Ασθενείς με όγκους που εισέβαλαν ή εφάπτονταν σε μεγάλα αιμοφόρα αγγεία (με ακτινολογική επιβεβαίωση) θα αποκλεισθούν επίσης.

Σχεδιασμός της μελέτης-Δοσολογία

Οι ασθενείς θα λάβουν:

□12 (δώδεκα) κύκλους εξατομικευμένων, In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς QMMM-ταξινομημένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM αναμεμιγμένων με τα ανοσογονικά πεπτίδια των TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) ΜΜΚΠ αντιγόνα. Τα φαρμακευτικά προϊόντα / εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE θα αποτελούνται από 17-25 πεπτίδια από την αποθήκη της Biogenea Pharmaceuticals Ltd τα οποία θα είναι αναμεμιγμένα με τα TAAs των εξής πεπτιδίων: SP17-προερχόμενων πεπτιδίων (NIPFAAAAYF), (IPFAAAAYF), (AVKIQAAFR), (NIPFAAAAYF), (REQPDNIPA), AKAP4-προερχόμενων πεπτιδίων (YADQVNIDYL), (RSHRGVCKV), (ISPDGECIS), (ISPDGECIS), (VISPDGECIS), PTTG1-προερχόμενων πεπτιδίων (STPRFGKTFD), (QVSTPRFGK), (GSGPSIKAL), (QVSTPRFGK), (FDAPPALPK), MAGE-A1 (KVLEYVIKV), MAGE-A2 (YLQLVFGIEV), MAGE-A3.1 (KVAELVHFL), MAGE-A3.2 (FLWGPRALV279), MAGE-A4 (GVYDGREHTV), MAGE-A9 (ALSVMGVYV), MAGE-A10 (GLYDGMHEHL), NY-ESO-1 (CTAG1B)-(SLLMWITQC), CAMEL (CTAG2)-(MLMAQEALAF), WT-1 (RMFPNAPYL), MUC-1 (LLLLTVLTV), SS393-(GYDQIMPCK), SS391-

(PYGYDQIMPK), DEK-AFF2-προερχόμενων peptide (DKESEEEVS), MYB-NFIB-προερχόμενων πεπτιδίων (QFIDSSWYL, SLASPLQPT and SLASPLQSWYL), NFIB-MYB-προερχόμενων peptide (MMYSPICLTQT), SURVIVIN (BIRC5)-(ELTLGEFLKL), HER2 (ERBB2)-(KIFGSLAFL), GLULD1-(FLPEFGISSA), BRAF-προερχόμενων πεπτιδίων (GDFGLATEK, IGDFGLATEK, and IGDFGLATEKSRWSGSH), EGFR-προερχόμενων πεπτιδίων (KITDFGRAK, LLLLTVLTV, STAPPVHNV, ALGSTAPPV, TLAPATEPA, FLSFHISNL, NLTISDVSV, KVLEHVVRV, AWRTHTP, LVFGIELMEV and AIIDGVESV)-PTPRZ1, (KVFAIPTV)-PTPRZ1, (SLWAGVVVL)-CHI3L2, (TLGEFLKLDREKAKN)-BIRC5, (DDPSTIEKLAKNKQKP)-CDC42, (NKQKPITPETAEKLRD)-CDC42, (NGAYKAIPVAQDLNAPS)-SPP1, ((TLGEFLKLDREKAKD), (FTELTGEF), (LMLGEFLKL), (EPDLAQCFY))-Survivin σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία και Pembrolizumab (MicrolynaqTM / Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV) και Pembrolizumab,),

Πρωταρχικός στόχος της μελέτης αναμένεται να είναι η συνολική επιβίωση. Στους δευτερεύοντες στόχους περιλαμβάνονται η βελτίωση στο χρόνο έως την εξέλιξη της νόσου, το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης, το αρχικό ποσοστό ανταπόκρισης στη συνδυαστική MicrolynaqTM / Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV) και Pembrolizumab θεραπεία σε ασθενείς που δεν θα έχουν λάβει προηγούμενη χημειοθεραπεία, το προφίλ ασφαλείας και η συσχέτιση μεταξύ της κλινικής ανταπόκρισης και της έκφρασης των EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, και BCL2 και VEGF όπως και των επιπέδων διαφορικής έκφρασης των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 μεταξύ των 69 ασθενών της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου στον ιστό και το πλάσμα. Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης, αν αναμένεται να είναι αναγκαίο, οι ασθενείς θα λάβουν παρηγορική θεραπεία, δεύτερης ή τρίτης γραμμής χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία της πρωτοπαθούς εστίας. Από όλους τους ασθενείς που θα συμμετέχουν θα υπάρχει έγγραφη συγκατάθεση τους, μετά από ενημέρωση για την φύση και τους σκοπούς αυτής της μελέτης. Το πρωτόκολλο της μελέτης θα εγκριθεί από την επιτροπή δεοντολογίας και το επιστημονικό ιατρικό συμβούλιο του Νοσοκομείου / Κλινικής όπου θα διενεργηθεί η παρούσα κλινική μελέτη και θα διεξαχθεί σύμφωνα με τις αρχές ορθής κλινικής πρακτικής. Μετά τη χειρουργική επέμβαση, οι ασθενείς θα λάβουν συμβατική ακτινοθεραπεία που θα χορηγείται στα 180–200 cGy ανά κλάσμα ημερησίως για πέντε ημέρες την εβδομάδα σε ένα σύνολο περίπου 60 Gy. Εξατομικευμένα εμβόλια νεοαντιγόνου Microlynaq-TM VACCINE θα παρασκευαστούν χρησιμοποιώντας πληροφορίες από φρέσκο όγκο ή από εγκλεισθέντα σε κύβους παραφίνης (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) που λαμβάνονται κατά τη στιγμή της διαγνωστικής εκτομής, όπως περιγράφεται παρακάτω. Το εμβόλιο θα χορηγηθεί υποδορίως τουλάχιστον επτά έως δώδεκα εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της εξωτερικής ακτινοθεραπείας. Το εμβόλιο Microlynaq-TM VACCINE θα εφαρμοστεί κατά τη διάρκεια των κύκλων χορήγησης PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας χημειοακτινοβολίας (CRT) σε συνδυασμό με γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές, με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, και αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία με tumor-lysate pulsed DCs. Ξεκινώντας την ημέρα 14 πριν από τον πρώτο κύκλο χορήγησης PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), οι ασθενείς θα λάβουν 12 εμβολιασμούς με εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE για 12 εβδομάδες. Θα χρησιμοποιηθούν 900 μg ανά πεπτίδιο, ακολουθούμενα από δύο αναμνηστικές δόσεις οκτώ και δεκαέξι εβδομάδες αργότερα. Για κάθε δόση, οι δεξαμενές εμβολίων θα χορηγούνται εντός έξι ωρών από την απόψυξη σε ένα από τα τέσσερα έως και τέσσερα άκρα. Οι ασθενείς θα εμβολιαστούν επανειλημμένα με τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE σε κάθε κύκλο χορήγησης με PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) σε συνδυασμό με γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές, με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, και με αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία με tumor-lysate pulsed DCs. Οι ασθενείς θα κάνουν 12 εμβολιασμούς με τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE ανά εβδομάδα όπου και θα χορηγούνται 900–1100 μg ανά πεπτίδιο. Θα επιτρέπονται ταυτόχρονα φάρμακα που κρίνονται απαραίτητα για την επαρκή φροντίδα του ασθενούς, συμπεριλαμβανομένων των ταυτόχρονων κορτικοστεροειδών για συμπτώματα που σχετίζονται με εγκεφαλικό οίδημα. Κλινικο-εργαστηριακές δοκιμές συσχέτισης των κλινικο-παθολογικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ασθενών της Ομάδας μελέτης και της Ομάδας ελέγχου των ανεμβολιαστων ασθενών θα διενεργηθούν στα πλαίσια της ολοκλήρωσης αυτής της κλινικής μελέτης σχετικά με την έκφραση των S100A2, ERCC1 & RRM1, RCAS1, p73, της γλουταθειόνης-s, τρανσφεραση-π (gst-π), της π-γλυκοπρωτεΐνης (p-gp), των (HNRNP) A2 / B1 και των BRCA1, RRM1 και RRM2 σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα όγκων ασθενών που τους χορηγήθηκαν MICROLYNAQ-TM VACCINE, paclitaxel 200 mg / m², carboplatin auc 6 (iv) και αυτόλογη δενδριτική ανοσοθεραπεία σε συνδυασμό με γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του pd-1 της pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας. Σκοπός αυτής της κλινικής μελέτης είναι να εξαχθούν συμπεράσματα για τους μηχανισμούς με τους οποίους χημικές ουσίες που εμπεριέχονται στα Νεοαντιγονικά Εμβόλια MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab, τροποποιούν τη λειτουργία των πρωτεϊνών των S100A2, ERCC1 & RRM1, RCAS1, p73, της γλουταθειόνης-s, της τρανσφεραση-π (gst-π), της π-γλυκοπρωτεΐνης (p-gp), των (HNRNP) A2 / B1 και των BRCA1, Όπως και των RRM1 και RRM2 σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα όγκων ασθενών, δημιουργώντας ένα ρόλο ανοσο-φαρμακευτικής δράσης. Στην παρούσα κλινική μελέτη MicrolynaqTM θα γίνει χρήση ενός επιλεγμένου δείγματος τριδιάστατων δομών από την PDB (Protein Data Bank) με σκοπό να διερευνηθεί η παρουσία γενικών κανόνων και σχέσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε in silico σχεδιασμό εμβολίων-φαρμάκων. Στην παρούσα

κλινική μελέτη MicrolynaqTM θα λάβει χώρα συνδυασμός μιας μεγάλης ποικιλίας τεχνικών όπως: νευρωνικών δικτύων, στατιστικής ανάλυσης, περιγραφικής ανάλυσης τριδιάστατων δομών, μοριακών προσομοιώσεων, ενεργειακών υπολογισμών (που συνήθως χρησιμοποιούνται μεμονωμένες). Στα πλαίσια της παρούσας κλινικής μελέτης MicrolynaqTM αναμένεται να δοκιμαστεί ένα μεγάλο εύρος υπολογισμών που παλινδρομήθηκαν με τα θερμοδυναμικά κατώφλια (που προέκυψαν μετά από προσομοίωση και μετά από προσομοίωση και ενεργειακή ελαχιστοποίηση) προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο διάφορων ΜΚΚΠ μηχανισμών που ενδεχομένως ερμηνεύουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης - υποκαταστάτη. Στα πλαίσια της παρούσας κλινικής μελέτης MicrolynaqTM αναμένεται να επισημανθούν κάποιοι ισχυροί μηχανισμοί στον σχηματισμό των παρατηρούμενων ενεργειακών κατωφλίων όπως είναι το μέγεθος του θύλακα σε σχέση με το αριθμό ατόμων του υποκαταστάτη και των μορίων νερού, η αναλογία υδρόφοβων αμινοξέων προς πολικά, οι αναλογίες των διάφορων τύπων ατόμων του υποκαταστάτη, η αναλογία ατόμων νερού προς άτομα υποκαταστάτη στο θύλακα και η παρουσία ακινητοποιημένων μορίων νερού. Στα πλαίσια της πορείας της παρούσας κλινικής μελέτης MicrolynaqTM αναμένεται να συνδεθεί η σημασία των ακινητοποιημένων μορίων νερού με τη διαμερισματοποίηση του θύλακα κατά την αλληλεπίδραση με τον υποκαταστάτη σε περιοχές ισχυρής και μη ισχυρής πρόσδεσης (ή ακόμη και απώθησης) και έτσι θα εξεταστεί η συμβολή των ακινητοποιημένων μορίων νερού στη διαφοροποίηση του μηχανισμού αγωνιστή – ανταγωνιστή των μοριακών υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERbB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF. Τα αποτελέσματα αναμένεται να παρουσιάζουν ισχυρή στατιστική σημαντικότητα παρά το μικρό σχετικά δείγμα. Κατόπιν τα αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νευρωνικού δικτύου με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο είναι ικανά να προβλέψουν τη σύσταση και την ανοσογονική δράση του υποκαταστάτη νεοαντιγονικού πεπτιδίου MicrolynaqTM. Για αυτό τον λόγο περιπτώσεις από τους υποκαταστάτες ταξινομημένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM θα τεθούν εκτός των ομάδων προπόνησης (training) και αξιολόγησης (validating) του νευρωνικού δικτύου, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η ανοσογονική πρόβλεψη πλησιάζει την πραγματική σύσταση των υποκαταστατών ταξινομημένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM με τη μέγιστη αντιγόνο-παρουσιαστική δράση και φαίνεται ότι τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Στο τέλος θα εξεταστούν προοπτικές επέκτασης των ανοσογονικών προβλέψεων με νευρωνικά δίκτυα, με σκοπό την πρόβλεψη αν ένας υποκαταστάτης ταξινομημένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM αποτελεί αγωνιστή ή ανταγωνιστή υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERbB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF αλλά και των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 στοχεύοντας ταυτόχρονα τα πρωτεϊνικά μοριακά μονοπάτια των S100A2, ERCC1 & RRM1, RCAS1, p73, της γλουταθειόνης-s, τρανσφεραση-π (gst-π), της π-γλυκοπρωτεΐνης (p-gr), των (HNRNP) A2 / B1 και των BRCA1, RRM1 και RRM2 τα οποία ανιχνεύθηκαν στον ιστό και το πλάσμα ασθενών των Ομάδων και της ομάδας ελέγχου με πρωτοδιαγνωσμένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα λαμβάνοντας υπόψιν και την παράμετρο των ακινητοποιημένων μορίων νερού. Τα εμβόλια της μελέτης MicrolynaqTM θα χορηγηθούν ακόμα και σε ασθενείς που χρειάζονται περισσότερα από 4 mg δεξαμεθαζόνης την ημέρα εντός επτά ημερών από την έναρξη της χορήγησης των εμβολίων Microlynaq-TM VACCINES. Η έκβαση των κλινικών δοκιμών δεν παρουσιάζει πάντα ωφέλιμα αποτελέσματα σε όλο το εύρος των συμμετεχόντων, διεγείροντας ερωτήματα και θέτοντας νέους στόχους. Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών εμφανίζει βελτίωση και αύξηση του ποσοστού επιβίωσης. Έτσι, η ανοσοθεραπεία πλέον εφαρμόζεται ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς που πληρούν συγκεκριμένα κριτήρια. Επιπλέον, διερευνώνται στρατηγικές για πιο εξειδικευμένη και στοχευμένη χρήση συνδυασμού In-Silico μεθοδολογιών και In-Vitro&In-Vivo ανοσοθεραπευτικών μεθόδων, μέσω των βιοδεικτών για μεγιστοποίηση των αποτελεσμάτων. Συμπερασματικά, παρόλο που η λειτουργία των κυκλοφορούντων miRNAs στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης παραμένει ακόμα ασαφής, η μελέτη του ρόλου των μορίων αυτών ως πιθανοί βιοδείκτες είναι μεγάλης σημασίας. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση ότι το μοτίβο έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και της αντικαρκινικής ανοσίας μέσω ρύθμισης βασικών στοιχείων του ανοσολογικού συστήματος, σχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών και τα μόρια αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω ως πιθανοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες στον ΜΜΚΠ. Τέλος, μελετάται η εφαρμογή συνδυαστικών θεραπευτικών προσεγγίσεων με βάση την ανοσοθεραπεία, κυρίως σε επιμένουσες κακοήθειες καθώς και σε μεταστάσεις, με πολλά υποσχόμενα μελλοντικά αποτελέσματα.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΉ ΠΕΡΙΓΡΑΦΉ

Λεπτομέρειες σχεδίασης

ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς

Λαμβάνεται για βιοψία δείγμα ιστού από τον όγκο. Αυτό επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους. Είναι σημαντικό να ληφθεί ικανό δείγμα ιστού. Η μέθοδος αναρρόφησης με λεπτή βελόνα (FNA) δεν προτιμάται γιατί δε λαμβάνεται αρκετή ποσότητα ιστού, επομένως ο Ογκολόγος θα συστήσει μια από τις ακόλουθες μεθόδους βιοψίας:

- Βιοψία με τέμνουσα βελόνη που γίνεται από επεμβατικό ακτινολόγο
- Βρογχοσκόπηση από πνευμονολόγο

- Βιοψία λεμφαδένων από γενικό χειρουργό
- Μεσοθωρακοσκόπηση η οποία διενεργείται από θωρακοχειρουργό ή γενικό χειρουργό
- VATS βιοψία μετά από θωρακοσκόπηση
- Αξονική τομογραφία, PET CT, υπέρηχος, ή μαγνητική τομογραφία μπορεί να βοηθήσουν να παρθεί βιοψία από τον επεμβατικό ακτινολόγο ή τον πνευμονολόγο
- ENB ενδοβρογχική βιοψία λεμφαδένων που γίνεται από πνευμονολόγο ή θωρακοχειρουργό.

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

Στη μελέτη αυτή θα συμμετέχουν 69 ασθενείς της κλινικής και του νοσοκομείου που θα συμμετέχουν σε αυτή την κλινική μελέτη. 37 άνδρες και 32 γυναίκες, με πρόσφατα διαγνωσμένο, σταδίου ΙΙΒ ή ΙV, ιστολογικά ή κυτταρολογικά επιβεβαιωμένο, μη-πλάκώδες ΜΜΚΠ. Η ένταξη των ασθενών θα λάβει χώρα από τον Σεπτέμβριο του 2025 έως τον Δεκέμβριο του 2028. Ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης αναμένεται να είναι 440 ημέρες. Άλλα κριτήρια ένταξης αναμένεται να είναι η ηλικία, η κατα Eastern Cooperative Oncology Group κλινική κατάσταση του ασθενούς 0 ή 1, καθώς επίσης η επαρκής αιματολογική, ηπατική και νεφρική λειτουργία (συμπεριλαμβανομένης και της απέκκρισης από τα ούρα 500 mg πρωτεΐνης ανά ημέρα). Στα κριτήρια αποκλεισμού θα περιλαμβάνονται η αιμόπτυση, ιστορικό τεκμηριωμένης αιμορραγικής διάθεσης ή διαταραχή της πήξης, λήψη θεραπευτικής αντιπηκτικής αγωγής, ακτινοθεραπεία εντός 20 ημερών πριν από την ένταξη ή μείζονα χειρουργική επέμβαση εντός 28 ημερών από την ένταξη, κλινικά σημαντική καρδιαγγειακή νόσος, μη ελεγχόμενη φαρμακευτικά υπέρταση, προηγηθείσα συστηματική λήψη χημειοθεραπείας για το ΜΜΚΠ και συμπτωματική ή μη αντιμετωπισθείσα μεταστατική νόσος στον εγκέφαλο. Ασθενείς με όγκους που εισέβαλαν ή εφάπτονταν σε μεγάλα αιμοφόρα αγγεία (με ακτινολογική επιβεβαίωση) θα αποκλεισθούν επίσης. Τα κλινικά δεδομένα θα είναι διαθέσιμα από το γραφείο συλλογής δεδομένων των ογκολογικών κλινικών που θα συμμετέχουν στην παρούσα κλινική μελέτη και που συνεργάζονται με Ογκολογικές Ομάδες της Ελλάδας ή και του εξωτερικού. Οι ασθενείς που θα συμμετέχουν στη μελέτη θα υπογράψουν γραπτή συγκατάθεση πριν από την εκάστοτε γενετική / μοριακή ανάλυση και Εμβόλιασμο μετά από σχετική ενημέρωση. Κατά τη διάρκεια της κλινικής μελέτης θα καταγράφονται αναδρομικά τα κλινικά δεδομένα ενδιαφέροντος των ασθενών (ηλικία, φύλο, εντόπιση όγκου, είδος χειρουργείου) και τα δεδομένα παρακολούθησης (follow-up), όπως η ημερομηνία υποτροπής και η ημερομηνία θανάτου. Το βιολογικό υλικό της μελέτης θα αποτελεί ιστικές τομές προερχόμενες από βιοπτικό υλικό ή / και υλικό χειρουργικών παρασκευασμάτων, φρέσκες ή εγκλεισθείσες σε κύβους παραφίνης (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE). Στα πλεονεκτήματα του πειραματικού σκέλους της ερευνητικής αυτής εργασίας περιλαμβάνονται επίσης: (α) η χρήση πιεζοηλεκτρικού μικροτόμου υπό την καθοδήγηση οπτικού μικροσκοπίου για την εκλεκτική απομόνωση των καρκινικών κυττάρων από τον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό, (β) η επιλογή αντιδραστηρίων, όπως της αντίστροφης μεταγραφάσης, με χαρακτηριστικά υψηλής απόδοσης, (γ) η χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών (primers) και ιχνηθειών (probes) τεχνολογίας TaqMan για τη βέλτιστη ενίσχυση των RNA αλληλουχιών-στόχων, αφού προηγήθηκε έλεγχος της απόδοσης τους σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς β-ακτίνη και (δ) η λήψη σειράς μέτρων για ελαχιστοποίηση τυχόν επιμόλυνσης των υπό μελέτη δειγμάτων με εξωγενές γενωμικό υλικό.

Η μελέτη θα πραγματοποιηθεί σε ένα στάδιο:

- Στο στάδιο αυτό θα ενταχθούν 69 ασθενείς οι οποίοι θα εμβολιασθούν με 12 (δώδεκα) κύκλους MicrolynaqTM σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs και Pembrolizumab για τους οποίους επίσης θα υπάρχει διαθέσιμο ιστολογικό υλικό για περαιτέρω ανάλυση με τα ίδια εμπορικά διαθέσιμα πάνελ της illumina. Από την Ομάδα αυτή βιοπτικό υλικό (FFPE) κατάλληλο για ανάλυση με NGS θα είναι διαθέσιμο για 60 ασθενείς και η γονοτυπική ανάλυση θα πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr χρησιμοποιώντας το ειδικά σχεδιασμένο για ΜΜΚΠ πάνελ της illumina.
- 29 ανεμβολιασμένοι ασθενείς θα αποτελούν την Ομάδα Ελέγχου όπου θα τους χορηγηθούν 6 (έξι) κύκλοι χημειοθεραπείας Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), (ομάδα ελέγχου).

Η συλλογή και επεξεργασία των κύβων παραφίνης θα διενεργηθούν στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr και για τις δύο Ομάδες (Ομάδα μελέτης&Ομάδα Ελέγχου). Η αρχική επεξεργασία θα αφορά στην ιστολογική ανασκόπηση των τομών, συμπεριλαμβανομένων της παρουσίας καρκινικών κυττάρων στο παρασκεύασμα, του ποσοστού της νέκρωσης, του ποσοστού Ki67, του βαθμού διαφοροποίησης, της ενδοθηλιακής υπερπλασίας και της επιλογής των περιοχών του όγκου για μακροεκτομή. Όλα τα παραπάνω θα πραγματοποιηθούν από συνεργαζόμενο με την Ογκολογική Ομάδα που θα συμμετέχει στην παρούσα κλινική μελέτη παθολογοανατόμο. Η ανάλυση του γονιδίου MGMT θα πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr (Θεσσαλονίκη, Ελλάδα). Η μελέτη θα λάβει έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος των Ογκολογικών Κλινικών της παρούσας κλινικής μελέτης που συνεργάζονται με Ογκολογικές Ομάδες της Ελλάδας ή και του εξωτερικού και θα πραγματοποιηθεί με βάση τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Όλοι οι ασθενείς που θα συμμετέχουν στη μελέτη θα λάβουν και θα υπέγραψουν ειδικό έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης για τη χρήση βιολογικού υλικού και τη χρησιμοποίησή του σε μελλοντικές μελέτες (informed consent).

Επεξεργασία ιστών και απομόνωση DNA

Τα δείγματα ιστών φρέσκων ή εγκλεισμένων σε κύβους παραφίνης (FFPE) θα ελεγχθούν μέσω ιστολογικής εξέτασης χρώσης αιματοξυλίνης-εωσίνης, για να διαπιστωθεί ότι ανταποκρίνονται στον ζητούμενο ιστολογικό τύπο και για να αξιολογηθεί το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων στο παρασκεύασμα και το ποσοστό της νέκρωσης. Θα ακολουθήσει μακροεκτομή χειροκίνητα από μη χρωματισμένες τομές πάχους 10μm πριν από την απομόνωση του DNA. Η απομόνωση του DNA από τις τομές των ιστών θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) για τα δείγματα των ασθενών της Ομάδας μελέτης 1 (Group A) και το επίσης εμπορικά διαθέσιμο kit Gene Read DNA FFPE (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) για τα δείγματα των ασθενών της Ομάδας μελέτης 2 (Group B), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του DNA θα προσδιορισθεί χρησιμοποιώντας το φωτόμετρο φθορισμού Qubit (Life Technologies, Paisley, UK) και στις δύο Ομάδες. Αναμένεται ότι από τα 29 δείγματα των βιώσιμων νεοπλασματικών κυττάρων που θα απομονωθούν από την ομάδα ελέγχου όπως και από **την ομάδα των 69 ασθενών** της παρούσας κλινικής μελέτης ασθενών και τα 69 μέλη θα πληρούν τα κριτήρια για περαιτέρω ανάλυση με τη μεθοδολογία του NGS (ελάχιστη συγκέντρωση DNA 2ng / μl).

Ανοσοϊστοχημικές Μελέτες

Για τις ανοσοϊστοχημικές μελέτες θα χρησιμοποιηθούν βιοπτικά δείγματα από τον πρωτοπαθή όγκο ασθενών με MMKΠ μονιμοποιημένα σε φορμόλη 10% και εγκλεισμένα σε παραφίνη, με την τεχνική των δύο βημάτων peroxidase conjugated polymer technique (DAKO Envision kit, DAKO, Carpinteria, CA). Η λήψη τομών παραφίνης θα γίνει με μικροτόμο πάχους 4μm, οι οποίες ακολούθως θα τοποθετηθούν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με επικάλυψη poly-L-lysine. Η αξιολόγηση των χρωσθέντων πλακιδίων θα γίνει με τη χρήση απλού μικροσκοπίου με τυφλό τρόπο, από δύο παθολογοανατόμους χωρίς γνώση των υπαρχουσών κλινικοπαθολογοανατομικών πληροφοριών. Επί διαφωνίας των δύο αποτελεσμάτων, τα πλακίδια θα επαναξιολογηθούν από κοινού χωρίς γνώση του προηγούμενου αποτελέσματος. Προκειμένου να εκτιμηθεί η έκφραση του βιοδείκτη PD-L1, τομές παραφίνης πάχους 4μm θα υποβληθούν στην ακόλουθη διαδικασία: 1. Επώαση στους 60oC για 1 ώρα την ημέρα της ανοσοχρώσης. 2. Αποπαραφίνωση, ενυδάτωση και αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων σε αυτόματο μηχάνημα (PT Link της εταιρείας Dako) για 20 λεπτά στους 97oC, με τη χρήση διαλύματος χαμηλού pH (pH 6) [Envision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH (50x), της εταιρείας Dako]. 3. Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης για 5 λεπτά. 4. Επώαση των τομών με το πρωτογενές αντίσωμα PDL1 (PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, της εταιρείας Dako) σε αραιώση 1:50 για 30 λεπτά. 5. Επώαση των τομών με το δευτερογενές αντίσωμα PDL1 (PD-L1 IHC 22C3 Linker) για 30 λεπτά. 6. Επώαση των τομών με πολυμερές αποτελούμενο από υπεροξειδάση και δευτερογενές αντίσωμα ειδικό για ανοσοσφαιρίνες ποντικού / κουνελιού / αρουραίου (Poly-HRP-Anti-mouse / rabbit / rat IgG, της εταιρείας Immunologic), για 30 λεπτά. 7. Επώαση των τομών σε διάλυμα διαμινονβενζιδίνης (DAB sub-chromo) για 5 λεπτά. Η υπεροξειδάση αλληλοεπιδρά με το H₂O₂ και οξειδώνει το υπόστρωμα της DAB παράγοντας έγχρωμο αδιάλυτο προϊόν το οποίο γίνεται ορατό με το κοινό μικροσκόπιο. 8. Επώαση των τομών σε βοηθητικό ενισχυτικό χρωμογόνο για 5 λεπτά. 9. Χρώση του υποστρώματος σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 5 λεπτά. 10. Επίστρωση των τομών και επικάλυψή τους με καλυπτρίδα. Μετά το πέρας κάθε ενός από τα παραπάνω βήματα, θα γίνει ξέπλυμα των τομών με Wash Buffer [Envision FLET WASH BUFFER (20x), της εταιρείας Dako].

Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του PD-L1

Για την αξιολόγηση της έκφρασης του βιοδείκτη PD-L1 απαιτείται η παρουσία τουλάχιστον 100 βιώσιμων νεοπλασματικών κυττάρων που θα απομονωθούν από την ομάδα ελέγχου όπως και από **την ομάδα των 69 ασθενών** της παρούσας κλινικής μελέτης στην αντικειμενοφόρο πλάκα του προς εξέταση δείγματος. Η αξιολόγηση της έκφρασης θα γίνει με βάση την μεμβρανική χρώση του δείκτη, ενώ η κυτταροπλασματική χρώση δεν θα συνεκτιμηθεί. Επίσης, δεν θα εκτιμηθεί στο αποτέλεσμα η χρώση των μη νεοπλασματικών κυττάρων καθώς και η χρώση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος όπως λεμφοκυττάρων και μακροφάγων. Το αποτέλεσμα της αξιολόγησης θα εκφραστεί μέσω του Tumor Proportion Score (TPS), το οποίο αντιπροσωπεύει το ποσοστό των βιώσιμων νεοπλασματικών κυττάρων του δείγματος με μερική ή πλήρη μεμβρανική χρώση. Συγκεκριμένα, ένα δείγμα θα θεωρηθεί ότι έχει χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης PD-L1, όταν το ποσοστό των βιώσιμων νεοπλασματικών κυττάρων με μεμβρανική χρώση σε κάθε ένταση θα είναι τουλάχιστον 1% (TPS ≥ 1%). Εάν το παραπάνω ποσοστό ξεπεράσει το 50% (TPS ≥ 50%), τότε το δείγμα θεωρείται ότι είχε υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης PD-L1, ενώ στην αντίθετη περίπτωση χαμηλή (TPS 1-49%). Όλα τα δείγματα θα μελετηθούν σε ανάλυση x10-40. Ως θετικός μάρτυρας θα χρησιμοποιηθούν Control Cell Line Slides (Dako-supplied), που κάθε ένα θα περιέχει δείγμα από θετική PD-L1 κυτταρική σειρά. Ως αρνητικός μάρτυρας θα χρησιμοποιηθεί ιστός από το εκάστοτε δείγμα στον οποίο δεν θα χρησιμοποιηθεί το πρωτογενές αντίσωμα. ROS1 Προκειμένου να εκτιμηθεί η ύπαρξη διαμετάθεσης της πρωτεΐνης ROS1, τομές παραφίνης πάχους 4μm θα υποβληθούν στην ακόλουθη διαδικασία: 1. Ολονύκτια επώαση στους 37oC. 2. Επώαση στους 60oC για 1 ώρα την ημέρα της ανοσοχρώσης. 3. Αποπαραφίνωση, ενυδάτωση και αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων σε αυτόματο μηχάνημα (PT Link της εταιρείας Dako) για 20 λεπτά στους 96oC, με τη χρήση διαλύματος υψηλού pH (pH 9) [Envision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH(50x), της εταιρείας Dako]. 4. Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των τομών σε διάλυμα H₂O₂ 3% για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. 5. Ολονύκτια επώαση των τομών με το πρωτογενές αντίσωμα ROS-1 [ROS1 (D4D6(R)), Rabbit mAb, της εταιρείας Cell Signaling], σε αραιώση 1:100. 6. Επώαση των τομών με ειδικό αντιδραστήριο δέσμευσης του πρωτογενούς αντισώματος (Post Antibody blocking, της εταιρείας Immunologic), για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντιδραστήριο αυτό είναι έτοιμο προς χρήση (Ready-to-use) και χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της χρώσης και την αύξηση της ευαισθησίας. 7. Επώαση των τομών με πολυμερές αποτελούμενο από υπεροξειδάση και δευτερογενές αντίσωμα ειδικό για ανοσοσφαιρίνες ποντικού / κουνελιού / αρουραίου (Poly-HRP-Anti-mouse / rabbit / rat IgG, της εταιρείας Immunologic), για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντιδραστήριο αυτό είναι έτοιμο προς χρήση (Ready-to-

use) και συνδέεται ανοσολογικά με το σύμπλεγμα του πρωτογενούς αντισώματος με το αντιδραστήριο Post Antibody blocking. 8. Επώαση των τομών σε διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (DAB), για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. 9. Χρώση του υποστρώματος σε διάλυμα αιματοξυλίνης για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ιστών ή κυττάρων. 10. Αφυδάτωση με ανιόντα διαλύματα αιθανόλης (70%, 80%, 96%,100%). 11. Βύθιση των τομών σε ξυλόλη. 12. Επιστροφή των τομών και επικάλυψή τους με καλυπτρίδα. Μετά το πέρας κάθε ενός από τα παραπάνω βήματα, θα γίνει ξέπλυμα των τομών με Wash Buffer [Envision FLET WASH BUFFER (20x), της εταιρείας Dako].

Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης ROS1

Η αξιολόγηση της έκφρασης του βιοδείκτη ROS1 βιώσιμων νεοπλασματικών κυττάρων που θα απομονωθούν από την ομάδα ελέγχου όπως και από **την ομάδα των 69 ασθενών** της παρούσας κλινικής μελέτης θα βασισθεί στο H score. Συγκεκριμένα, θα υπολογιστεί το γινόμενο του ποσοστού των νεοπλασματικών κυττάρων με κυτταροπλασματική χρώση επί την ένταση της ανοσοχρώσης (% θετικά νεοπλασματικά κύτταρα * ένταση χρώσης). Η ένταση της χρώσης θα βαθμολογηθεί με 1 βαθμό για την ήπια, 2 βαθμούς για την μέτρια και 3 βαθμούς για την έντονη ένταση. Συμπερασματικά, το κάθε δείγμα θα λάβει τιμές H-score από 0-300, ενώ θετική θα θεωρηθεί η έκφραση του δείκτη για H-score ≥ 150 (231). Κάθε κυτταροπλασματική χρώση του δείκτη σε νεοπλασματικά κύτταρα προσμετρήθηκε στο τελικό αποτέλεσμα. Τα δείγματα θα μελετηθούν σε ανάλυση x10-40. Ως θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες θα χρησιμοποιηθούν οι ROS1 Analyte Controls HCL023 (Histocyte Laboratories Ltd). Πρόκειται για αντικειμενοφόρες πλάκες που κάθε μία θα περιέχει δείγμα από θετική και δείγμα από αρνητική ROS1 κυτταρική σειρά.

ERCC1

Προκειμένου να εκτιμηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης ERCC1 σε καλλιέργειες βιώσιμων νεοπλασματικών κυττάρων που θα απομονωθούν από την ομάδα ελέγχου όπως και από **την ομάδα των 69 ασθενών** της παρούσας κλινικής μελέτης, τομές παραφίνης πάχους 4μm θα υποβληθούν στην ακόλουθη διαδικασία: 1. Ολονύκτια επώαση στους 37oC. 2. Επώαση στους 60oC για 1 ώρα την ημέρα της ανοσοχρώσης. 3. Αποπαραφίνωση, ενυδάτωση και αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων σε αυτόματο μηχάνημα (PT Link της εταιρείας Dako) για 20 λεπτά στους 96oC, με τη χρήση διαλύματος υψηλού pH (pH 9) [Envision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH(50x), της εταιρείας Dako]. 4. Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των τομών σε διάλυμα H₂O₂ 3% για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. 5. Ολονύκτια επώαση των τομών με το πρωτογενές αντίσωμα ERCC1 [ERCC1 (D6G6(XP)), Rabbit mAb, της εταιρείας Cell Signaling], σε αραιώση 1:125 6. Επώαση των τομών με ειδικό αντιδραστήριο δέσμευσης του πρωτογενούς αντισώματος (Post Antibody blocking, της εταιρείας Immunologic), για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντιδραστήριο αυτό είναι έτοιμο προς χρήση (Ready-to-use) και χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της χρώσης και την αύξηση της ευαισθησίας. 7. Επώαση των τομών με πολυμέρες αποτελούμενο από υπεροξειδάση και δευτερογενές αντίσωμα ειδικό για ανοσοσφαιρίνες ποντικού / κουνελιού / αρουραίου (Poly-HRP-Anti-mouse / rabbit / rat IgG, της εταιρείας Immunologic), για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντιδραστήριο αυτό είναι έτοιμο προς χρήση (Ready to-use) και συνδέεται ανοσολογικά με το σύμπλεγμα του πρωτογενούς αντισώματος με το αντιδραστήριο Post Antibody blocking. 8. Επώαση των τομών σε διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (DAB), για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. Το χρωμογόνο αυτό χρησιμοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί αναγνώριση των ανοσοσυμπλεγμάτων με το κοινό μικροσκόπιο. 9. Χρώση του υποστρώματος σε διάλυμα αιματοξυλίνης για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ιστών ή κυττάρων. 10. Αφυδάτωση με ανιόντα διαλύματα αιθανόλης (70%, 80%, 96%,100%). 11. Βύθιση των τομών σε ξυλόλη. 12. Επιστροφή των τομών και επικάλυψή τους με καλυπτρίδα. Μετά το πέρας κάθε ενός από τα παραπάνω βήματα, θα γίνει ξέπλυμα των τομών με Wash Buffer [Envision FLET WASH BUFFER (20x), της εταιρείας Dako].

Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης ERCC1

Η αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης ERCC1 θα βασισθεί στο H score όπως η αξιολόγηση της ROS1. Θα υπολογιστεί το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων με οποιαδήποτε έντασης πυρηνική χρώση και στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκε με την ένταση της ανοσοχρώσης. Η ένταση της χρώσης θα βαθμολογηθεί με 1 βαθμό για την ήπια, 2 βαθμούς για την μέτρια και 3 βαθμούς για την έντονη ένταση. Συμπερασματικά το κάθε δείγμα θα λάβει τιμές H- score από 0-300, ενώ θετική θα θεωρηθεί η έκφραση του δείκτη για H- score ≥ 100 . Ως θετικός μάρτυρας θα χρησιμοποιηθεί δείγμα από φυσιολογικό ιστό παρωτίδας ενώ σαν αρνητικός τομέας του ιστού του δείγματος με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, χωρίς την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος.

RRM1

Προκειμένου να εκτιμηθεί η έκφραση της πρωτεΐνης RRM1 σε καλλιέργειες βιώσιμων νεοπλασματικών κυττάρων που θα απομονωθούν από την ομάδα ελέγχου όπως και από **την ομάδα των 69 ασθενών** της παρούσας κλινικής μελέτης, τομές παραφίνης πάχους 4μm θα υποβληθούν στην ακόλουθη διαδικασία: 1. Ολονύκτια επώαση στους 37oC. 2. Επώαση στους 60oC για 1 ώρα την ημέρα της ανοσοχρώσης. 3. Αποπαραφίνωση, ενυδάτωση και αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων σε αυτόματο μηχάνημα (PT Link της εταιρείας Dako) για 20 λεπτά στους 96oC, με τη χρήση διαλύματος υψηλού pH (pH 9) [Envision FLEX TARGET RETRIEVAL SOLUTION HIGH pH(50x), της εταιρείας Dako]. 4. Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση των τομών σε διάλυμα H₂O₂ 3% για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. 5. Ολονύκτια επώαση των τομών με το πρωτογενές αντίσωμα RRM1 [RRM1 (D12F12(XP)), Rabbit mAb, της εταιρείας Cell Signaling], σε αραιώση 1:100 6. Επώαση των τομών με ειδικό αντιδραστήριο δέσμευσης του πρωτογενούς αντισώματος (Post Antibody blocking, της εταιρείας Immunologic), για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το αντιδραστήριο αυτό είναι έτοιμο προς χρήση

(Ready-to-use) και χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της χρώσης και την αύξηση της ευαισθησίας. 7. Επώαση των τομών με πολυμερές αποτελούμενο από υπεροξειδάση και δευτερογενές αντίσωμα ειδικό για ανοσοσφαιρίνες ποντικού / κουνελιού / αρουραίου (Poly-HRP-Anti-mouse / rabbit / rat IgG, της εταιρείας Immunologic), για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. 8. Επώαση των τομών σε διάλυμα διαμινοβενζιδίνης (DAB), για 6 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. Το χρωμογόνο αυτό χρησιμοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί αναγνώριση των ανοσοσυμπλεγμάτων με το κοινό μικροσκόπιο. 9. Χρώση του υποστρώματος σε διάλυμα αιματοξυλίνης για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά των ιστών ή κυττάρων. 10. Αφυδάτωση με ανιόντα διαλύματα αιθανόλης (70%, 80%, 96%, 100%). 11. Βύθιση των τομών σε ξυλόλη. 12. Επίστρωση των τομών και επικάλυψή τους με καλυπτρίδα. Μετά το πέρας κάθε ενός από τα παραπάνω βήματα, θα γίνει ξέπλυμα των τομών με Wash Buffer [Envision FLET WASH BUFFER (20x), της εταιρείας Dako].

Αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της πρωτεΐνης RRM1

Σε κάθε δείγμα βιώσιμων νεοπλασματικών κυττάρων που θα απομονωθούν από την ομάδα ελέγχου όπως και από **την ομάδα των 69 ασθενών** της παρούσας κλινικής μελέτης θα υπολογιστεί η ένταση της κυτταροπλασματικής χρώσης (0: απύουσα, 1: ασθενής, 2: ήπια, 3: έντονη) και το ποσοστό των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων (0: απόντα, 1: 50%). Η έκφραση του κάθε δείγματος προέκυψε από το γινόμενο των δύο παραμέτρων, ενώ θετικό θα θεωρηθεί κάθε αποτέλεσμα ≥ 6 (199). Ως θετικός μάρτυρας θα χρησιμοποιηθεί δείγμα από αδενοκαρκίνωμα παρωτίδας ενώ σαν αρνητικός τομέας του ιστού του δείγματος με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, χωρίς την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος.

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

Η γονοτυπική ανάλυση των όγκων της Ομάδας ελέγχου και της Ομάδας μελέτης θα πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Μοριακής Ογκολογίας των εργαστηρίων myoncotherapy.com της εταιρείας biogenea.gr χρησιμοποιώντας πολυγονιδιακό πάνελ γονιδίων της illumina που στοχεύει τις πιο συχνές και επικρατέστερες μεταλλάξεις όπως έχουν περιγραφεί από τη βάση δεδομένων / Ατλάντας Καρκινικού Γονιδιώματος (The Cancer Genome Atlas, TCGA) στο MMKII. Η ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου TERT για τις πιο συχνές μεταλλάξεις (mutation hotspots) θα πραγματοποιηθεί με αλληλούχηση DNA κατά Sanger. Κατά τον σχεδιασμό του πάνελ, η αντιστοίχιση των αναγνώσεων DNA των περιοχών-στόχων που παρήχθησαν από την πρωτοπαγή ανάλυση στο ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς (GRCh37 / hg19) θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας τη ροή διοχέτευσης εντολών διεργασιών Ampliseq (Thermo Fisher Scientific / Ion Torrent) με σκοπό τον σχεδιασμό εκκινητών που οδηγούν στην παραγωγή πολλαπλασιαζόμενων αλληλουχιών-στόχων (amplicons) μεγέθους έως 175 ζευγών βάσεων τα οποία προέρχονται από το DNA που έχει απομονωθεί από τον ιστό των κύβων των εγκλεισμένων σε παραφίνη. Η ειδικότητα των εκκινητών θα αξιολογηθεί περαιτέρω χρησιμοποιώντας το εργαλείο NCBI-BLAST. Το ειδικά σχεδιασμένο πάνελ που θα εφαρμοστεί, IAD68363_167Ampliseq, θα καλύπτει μια συνολική αλληλουχία 31.6 kb στοχεύοντας σημειακές μεταλλάξεις, δηλαδή παραλλαγές του ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Variants, SNVs) και απαλείψεις / εισχωρήσεις (Insertions και Deletions, InDels) στα γονίδια των EGFR, KRAS, NRAS, ERBB2, MET, MAP2K1, PIK3CA, AKT1, FGFR2, FGFR3, DDR2, ALK, ROS1, RET, TRK1 / 2 / 3, BRAF, MYC, CCND1, CDK4, EML4-ALK, BCL2 και VEGF. Το πάνελ αυτό σχεδιάστηκε στην illumina στοχεύοντας γονίδια που εμφανίζουν συχνά μεταλλάξεις στο MMKII, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία της αυτής χρονικής περιόδου. Θα ακολουθήσει η κατασκευή των DNA βιβλιοθηκών και η γονοτύπηση αυτών θα πραγματοποιηθεί μέσω της μεθοδολογίας του NGS χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα (γενετικός αναλυτής επόμενης γενιάς) Ion Personal Genome Machine (Thermo Fisher / Ion Torrent). Η εξαγωγή των δεδομένων, η ανίχνευση των βάσεων (base calling) και η δημιουργία των αναγνώσεων των αλληλουχιών θα πραγματοποιηθεί στον διακομιστή Torrent χρησιμοποιώντας τη σουίτα Torrent Suite v.4.4.2, ενώ θα ακολουθήσει κατακερματισμός των αλληλουχιών προσαρμογής, αντιστοίχιση των αναγνώσεων του DNA που προέκυψαν στο γονιδίωμα αναφοράς και ανίχνευση των γενετικών παραλλαγών (variant calling). Οι γενετικές παραλλαγές που θα προκύψουν θα εμπλουτισθούν με πληροφορίες από το Ion Reporter v.4 και θα γίνουν αποδεκτές για ανάλυση μόνο όσες πληρούσαν τα εξής κριτήρια:

– Τουλάχιστον 100 αναγνώσεις για κάθε πολλαπλασιαζόμενη περιοχή του DNA (>100 amplicon reads)

– Κάθε βάση της αλληλουχίας του DNA να έχει διαβασθεί τουλάχιστον 100 φορές (position coverage >100)

– Κάθε γενετική παραλλαγή να έχει διαβασθεί τουλάχιστον 40 φορές (variant coverage >40) για τις χειρότερα διαβασμένες παραλλαγές (100 αναγνώσεις).

Οι απαλείψεις / εισχωρήσεις (InDels) που θα παρουσιάσουν μεγάλο ποσοστό των δινουκλεοτιδίων GC και οι μη εμπλουτισμένες γενετικές παραλλαγές δεν θα συμπεριληφθούν στην περαιτέρω ανάλυση. Στο συγκεκριμένο πάνελ το κατώφλι για την καταλληλότητα των δειγμάτων θα οριστεί ως μέσο βάθος ανάγνωσης 150 φορές και ο αριθμός των παραλλαγών θα είναι ≥ 5 . Για τα δείγματα στα οποία δεν θα ανιχνευθούν μεταλλάξεις το κατώφλι για την καταλληλότητα των δειγμάτων θα οριστεί ως βάθος ανάγνωσης 300 φορές. Με βάση τα παραπάνω, τα 75 από τα 80 δείγματα των ιστών εγκλεισμένων σε κύβους παραφίνης αλλά και των φρέσκων ιστών που θα προέρχονται από ίσο αριθμό ασθενών αναμένεται να είναι κατάλληλα για ανάλυση. Για αυτά τα δείγματα οι μέσες / διάμεσες τιμές για το μέσο βάθος ανάγνωσης αναμένεται να είναι 435 / 305 (εύρος: 185-3524), ενώ οι μέσες / διάμεσες τιμές για τον αριθμό των κατάλληλων γενετικών παραλλαγών αναμένεται να είναι 23 / 22 (εύρος: 5-206). Οι παραλλαγές που θα πληρούν τα κριτήρια καταλληλότητας θα χαρακτηρίζονται ως μεταλλάξεις, εφόσον οδηγούν στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος ή σε αλλαγή στην περιοχή του ματίσματος και η ελάσσονα συχνότητα αυτών (Minor Allele Frequency, MAF) θα είναι $<0.1\%$, σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων dbSNP, 5000 Exomes και ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>). Παρακάτω αναφέρονται γονίδια που

ελέγχονται από το συγκεκριμένο πάνελ για εντόπιση μεταλλάξεων (SNVs + Indels) και δομικών γενετικών αλλαγών (CNAs + rearrangements). Η κατασκευή των βιβλιοθηκών του DNA που θα απομονωθούν από ιστούς εγκλεισμένους σε κύβους παραφίνης θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit (Integrated DNA Technologies, Iowa, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, θα πραγματοποιηθεί θραύση του DNA (60-250ng) με ενζυμικό τρόπο στους 32oC για 7 λεπτά, θα ακολουθήσει η αντίδραση σύνδεσης των προσαρμογέων με τη λιγάση στους 20oC για 20 λεπτά και καθαρισμός με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η Λίστα των μικρών ενθέσεων και ελλειμμάτων (Small Insertions και Deletions, InDels) και των αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων του DNA των γονιδίων (Copy Number Alterations, CNAs) και των γονιδιακών αναδιατάξεων (rearrangements) που θα ελέγχονται κατά την ανάλυση του προφίλ του όγκου θα συμπεριλαμβάνει τα παρακάτω: Single Nucleotide Variants / Insertions και Deletions: PDGFRA, NTRK3, NTRK2, NTRK1, NRAS, MYCN, MYC, MTOR, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, ETV5, FGFR1, ETV4, ETV1, ESR1, CTNNB1, DDR2, EGFR, EGFRvIII, ERBB2, (HER2), ERBB3, ERBB4, ERG, CDK6, AKT1, ALK, AR, AXL, BRAF, CCND1, CDK4, PIK3CA, PPARG, RAF1, RET, ROS1, και SMO. Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση PCR για σήμανση των δειγμάτων με ειδικά μόρια-δείκτες (indexes) και ένας ακόμη καθαρισμός με σφαιρίδια στρεπταβιδίνης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των DNA βιβλιοθηκών θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας το σύστημα 4150 AgilentTapestation (D1000 ScreenTape, Agilent, Waldbronn, Germany). Ο εμπλουτισμός των DNA βιβλιοθηκών για τις γενωμικές περιοχές ενδιαφέροντος θα πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας μία μέθοδο υβριδισμού (TACS, TArget Capture Sequences) ειδικά σχεδιασμένη για την ενίσχυση των επιλεγμένων περιοχών των γονιδίων ενδιαφέροντος. Οι περιοχές που θα ενισχυθούν μέσω του υβριδισμού θα ακινητοποιούνται σε σφαιρίδια στρεπταβιδίνης, ώστε να ακολουθήσει υβριδισμός με τις DNA βιβλιοθήκες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Μία ειδικά σχεδιασμένη μέθοδος ανάλυσης του προφίλ του όγκου από το εργαστήριο της myoncotherapy.com θα χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των παραλλαγών της βάσης ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Variants, SNVs), των μικρών ενθέσεων και ελλειμμάτων (Small Insertions και Deletions, InDels) και των αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων του DNA των γονιδίων (Copy Number Alterations, CNAs) και των γονιδιακών αναδιατάξεων (rearrangements). Τα δείγματα που θα έχουν εκλυσθεί θα πολλαπλασιαστούν χρησιμοποιώντας ειδικά προσαρμοσμένους εκκινητές. Θα ακολουθήσει η αλληλούχιση των εμπλουτισμένων DNA βιβλιοθηκών στην πλατφόρμα NextSeq του οίκου Illumina (Illumina, Skai iego, USA).

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

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

WES

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

RNA-seq.

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

In-silico φαρμακοκινητικές μελέτες

Διαπερατότητα αιματοεγκεφαλικού φραγμού

Αρχικά θα διερευνηθεί η διαπερατότητα των ενώσεων αυτών του συμπλέγματος των ταξινομημένων κβαντομοριακά και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM με τα ανοσογονικά αντιγονικά πεπτίδια των TAAS-(CAGE, GBU4-5, HUD, NY-ESO-1, P53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HUC, και ESO1) σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της paclitaxel 200 mg / m², carboplatin auc 6 (iv) και του αναστολέα της pembrolizumab από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB, Blood Brain Barrier). Για σκοπό αυτό θα χρησιμοποιηθεί λογισμικό VolSurf το οποίο παρέχει τη δυνατότητα πρόβλεψης της διαπερατότητας από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μέσω μαθηματικού μοντέλου BBB.

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

1. Προγράμματα Προετοιμασίας (Preparation Programs)

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

- Σύνολο εργαλείων για τη δημιουργία αρχείων οργανικών μορίων τα οποία στη συνέχεια μπορούν να διαβαστούν από το πρόγραμμα LEaP.

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

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

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

- Δημιουργία νέων αμινοξέων και μορίων χρησιμοποιώντας απλές εντολές

- Ένωση αμινοξέων και δημιουργία με τους χωρίς δεσμούς συμπλόκων μορίων (nonbonded complexes of molecules)

- Τοποθέτηση αντισταθμιστικών ιόντων (counterions) γύρω από το μόριο

- Διαλυτοποίηση μορίων διάφορους διαλύτες

- Μετατροπή εσωτερικών συντεταγμένων στο μόριο

- Δημιουργία αρχείων που περιέχουν την τοπολογία (prmtcd) και τις παραμέτρους του συστήματος (prtp)

2. Προγράμματα Προσομοίωσης (Simulation Programs)

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

3. Προγράμματα Ανάλυσης (Analysis Programs). Ptraj

Πρόγραμμα στο οποίο επεξεργάζονται αναλύονται 30 συντεταγμένες αρχεία τραχειών

- Υπολογίζονται οι γωνίες μεταξύ των ατόμων
- Υπολογίζεται η μέση διαμορφωτική δομή
- Υπολογίζονται οι αποστάσεις μεταξύ επιλεγμένων ατόμων
- Αναλύονται οι δεσμοί υδρογόνου
- Υπολογίζονται οι συναρτήσεις συσχετισμού

MM-PBSA

Μέθοδος για τον υπολογισμό των ελεύθερων ενεργειών της πρόσδεσης των μορίων σε διάλυμα

• PMEMD (Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics) Βελτιστοποιημένη έκδοση του προγράμματος Sander για περιοδικές, Particle mesh Ewald (PME) και Generalized Born (GB) προσομοιώσεις.

ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΚΒΑΝΤΟΜΟΡΙΑΚΩΣ ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΩΝ ΝΕΟΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ MicrolynaqTM ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΑ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΩΝ ΤΑΑΣ-(CAGE, GBU4-5, HUD, NY-ESO-1, P53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HUC, ΚΑΙ ESO1) ΣΕ MOL2 ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΤΗΣ PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΗΣ PEMBROLIZUMAB ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK FUSION, BCL2 ΚΑΙ VEGF ΟΠΩΣ ΚΑΙ ΕΠΙ ΤΩΝ MIR-26A, MIR-30D, MIR-34A, MIR-146A, MIR-155, MIR-195, MIR-200B, MIR-200C, MIR-202 ΚΑΙ MIR-223 ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ

Οι υπολογισμοί προσομοίωσης Μοριακής Δυναμικής θα πραγματοποιηθούν με το πρόγραμμα AMBER και με τη χρήση του PMEMD. Το πεδίο δυνάμεων 19958 θα χρησιμοποιηθεί για την παραμετροποίηση των πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK FUSION, BCL2 και VEGF όπως και επί των mir-26a, mir-30d, mir-34a, mir-146a, mir-155, mir-195, mir-200b, mir-200c, mir-202 και mir-223 μικρογονιδιακών μικρο-ριβονουκλεϊνικών στόχων. Για την παραμετροποίηση του προσδετών του συμπλέγματος των ταξινομημένων κβαντομοριακώς και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM με τα ανοσογονικά αντιγονικά πεπτίδια των ΤΑΑΣ-(CAGE, GBU4-5, HUD, NY-ESO-1, P53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HUC, και ESO1) σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της paclitaxel 200 mg / m², carboplatin auc 6 (iv) και του αναστολέα της pembrolizumab θα εφαρμοστεί το πρόγραμμα ANTECHAMBER το οποίο χρησιμοποιεί το πεδίο δυνάμεων General AMBER force field (GAFF) και τη μέθοδο AM1-BCC για τον υπολογισμό των φορτίων. Τα λογισμικά NetMHCpan έκδοση 2.4, DeppNeoVX και SEQ2NEO θα χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό και σχεδιασμό των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM νεοεπιτόπων που θα περιέχουν μεταλλάξεις και θα προβλέπεται ότι θα συνδέονται με τα μόρια MHC κατηγορίας I για κάθε μεμονωμένο ασθενή. Έως 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) πεπτίδια θα προσομειώνονται σε κάθε μελέτη μοριακής δυναμικής ανά ασθενή και στα οποία θα δίνεται προτεραιότητα και θα χρησιμοποιούνται ως δεδομένα εισαγωγής στον αλγόριθμο BiogenetoligandrolTM designed by Grigoriadis Ioannis για το σχεδιασμό, την κατηγοριοποίηση των κβαντομοριακών ιδιοτήτων τους με σκοπό την παρασκευή των προαναφερομένων εμβολίων MicrolynaqTM αποτελούμενων από πεπτίδια με την καλύτερη ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης, μοριακή συγγένεια πρόσδεσης και με τη βέλτιστη δυνατή ανοσογονική δράση επι των μοριακών στόχων των PDGFRA, NTRK3, NTRK2, NTRK1, NRAS, MYCN, MYC, MTOR, FGFR2, FGFR3, FGFR4, GNA11, GNAQ, HRAS, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, ETV5, FGFR1, ETV4, ETV1, ESR1, CTNNB1, DDR2, EGFR, EGFRvIII, ERBB2, (HER2), ERBB3, ERBB4, ERG, CDK6, AKT1, ALK, AR, AXL, BRAF, CCND1, CDK4, PIK3CA, PPARG, RAF1, RET, ROS1, και SMO. Για την προσομοίωση των μορίων του διαλύτη θα χρησιμοποιηθεί μοντέλο επιδιαλυτοποίησης TIP311 με διαλύτη νερό.

Μελέτες Μοριακής Δυναμικής

Για τη διερεύνηση της σταθερότητας του συμπλέγματος των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM, ταξινομημένων κβαντομοριακώς με τα ανοσογονικά αντιγονικά πεπτίδια των ΤΑΑΣ-(CAGE, GBU4-5, HUD, NY-ESO-1, P53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HUC, και ESO1), σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της paclitaxel 200 mg / m², carboplatin auc 6 (iv) και του αναστολέα της pembrolizumab θα πραγματοποιηθούν υπολογισμοί Μοριακής Δυναμικής με τη χρήση του προγράμματος AMBER.

Παραγωγή εξατομικευμένων MicrolynaqTM εμβολίων συμπλόκων νεοαντιγονικών πεπτιδίων ασθενή με ΤΑAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) MKKII αντιγόνα

Τα εξατομικευμένα MicrolynaqTM εμβόλια νεοαντιγόνου ασθενή θα παρασκευαστούν με βάση την ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του εξώματος (WES) και των δεδομένων RNA-seq που θα δημιουργούνται από πρόσφατα κατεψυγμένους όγκους ή φρέσκους όγκους που θα είναι διαθέσιμοι ως ιστός ενσωματωμένος σε παραφίνη (FFPE) σταθεροποιημένος σε φορμαλίνη ή ως

φρέσκος ιστός που θα λαμβάνεται κατά τη στιγμή της διαγνωστικής εκτομής. Το WES του φυσιολογικού ιστού θα δημιουργηθεί από αυτόλογο DNA PBMC. Λεπτομέρειες για τα πρωτόκολλα WES και RNA-seq θα βρεθούν στις Συμπληρωματικές Πληροφορίες. Όλες οι κυτταρικές σειρές θα διατηρούνται σε συγκεκριμένες και ελεγχόμενες συνθήκες, μέσα σε ειδικό επωαστικό κλίβανο (incubator-chamber), όπου θα επιτυγχάνεται σταθερή θερμοκρασία στους 370 C, 5% διοξείδιο του άνθρακα (CO2) και σχετική υγρασία υψηλότερη από 95%. Η εύρυθμη ανάπτυξη (κυτταρική έκπτυξη) όλων των κυττάρων πραγματοποιείται σε θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) σε τελική συγκέντρωση 1X, εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS: Fetal Bovine Serum), 2 mM L-γλουταμίνη (L-glutamine), 1 mM πυροσταφυλικό νάτριο (Sodium pyruvate), 50 mM όξινο διανθρακικό νάτριο (Sodium bicarbonate), 1X διαλύματος μη-απαραίτητων αμινοξέων (Non-essential amino acids) και ένα κοκτέιλ αντιβιοτικών πενικιλίνης (Penicillin) (100 U / ml) / στρεπτομυκίνης (Streptomycin) (100 μg / ml) για την αποφυγή ενδεχόμενων βακτηριακών μολύνσεων. Τα HLA κατηγορίας 1 και 2 τα οποία είναι δύο κατηγορίες μορίων HLA (αντιγόνα ανθρώπινων λευκοκυττάρων), το μόριο HLA τάξης 1 παρουσιάζει αντιγόνα σε κυτταροτοξικά T κύτταρα με υποδοχείς CD8+, ενώ το μόριο HLA τάξης 2 παρουσιάζει αντιγόνα στα βοηθητικά T κύτταρα με υποδοχείς CD4+ και είναι σημαντικά ως αντιγόνα μεταμόσχευσης θα αξιολογηθούν με τη χρήση μοριακής τυποποίησης PCR κατηγορίας I και II (BWH Tissue Typing Laboratory) και με την εφαρμογή των ακόλουθων τεχνικών: α) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης με τη χρήση ειδικής αλληλουχίας εκκινητών (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers, PCR-SSP) και β)) Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης-Ανάστροφος Υβριδισμός (Polymerase Chain Reaction—reverse dot blot). Ο προσδιορισμός των συχνοτήτων HLA αλληλομόρφων γονιδίων θα γίνει με τον τύπο του Brenstein : $GF=1-\sqrt{1-AgF}$ Ενώ η σύγκριση των αλληλομόρφων θα γίνει με τον υπολογισμό του χ^2 , η γενετική απόσταση θα υπολογιστεί με βάση την γονιδιακή συχνότητα βάσει του τύπου $cavalli-sfortza:D = 4(1- \cos\theta) / k-1$ όπου $\cos\theta = \sum \sqrt{(Gf_iA)(Gf_iB)}$ καθώς ο προσδιορισμός των HLA γονιδίων με εφαρμογή της DNA τεχνολογίας καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό HLA ειδικοτήτων, οι οποίες δεν ανιχνεύονται με εφαρμογή των παραδοσιακών ορολογικών και κυτταρικών τεχνικών. Στη συνέχεια θα εντοπιστούν κωδικοποιητικές μεταλλάξεις και θα προβλεφθούν προσωπικά νεοαντιγόνα με βάση τις προαναφερόμενες μελέτες προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής για την αξιολόγηση της προβλεψής της ανοσογονικής δράσης του συμπλέγματος εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων Microlynaq™ ταξινομημένων κβαντομοριακά και αναμειγμένων με τα ανοσογονικά και αντιγονικά πεπτίδια τω -TAAS-(CAGE, GBU4-5, HUD, NY-ESO-1, P53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HUC, KAI ESO1) σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της paclitaxel 200 mg / m², carboplatin auc 6 (iv) και του αναστολέα της pembrolizumab κατά των υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK FUSION, BCL2 και VEGF όπως και επί των mir-26a, mir-30d, mir-34a, mir-146a, mir-155, mir-195, mir-200b, mir-200c, mir-202 και mir-223 μικρογονιδιακών στοχών με στόχο την ανάλυση κβαντομοριακής συγγένειας ελεύθερης ενέργειας δέσμευσης μεμονωμένων αλληλομόρφων HLA γονιδίων χρησιμοποιώντας εργαλεία πρόβλεψης δέσμευσης MHC κατηγορίας I όπως NetMHCpan έκδοση 2.422, DeepNeoVX και SEQ2NEO IC50 < 500 nM για επιλεγμένους επιτόπους. Επίσης, θα υπάρχει αναλυτική παρουσίαση των πολυμερικών υποστρωμάτων και των αμινοπροστατευτικών ομάδων που χρησιμοποιούνται στην πεπτιδική σύνθεση σε στερεή φάση. Σε αυτή την κλινική μελέτη θα περιγράφονται οι μέθοδοι ταυτοποίησης και καθαρισμού πεπτιδίων. Συγκεκριμένα, θα περιγράφονται η αρχή μεθόδου της διαπίδυσης, της υγρής χρωματογραφίας αναστροφής φάσης και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και της φασματοσκοπίας μάζας ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο. Αυτή η κλινική μελέτη αφορά την τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία για τη διαμορφωτική ανάλυση των QMMM-ταξινομημένων νέο-πεπτιδίων με τα -TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) MKKΠ αντιγόνα. Συγκεκριμένα, θα παρουσιάζονται αναλυτικά οι βασικές αρχές της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωϊσμού και ο τρόπος μελέτης της δευτεροταγούς διαμόρφωσης των αναμειγμένων νέο-επιτοπικών πεπτιδίων με πρωσοποποιημένα και **αναμειγμένα** -TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) πεπτιδικά ανάλογα σε διάλυμα. Σε αυτή την κλινική μελέτη θα περιγράφονται συνοπτικά οι βασικές αρχές της συνεστιακής μικροσκοπίας (Confocal Microscopy), η οργανολογία που χρησιμοποιείται και τα πλεονεκτήματα της μεθόδου που την καθιστούν ως την πλέον διαδεδομένη τεχνική μελέτης τόσο «ζωντανών» αλλά και μονιμοποιημένων «fixed» συστημάτων. Σε αυτή την κλινική μελέτη θα δίνεται η πορεία διεξαγωγής των πειραμάτων της διαμεμβρανικής μεταφοράς των πεπτιδίων με τη συνεστιακή μικροσκοπία και παράλληλα θα παρουσιάζονται οι φωτογραφίες των κυττάρων σε διάφορες τομές του.

Βιοπληροφορική στατιστική ανάλυση και προσδιορισμός επιτόπων-στόχων για τον σχεδιασμό του Microlynaq-TM VACCINES.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων οι κατηγορικές μεταβλητές θα παρουσιαστούν με ποσοστά όπως και οι συχνότητες και οι συνεχείς μεταβλητές χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους διάμεσο και ελάχιστο-μέγιστο. Η συνολική επιβίωση θα οριστεί ως ο χρόνος που πέρασε από τη διάγνωση του καρκίνου μέχρι τον θάνατο ή την τελευταία ημερομηνία χορήγησης των Microlynaq-TM VACCINE στον / στην ασθενή. Η μέθοδος Kaplan-Meier θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της πιθανότητας να είναι ένας ασθενής ελεύθερος συμβάματος κατά τη διάρκεια της χορήγησης των Microlynaq-TM VACCINES. Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή λόγων κινδύνου (hazard ratios) οι οποίοι αναμένεται να παρουσιαστούν με διαστήματα εμπιστοσύνης 95%. Το test log-rank θα χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση των πιθανοτήτων ελεύθερου συμβάματος μεταξύ υποομάδων ασθενών. Το επίπεδο σημαντικότητας θα οριστεί στο 0.05 για όλα τα στατιστικά test. Στο σύνολο των αποτελεσμάτων της Ομάδας μελέτης των 69 ασθενών θα πραγματοποιηθούν συσχετίσεις μεταξύ κατηγορικών και συνεχών μεταβλητών και θα χρησιμοποιηθεί η μη παραμετρική δοκιμή Wilcoxonrank-sum test, ενώ για συγκρίσεις κατηγορικών μεταβλητών θα χρησιμοποιηθεί το test X-τετράγωνο ή το Fisher's Exact Test (κατά περίπτωση). Όλες οι παράμετροι θα ελεγχθούν για αναλογικότητα με τη χρήση χρονοεξαρτώμενων μεταβλητών. Στη συνέχεια θα πραγματοποιηθούν μονοπαραγοντικές και πολυπαραγοντικές αναλύσεις παλινδρόμησης Cox για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ των παραγόντων ενδιαφέροντος και των ποσοστών θνησιμότητας. Ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο αναλογικής παλινδρόμησης κινδύνου Cox, θα εφαρμοστεί το οποίο θα περιλαμβάνει την ηλικία, την κατάσταση των μεταλλάξεων της TERT [μεταλλαγμένη έναντι αγρίου τύπου (wt)], την κατάσταση των μεταλλάξεων του

NF1 (μεταλλαγμένη έναντι wt), την κατάσταση των μεταλλάξεων IDH1 / 2 (μεταλλαγμένη vs wt), και την κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή MGMT (μεθυλιωμένη vs μη μεθυλιωμένη), παράμετροι που έδειξαν στατιστική σημαντικότητα στις μονοπαραγοντικές αναλύσεις ($p < 0.005$). Η ανάλυση επιβίωσης θα πραγματοποιηθεί επιπλέον στην ομάδα των ασθενών της παρούσας κλινικής μελέτης που θα εμβολιασθούν με Microlynaq-TM VACCINE και έχουν διαγνωσθεί με wtIDH1 / 2 όγκους. Παρόμοια με τις αναλύσεις που θα πραγματοποιηθούν για το σύνολο των 69 ασθενών της Ομάδας μελέτης θα αξιολογηθεί η επίδραση των μεταλλάξεων TERT κατά την προσαρμογή για όλες τις παραμέτρους που αναμένεται να δείξουν σημαντικότητα ή αποκαλύψουν τάση προς σημαντικότητα ($p < 0.10$) στη μονοπαραγοντική ανάλυση (ηλικία, κατάσταση μετάλλαξης NF1, κατάσταση μετάλλαξης TP53, αριθμός μεταλλαγμένων γονιδίων ανά όγκο και κατάσταση μεθυλίωσης του υποκινητή MGMT). Όλες οι δοκιμές θα είναι αμφίπλευρες σε επίπεδο σημαντικότητας άλφα 5%. Δεν θα πραγματοποιηθεί προσαρμογή για πολλαπλές συγκρίσεις. Για τη στατιστική ανάλυση θα χρησιμοποιηθεί η έκδοση 9.3 της SAS (SAS Institute) και για την παραγωγή διαγραμμάτων επιβίωσης και χαρτών με το πρότυπο μετάλλαξης των γονιδίων θα χρησιμοποιηθεί η έκδοση 3.5.0 του R studio. Επίσης, οι παραλλαγές που θα πληρούν τα κριτήρια επιλογής για την σπανιότητα (συχνότητα ελάσσονος αλληλομόρφου $< 0.1\%$ σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων dbSNP, 5000 Exomes και ExAC) θα ταυτοποιηθούν στις κωδικές περιοχές και τις περιοχές ματίσματος. Η κατηγοριοποίηση και η ερμηνεία των γενετικών παραλλαγών θα πραγματοποιηθεί σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων ClinVar και COSMIC. Οι γενετικές παραλλαγές που αφορούν την αλλαγή του αριθμού των αντιγράφων των γονιδίων θα ανιχνευθούν χρησιμοποιώντας μια εσωτερική ροή διοχέτευσης εντολών διεργασιών που εφαρμόζει μια κυκλική δυαδική μέθοδο διαχωρισμού. Η ανίχνευση και το ποσοστό έκφρασης των γενωμικών αναδιατάξεων πριν και μετά τον εμβολιασμό με Microlynaq-TM VACCINE θα πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας ζευγάρωμα βάσεων που δεν θα είναι σε συμφωνία διαιρώντας τα αρχεία ανάγνωσης που θα έχουν προηγουμένως αντιστοιχηθεί ακολουθώντας τοπική συνδεσμολογία και αντιστοίχιση εκ νέου για την εφαρμογή μιας ροής διοχέτευσης εντολών διεργασιών εσωτερικής χρήσης, προκειμένου να τελειοποιηθεί η σειρά των υποψήφιων γενωμικών γεγονότων. Τα NetMHCpan έκδοση 2.4, DeppNeoVX και SEQ2NEO θα χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό νεοεπιτόπων που θα περιέχουν μεταλλάξεις και θα προβλέπεται ότι θα συνδέονται με τα μόρια MHC κατηγορίας I για κάθε μεμονωμένο ασθενή. Έως (60) βιβλιογραφικώς επιβεβαιωμένα TAAs ανοσογόνα πεπτίδια και 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) εξατομικευμένα νέο-πεπτίδια θα σχεδιάζονται για κάθε ασθενή τα οποία θα αποτελούνται κατά μέσο όρο από 7-13 AAs το καθένα προερχόμενα από σωματικές μεταλλάξεις από τους ίδιους τους ασθενείς όπου αναμένεται να προκύψουν έως και 40 ανεξάρτητες μεταλλάξεις στις οποίες θα δίνεται προτεραιότητα και θα χρησιμοποιούνται ως δεδομένα εισαγωγής στον αλγόριθμο BiogenetoligandorolTM designed by Grigoriadis Ioannis για το σχεδιασμό και παρασκευή των προαναφερόμενων νέο-αντιγονικών πεπτιδίων. Οι μεταλλάξεις στα ογκογονίδια θα έχουν την υψηλότερη προτεραιότητα σε κάθε ομάδα που θα κατατάσσεται. Θα χρησιμοποιούνται μόνο sSNV που έδειξαν έκφραση του μεταλλαγμένου αλληλόμορφου. Επιπλέον, θα ληφθεί υπόψη μια ποικιλία πιθανών βιοχημικών ιδιοτήτων (υδροφοβία ή παρουσία πολλαπλών κυστεϊνών), που θα μπορεί να επηρεάσουν τη δυνατότητα σύνθεσης ή διαλυτότητα των (LIMPs, ASPs και bEPTs) πεπτιδίων.

Σύνθεση των Microlynaq-TM VACCINE, συγκέντρωση και τελική παρασκευή εμβολίου.

(60) βιβλιογραφικώς επιβεβαιωμένα TAAs ανοσογόνα πεπτίδια και 17-25 (GMP) (LIMPs, ASPs και bEPTs) πεπτίδια μήκους 7-13 αμινοξέων θα συντεθούν με χημεία συνθετικών πεπτιδίων στερεάς φάσης και θα καθαριστούν χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) (CSBio). Κάθε ένα από το Microlynaq-TM VACCINE θα αποτελείται από (60) βιβλιογραφικώς επιβεβαιωμένα TAAs ανοσογόνα πεπτίδια και 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) εξατομικευμένα συνθετικά νεοαντιγονικά πεπτίδια τα οποία θα είναι αναμεμιγμένα με (MKKII)-TAAs, συμπεριλαμβανομένων των ταξινομημένων -TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) MMKII αντιγόνων. Τα φαρμακευτικά προϊόντα / εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE θα αποτελούνται από 17-25 πεπτίδια από την αποθήκη της Biogenea Pharmaceuticals Ltd τα οποία θα είναι αναμεμιγμένα με τα TAAs των εξής ανοσογονικών πεπτιδίων: SP17-προερχόμενων πεπτιδίων (NIPAFAAAYF), (IPAFAAAYF), (AVKIQAAFR), (NIPAFAAAYF), (REQPDNIPA), AKAP4-προερχόμενων πεπτιδίων (YADQVNIDYL), (RSHRGVCKV), (ISPDGECSE), (ISPDGECSE), (VISPDGECSE), PTTG1-προερχόμενων πεπτιδίων (STPRFGKTFD), (QVSTPRFGK), (GSGPSIKAL), (QVSTPRFGK), (FDAPPALPK), MAGE-A1 (KVLEYVIKV), MAGE-A2 (YLQLVFGIEV), MAGE-A3.1 (KVAELVHFL), MAGE-A3.2 (FLWGPRLV279), MAGE-A4 (GVYDGREHTV), MAGE-A9 (ALSVMGVYV), MAGE-A10 (GLYDGMELH), NY-ESO-1 (CTAG1B)-(SLLMWITQC), CAMEL (CTAG2)-(MLMAQEALAF), WT-1 (RMFPNAPYL), MUC-1 (LLLLTVLTV), SS393-(GYDQIMPCK), SS391-(PYGYDQIMPCK), DEK-AFF2-προερχόμενων peptide (DKESEEEVS), MYB-NFIB-προερχόμενων πεπτιδίων (QFIDSSWYL, SLASPLQPT and SLASPLQSWYL), NFIB-MYB-προερχόμενων peptide (MMYSPICLTQT), SURVIVIN (BIRC5)-(ELTLGEFLKL), HER2 (ERBB2)-(KIFGSLAFL), GLULD1-(FLPEFGISSA), BRAF-προερχόμενων πεπτιδίων (GDFGLATEK, IGDFGLATEK, and IGDFGLATEKSRWSGSH), EGFR-προερχόμενων πεπτιδίων (KITDFGRK, LLLLLTVLTV, STAPPVHNV, ALGSTAPPV, TLAPATEPA, FLSFHISNL, NLTISDVSV, KVLEHVVRV, AWRTHTP, LVFGIELMEV and AIIDGVESV)-PTPRZ1, (KVFAGIPTV)-PTPRZ1, (SLWAGVVVL)-CHI3L2, (TLGEFLKLDREKAKN)-BIRC5, (DDPSTIEKLAKNKQKP)-CDC42, (NKQKPITPETAELKARD)-CDC42, (NGAYKAIPVAQDLNAPS)-SPP1, ((TLGEFLKLDREKAKD), (FTELTLGEF), (LMLGEFLKL), (EPDLAQCFY))-Survivin πεπτιδίων. cGAMP, (GM-CSF), (Poly-ICLC), imiquimod, CpG, σαπωνίνες και (MPLA0) ανοσοτροποποιητές θα επιλεγούν γενοτυπικά και θα προσωποποιηθούν ανάλογα με το γενετικό προφίλ του κάθε ασθενή ως προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές σε όλους τους εμβολιασμούς με Microlynaq-TM VACCINES. Τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINES θα εμπεριέχουν προσωποποιημένο ανασυνδυασμό όλων των ανοσοτροποποιητών συμπεριλαμβανομένων των (GM-CSF), (Poly-ICLC), imiquimod, CpG, σαπωνίνες A που συσχετίζονται με λιποσπορίνες. Τα Microlynaq-TM VACCINE είναι ανασυνδυασμένα νεοεπιτοπικά και προσωποποιημένα εμβόλια για τον καρκίνο, θα συνοδεύεται με Tetanus Toxoid, Poly-ICLC, GM-CSF, Imiquimod, και Immune Checkpoint inhibitors και θα αποτελούνται από 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) κατά μέσο όρο 7-13 Αμινοξέων για την αποτελεσματική διέγερση των αντιγονοειδικών CD4+ και CD8+ T κυττάρων σε 17 έως 21 εβδομάδες με εξαιρετικό προφίλ ασφάλειας. Η διαφορά στη δομή μεταξύ των

Microlynaq-TM VACCINE αφορά στο γεγονός ότι στο Microlynaq-TM VACCINE τα (ΜΚΚΠ)-TAA, συμπεριλαμβανομένων των QMMM ταξινομημένων -TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) θα αυτοσυναρμολογούνται σε μέγεθος na20m με τα εξατομικευμένα νεοαντιγόνα του κάθε ογκολογικού ασθενή και θα συνδέονται με ένα υδρόφοβο μπλοκ με σκοπό να διευκολυνθεί η σύνθεση σωματιδίων μέσω μικκυλοποίησης στον νανοφορέα και να αυξηθεί η ανοσογονικότητα των πεπτιδικών αντιγόνων. Μια ομάδα τροποποίησης φορτίου θα ενσωματώνεται στο αντίθετο άκρο για να σταθεροποιήσει τα νανοσωματίδια (μέγεθος ~ 20 nm). Τα Microlynaq-TM VACCINE θα είναι έτοιμα για χρήση 1 μήνα μετά την εγγραφή του ασθενούς στην κλινική μελέτη, καθώς αυτά τα πεπτίδια πρέπει να συντεθούν εκ νέου για κάθε ασθενή μετά την ταυτοποίηση του χηνικογενετικού προφίλ και μεταλλακτώματος των αντίστοιχων μεταλλαγμένων πεπτιδίων στα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας HLA. Τα φαρμακευτικά προϊόντα Microlynaq-TM VACCINE θα αποτελούνται από (60) βιβλιογραφικώς επιβεβαιωμένα TAAs ανοσογόνα πεπτίδια και από (17-25) de novo πεπτίδια που θα συντίθενται για κάθε έναν μεμονωμένο ασθενή ξεχωριστά.

Παραγωγή Αυτόλογων ΔΚ Δενδριτικών Κυττάρων

Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων (mononuclear cells-MNCs)

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

Καλλιέργεια CD34+ κυττάρων προς ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα)

Συμβατική καλλιέργεια σε πιάτα

Η καλλιέργειας διαφοροποίησης των CD34+ περιφερικού αίματος ασθενών που θα διαφοροποιηθούν προς ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα) θα γίνεται σε θρεπτικό μέσο Gibco® IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) με 2% Gibco® Penicillin-Streptomycin, 1% Gibco® L-Glutamine και 10% ανθρώπινου ορού από υγιείς εθελοντές δότες ή 20% ομφάλιου πλάσματος αδρανικοποιημένου συμπληρώματος (56oC για 1ώρα). 150x103 CD34+ κύτταρα θα επιστρώνονται την ημέρα 0 της καλλιέργειας σε πιάτα 12-οπών (Corning® Costar 12-well tissue culture plates) παρουσία Human Recombinant GM-CSF Protein 50 (100ng/ml) και Recombinant Human SCF (50ng/ml). Για 4 εβδομάδες τα κύτταρα θα καλλιεργούνται παρουσία των παραπάνω κυτοκινών με συνεχείς ανακαλλιέργειες ανά 3-4 ημέρες. Την 5η εβδομάδα της καλλιέργειας το κοκτέιλ των κυτοκινών της καλλιέργειας θα περιλαμβάνει Recombinant GM-CSF Protein 50 (100ng/ml) και Human Recombinant IL-4 (50ng/ml). Την ημέρα 35 τα ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα) που εκπύχθηκαν θα συλλέγονται προς ταυτοποίηση και μετέπειτα ψύξη.

Καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρες

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

Τροποποίηση παραμέτρων καλλιέργειας

Διάρκεια καλλιέργειας

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

Ορός καλλιέργειας

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

Ανοσοφαινοτυπική ανάλυση

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

Ωρίμανση παραγόμενων ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων)

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

Έλεγχος ανοσοφαινοτύπου διαφοροποίησης προς ΔΚ (Δενδριτικά Κύτταρα)

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

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

Με την κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry – FCM) ελέγχεται η έκφραση μιας πρωτεΐνης (διαλυτής ή διαμεμβρανικής) καθώς και το ποσό της εν λόγω πρωτεΐνης ή το ποσοστό των κυττάρων που την παράγουν. Απαραίτητο βήμα είναι η σύνδεση ενός αντισώματος που φέρει φθορίζουσα χρωστική (η οποία αναγνωρίζεται από το κυτταρόμετρο ροής) με την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, μία δέσμη φωτός ενός μεμονωμένου μήκους κύματος διαπερνά τη ροή ενός υγρού (π.χ. ολικό αίμα, διάλυμα με κύτταρα κ.α.). Ένας αριθμός ανιχνευτών φθορισμού περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0.2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα αντισώματα που είναι προσδεδμεμένα στα σωματίδια διεγείρονται και εκπέμπουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από ανάλυση συλλέγονται πληροφορίες σχετικά με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης). Ο ανοσοφαινότυπος ωρίμανσης των ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) που εκπύχθηκαν θα ελέγχεται αμέσως μετά την ωρίμανση και συγκριτικά μεταξύ των 69 ασθενών της παρούσας μελέτης ως προς την έκφραση συνδιεγερτικών μορίων. Πιο συγκεκριμένα στα δείγματα θα προστίθενται 10μl PerCP anti-Human CD86 (EXBIO), APC anti-Human CD40 (IMMUNOSTEP), PE anti Human CD83 (EXBIO) για επώαση και μετέπειτα ανάλυση. Με την ολοκλήρωση των καλλιεργειών ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) όλα τα δείγματα θα ταυτοποιούνται ως προς την παρουσία δεικτών ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) (CD11c, HLA-DR), αλλά και την απουσία δεικτών πλασματοειδικής προέλευσης ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) (CD123) και λοιπών αιμοποιητικών δεικτών (Lineage: CD3, CD19, CD14, CD16, CD20 & CD56). Έτσι κάθε δείγμα θα επωάζεται παρουσία 10μl APC anti-Human CD11c (EXBIO), PerCP anti-Human HLA-DR (EXBIO), PE anti-Human CD123 (EXBIO) και 5μl FITC Liquid KOMBITEST™ CD3/CD19/CD14/CD16/CD20 /CD56.

Έλεγχος ωρίμανσης με MICROLVYAQ™ Εμβόλια

Για την ωρίμανση των κυττάρων με εμβόλια η επίστρωσή τους σε πιάτα μετά την απόψυξη θα γίνεται όπως ακριβώς και στην περίπτωση των TLR-Ls. Θα ακολουθεί ωρίμανση σε συγκέντρωση 4% του τελικού όγκου ανά οπή με εμβόλια. Πιο συγκεκριμένα για την ωρίμανση θα χρησιμοποιούνται τα In-Silico σχεδιασμένα και κβαντομοριακώς κατηγοριοποιημένα νεοαντιγονικά και εξατομικευμένα Εμβόλια MICROLVYAQ™ σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab ξεχωριστά καθώς και σε διπλούς και τριπλούς συνδυασμούς για 24, 48 και 72ώρες ενώ θα υπάρχει πάντα και μία τουλάχιστον οπή μάρτυρας, χωρίς ωρίμανση.

Μορφολογική ταυτοποίηση ΔΚ (Δενδριτικών Κυττάρων) μετά την ωρίμανση με MICROLVYAQ™ Εμβόλια

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

Χρονοδιάγραμμα κλινικών συμβάντων και Δοσολογία EMBOΛΙΩΝ Microlynaq-TM

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, η μελέτη θα πραγματοποιηθεί σε ένα στάδιο. Στο στάδιο αυτό θα ενταχθούν 69 ασθενείς οι οποίοι θα εμβολιασθούν με 12 (δώδεκα) κύκλους MicrolynaqTM σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία και Pembrolizumab (MicrolynaqTM / Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV) και Pembrolizumab) για τους οποίους επίσης θα υπάρχει διαθέσιμο ιστολογικό υλικό για περαιτέρω ανάλυση με τα ίδια εμπορικά διαθέσιμα πάνελ της illumina. Η συλλογή και επεξεργασία των κύβων παραφίνης θα διενεργηθούν στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr. Η αρχική επεξεργασία θα αφορά στην ιστολογική ανασκόπηση των τομών, συμπεριλαμβανομένων της παρουσίας καρκινικών κυττάρων στο παρασκεύασμα, του ποσοστού της νέκρωσης, του ποσοστού Ki67, του βαθμού διαφοροποίησης, της ενδοθηλιακής υπερπλασίας και της επιλογής των περιοχών του όγκου για μακροεκτομή. Όλα τα παραπάνω θα πραγματοποιηθούν από συνεργαζόμενο με την Ογκολογική Ομάδα που θα συμμετέχει στην παρούσα κλινική μελέτη παθολογοανατόμο. Η ανάλυση του γονιδίου MGMT θα πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια της myoncotherapy.com στη biogenea.gr (Θεσσαλονίκη, Ελλάδα). Η μελέτη θα λάβει έγκριση από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος των Ογκολογικών Κλινικών της παρούσας κλινικής μελέτης που συνεργάζονται με Ογκολογικές Ομάδες της Ελλάδας ή και του εξωτερικού και θα πραγματοποιηθεί με βάση τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Όλοι οι ασθενείς που θα συμμετέχουν στη μελέτη θα λάβουν και θα υπέγραψουν ειδικό έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης για τη χρήση βιολογικού υλικού και τη χρησιμοποίησή του σε μελλοντικές μελέτες (informed consent).

Το χρονοδιάγραμμα κλινικών συμβάντων για τους ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον μία δόση εμβολίου Microlynaq-TM VACCINE, θα υπολογιστεί από το χειρουργείο μέχρι το θάνατο του ασθενή. Η συνολική επιβίωση θα οριστεί ως ο χρόνος που θα περάσει από τη διάγνωση του καρκίνου μέχρι τον θάνατο ή την τελευταία ημερομηνία χορήγησης των Microlynaq-TM VACCINE στον / στην ασθενή. Η μέθοδος Kaplan-Meier θα χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της πιθανότητας να είναι ένας ασθενής ελεύθερος συμβάματος κατά τη διάρκεια του εμβολιασμού του με τα Microlynaq-TM VACCINES. Η διάμεση επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) και η συνολική επιβίωση (OS) θα υπολογιστούν επίσης αντίστοιχα. Μεταξύ των εγγεγραμμένων ασθενών, μια διάμεση τιμή (110-145) σωματικών παραλλαγών ενός νουκλεοτιδίου ανά όγκο (εύρος, 75-158) θα δοκιμαστεί με μια διάμεση τιμή (58-63) κωδικοποιητικών μεταλλάξεων ανά όγκο (εύρος, 32-93) χρησιμοποιώντας αλληλουχία ολόκληρου του εξώματος, και η έκφραση μιας υποομάδας RNA θα επιβεβαιωθεί με ανάλυση αλληλουχίας RNA (αλληλουχία RNA). Αυτές θα περιλαμβάνουν μεταλλάξεις που θα παρατηρούνται συνήθως στο MMKP και επηρεάζουν τα EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF. Θα δοκιμαστούν επίσης μεταλλάξεις IDH1 ή IDH2. Πέντε έως έξι ασθενείς αναμένεται να αποσυρθούν λόγω ανεπαρκούς αριθμού δραστικών νεοεπιτόπων ή εξέλιξης της νόσου μετά από ακτινοθεραπεία. Για τους υπόλοιπους ασθενείς, ο διάμεσος αριθμός και το μήκος αιμοζέων των πεπτιδίων που θα ενσωματώνονται ανά εμβόλιο θα είναι 17-25 (LIMPs, ASPs και bEPTs) και 60 TAAs κατά μέσο όρο 7-13 AA ο καθένας από τους ίδιους τους ασθενείς που θα προέρχονται από σωματικά μεταλλάγματα 12 (εύρος, 7-20) και 24 (εύρος, 15-30), αντίστοιχα. Το εμβόλιο Microlynaq-TM VACCINE θα εφαρμοστεί κατά τη διάρκεια των κύκλων χορήγησης PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας χημειοακτινοβολίας (CRT) σε συνδυασμό με προσωποποιημένους αναστολείς των σημείων του ανοσοποιητικού συστήματος και αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία με tumor-lysate pulsed DCs. Ξεκινώντας την ημέρα 14 πριν από τον πρώτο κύκλο χορήγησης PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), οι ασθενείς θα λάβουν 12 εμβολιασμούς με εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE για 12 εβδομάδες. Θα χρησιμοποιηθούν (900-1100) μg ανά πεπτίδιο ανά φιαλίδιο, ακολουθούμενα από δύο αναμνηστικές δόσεις οκτώ και δεκαέξι εβδομάδες αργότερα. Για κάθε δόση, οι δεξαμενές εμβολίων θα χορηγούνται εντός έξι ωρών από την απόψυξη με μη περιστρεφόμενο τρόπο σε ένα από τα τέσσερα έως και τέσσερα άκρα. Οι ασθενείς θα εμβολιαστούν με 12 (δώδεκα) κύκλους MicrolynaqTM σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία και Pembrolizumab (MicrolynaqTM / Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV) και Pembrolizumab) μέσα σε 12 εβδομάδες όπου και θα χορηγούνται (900-1100) μg ανά πεπτίδιο ανά φιαλίδιο. Τα εμβόλια της μελέτης θα χορηγηθούν ακόμα και σε ασθενείς που χρειάζονται περισσότερα από 4 mg δεξαμεθαζόνης την ημέρα εντός επτά ημερών από την έναρξη της χορήγησης των εμβολίων Microlynaq-TM VACCINES.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗΣ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΜΕ (MicrolynaqTM-VACCINE)

ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΩΝ ΝΕΟΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΚΒΑΝΤΟΜΟΡΙΑΚΩΣ-ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΩΝ (MicrolynaqTM-VACCINE) ΜΕ ΤΑ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΑ ΑΝΤΙΓΟΝΑ ΤΩΝ ΤΑΑΣ-(CAGE, GBU4-5, HUD, NY-ESO-1, P53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1,

HUC, KAI ESO1) ΣΕ MOL2 ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΤΗΣ PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΗΣ PEMBROLIZUMAB ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK FUSION, BCL2 ΚΑΙ VEGF ΟΠΩΣ ΚΑΙ ΕΠΙ ΤΩΝ MIR-26A, MIR-30D, MIR-34A, MIR-146A, MIR-155, MIR-195, MIR-200B, MIR-200C, MIR-202 ΚΑΙ MIR-223 ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ, ΚΑΤΑ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΡΧΩΝ ΤΗΣ 6^{ΗΣ}, 13^{ΗΣ} ΚΑΙ 25^{ΗΣ} ΕΒΔΟΜΑΔΑΣ

Το τρισδιάστατο μοντέλο των υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF αλλά και των μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 που θα χρησιμοποιηθεί στις μελέτες Μοριακής Πρόσδεσης θα παραχωρηθεί από τον Γρηγοριάδη Ιωάννη και τους συνεργάτες του. Η μελέτη Μοριακής Πρόσδεσης θα πραγματοποιηθεί με το πρόγραμμα Glide και το πρωτόκολλο υψηλής ακρίβειας (extra precision- XP.) ακολουθώντας την εφαρμογή του πρωτόκολλου IFD (Induced Fit Docking), το οποίο θα επιτρέπει την μερική ευκαμψία του υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF. Το πρωτόκολλο IFD-BiogenetoligandoroITM θα ακολουθεί τα παρακάτω βήματα: (α) Ελαχιστοποίηση των υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF αλλά και των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 μικρογονιδιακών στόχων υπό περιορισμό με RMSD αποκοπής 0,184. (β) Αρχική μοριακή πρόσδεση των εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων **MicrolynaqTM** ταξινομημένων κβαντοκοριακά με τα ανσογονικά και αντιγονικά πεπτίδια των -TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV) και του αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab με χρήση του Glide, μαλακών δυναμικών (0,5 Van der Waals free energy calculations high-throughput screening ADME υπολογισμοί ελεύθερης ενέργειας.

ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗΣ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΩΝ ΝΕΟΑΝΤΙΓΟΝΙΚΩΝ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ (MicrolynaqTM-VACCINE) ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΩΝ ΚΒΑΝΤΟΚΟΡΙΑΚΩΣ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΑ ΑΝΟΣΟΓΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΑ ΠΕΠΤΙΔΙΑ ΤΩΝ TAAS-(CAGE, GBU4-5, HUD, NY-ESO-1, P53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HUC, ΚΑΙ ESO1) ΣΕ MOL2 ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΔΕΤΩΝ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΤΗΣ PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΤΗΣ PEMBROLIZUMAB ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK FUSION, BCL2 ΚΑΙ VEGF ΟΠΩΣ ΚΑΙ ΕΠΙ ΤΩΝ MIR-26A, MIR-30D, MIR-34A, MIR-146A, MIR-155, MIR-195, MIR-200B, MIR-200C, MIR-202 ΚΑΙ MIR-223 ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΣΤΟΧΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΙΑΣ ΜΕΓΑΛΗΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΟΠΩΣ: ΝΕΥΡΩΝΙΚΩΝ ΔΙΚΤΥΩΝ, ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ, ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΡΙΔΙΑΣΤΑΤΩΝ ΔΟΜΩΝ, ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΥΝΑΜΙΚΗΣ ΚΑΙ, ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ, ΚΑΤΑ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΡΧΩΝ ΤΗΣ 6^{ΗΣ}, 13^{ΗΣ} ΚΑΙ 25^{ΗΣ} ΕΒΔΟΜΑΔΑΣ

Σκοπός της παρούσας κλινικής μελέτης είναι η πρόβλεψη της ανοσογονικής απόκρισης του συμπλέγματος των ταξινομημένων κβαντομοριακά και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων **MicrolynaqTM** με τα ανοσογονικά αντιγονικά πεπτίδια των TAAS-(CAGE, GBU4-5, HUD, NY-ESO-1, P53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HUC, και ESO1) σε mol2 βιβλιοθήκη μοριακών προσδετών των φαρμάκων της paclitaxel 200 mg / m², carboplatin auc 6 (iv) και του αναστολέα της pembrolizumab με τεχνικές μοντελοποίησης, μοριακής αναγνώρισης και μοριακής δυναμικής ακολουθώντας τη διαδικασία της μοριακής προσάραξης σε μια σειρά πρωτεϊνικών στόχων των EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET,CCND1, CDK4, EML4-ALK FUSION, BCL2 και VEGF όπως και επί των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 μικρογονιδιακών στόχων μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων όπου και θα εντοπιστούν οι πιθανές μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Οι αλληλεπιδράσεις του MicrolynaqTM συμπλέγματος νέο-πεπτιδίων φαρμάκων με τα αντίστοιχα αμινοξέα-νουκλεοβάσεις θα απομονωθούν και θα εκτελεστούν προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής σε περιβάλλον νερού, για να διαπιστωθεί η σταθερότητά τους σε σχέση με το χρόνο. Το περιβάλλον των συστημάτων θα είναι πάντοτε υδατικό και το μέγεθός του εξαρτάται προφανώς από τον μοριακό όγκο του συστήματος. Η αποτίμηση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής αναμένεται να παρουσιάζει μια ανοδική μετατόπιση του ελάχιστου της ενέργειας των συστημάτων. Παρόλα αυτά, κατά την εξέλιξή τους η ελεύθερη ενέργεια μοριακής πρόσδεσης αναμένεται να σταθεροποιείται και να εμφανίζει πτωτική τάση που τείνει να πλησιάσει το αρχικό ελάχιστο που έχει το σύστημα. Επίσης, βασικός σκοπός αυτής της κλινικής μελέτης είναι να εξαχθούν συμπεράσματα για τους μηχανισμούς με τους οποίους οι χημικές ουσίες που εμπεριέχονται στα Νεοαντιγονικά Εμβόλια MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab, τροποποιούν τη λειτουργία των πρωτεϊνών των S100A2, ERCC1 & RRM1, RCAS1, p73, της γλουταθειόνης-s, της τρανσφερασιν-π (gst-π), της π-γλυκοπρωτεΐνης (p-grp), των (HNRNP) A2 / B1 και των BRCA1, Όπως και των RRM1 και RRM2 σε κυτταρολογικά παρασκευασματα ογκών ασθενών, δημιουργώντας ένα ρόλο ανοσο-φαρμακευτικής δράσης. Στην παρούσα κλινική μελέτη θα γίνει χρήση ενός επιλεγμένου δείγματος τριδιάστατων δομών από την PDB (Protein Data Bank) με σκοπό να διερευνηθεί η παρουσία γενικών κανόνων και σχέσεων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε in silico σχεδιασμό εμβολίων-φαρμάκων. Θα γίνει συνδυασμός μιας μεγάλης ποικιλίας τεχνικών όπως: νευρωνικών δικτύων, στατιστικής ανάλυσης, περιγραφικής ανάλυσης τριδιάστατων δομών, μοριακών προσομοιώσεων, ενεργειακών υπολογισμών (που συνήθως χρησιμοποιούνται μεμονωμένες). Στα πλαίσια της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να δοκιμαστεί ένα μεγάλο εύρος υπολογισμών που παλινδρομήθηκαν με τα θερμοδυναμικά κατώφλια (που

προέκυψαν μετά από προσομοίωση και μετά από προσομοίωση και ενεργειακή ελαχιστοποίηση) προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο διάφορων ΜΚΚΠ μηχανισμών που ενδεχομένως ερμηνεύουν τον τρόπο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης - υποκαταστάτη. Στα πλαίσια της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να επισημανθούν κάποιοι ισχυροί μηχανισμοί στον σχηματισμό των παρατηρούμενων ενεργειακών κατωφλίων όπως είναι το μέγεθος του θύλακα σε σχέση με το αριθμό ατόμων του υποκαταστάτη και των μορίων νερού, η αναλογία υδρόφοβων αμινοξέων προς πολικά, οι αναλογίες των διάφορων τύπων ατόμων του υποκαταστάτη, η αναλογία ατόμων νερού προς άτομα υποκαταστάτη στο θύλακα και η παρουσία ακινητοποιημένων μορίων νερού. Στα πλαίσια της πορείας της παρούσας κλινικής μελέτης αναμένεται να συνδεθεί η σημασία των ακινητοποιημένων μορίων νερού με τη διαμερισματοποίηση του θύλακα κατά την αλληλεπίδραση με τον υποκαταστάτη σε περιοχές ισχυρής και μη ισχυρής πρόσδεσης (ή ακόμη και απώθησης) και έτσι θα εξεταστεί η συμβολή των ακινητοποιημένων μορίων νερού στη διαφοροποίηση του μηχανισμού αγωνιστή – ανταγωνιστή των μοριακών υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF. Τα αποτελέσματα αναμένεται να παρουσιάζουν ισχυρή στατιστική σημαντικότητα παρά το μικρό σχετικά δείγμα. Κατόπιν τα αποτελέσματα θα χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία νευρωνικού δικτύου με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο είναι ικανά να προβλέψουν τη σύσταση και την ανοσογονική δράση του υποκαταστάτη νεοαντιγονικού πεπτιδίου MicrolynaqTM. Για αυτό τον λόγο περιπτώσεις από τους υποκαταστάτες ταξινομημένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM θα τεθούν εκτός των ομάδων προπόνησης (training) και αξιολόγησης (validating) του νευρωνικού δικτύου, προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο η ανοσογονική πρόβλεψη πλησιάζει την πραγματική σύσταση των υποκαταστατών ταξινομημένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM με τη μέγιστη αντιγόνο-παρουσιαστική δράση και φαίνεται ότι τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να είναι αρκετά ενθαρρυντικά. Στο τέλος θα εξεταστούν προοπτικές επέκτασης των ανοσογονικών προβλέψεων με νευρωνικά δίκτυα, με σκοπό την πρόβλεψη αν ένας υποκαταστάτης ταξινομημένων νεοαντιγονικών πεπτιδίων MicrolynaqTM αποτελεί αγωνιστή ή ανταγωνιστή υποδοχέων και πρωτεϊνών στόχων των EGFR, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF αλλά και επί των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 αλλά και των miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 μικρογονιδιακών στοχών μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων στοχεύοντας ταυτόχρονα τα πρωτεϊνικά μοριακά μονοπάτια των S100A2, ERCC1 & RRM1, RCAS1, p73, της γλουταθειόνης-s, τρανσφεραση-π (gst-π), της π-γλυκοπρωτεΐνης (p-gp), των (HNRNP) A2 / B1 και των BRCA1, RRM1 και RRM2 τα οποία ανιχνεύθηκαν στον ιστό και το πλάσμα ασθενών της παρούσας κλινικής μελέτης με πρωτοδιαγνωσμένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα λαμβάνοντας υπόψιν και την παράμετρο των ακινητοποιημένων μορίων νερού.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΟ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟΝ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΑ (MicrolynaqTM-VACCINE) ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ S100A2, ERCC1 & RRM1, RCAS1, p73, ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ-S, ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗΣ-Π (GST-Π), ΤΗΣ Π-ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (P-GP), ΤΩΝ (HNRNP) A2 / B1 ΚΑΙ ΤΩΝ BRCA1, RRM1 ΚΑΙ RRM2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΟΓΚΩΝ ΤΩΝ ΙΔΙΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΘΑ ΤΟΥΣ ΧΟΡΗΓΗΘΟΥΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ QMMM-ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΩΝ (MicrolynaqTM-VACCINE) ΜΕ PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) ΚΑΙ ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΗ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΠΡΟΣΩΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΝΑΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΣΗΜΕΙΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟΧΕΥΟΜΕΝΟΥ ΚΑΤΑ ΤΟΥ PD-1 ΤΗΣ PEMBROLIZUMAB, ΕΦΟΣΩΝ ΑΥΤΟΣ ΕΙΝΑΙ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΣ, ΚΑΤΑ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΡΧΩΝ ΤΗΣ 6^{ΗΣ}, 13^{ΗΣ} ΚΑΙ 25^{ΗΣ} ΕΒΔΟΜΑΔΑΣ

S100A2

Όσον αφορά την S100A2 και τον ρόλο της στον ΜΚΚΠ, έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα αντικρουόμενες απόψεις. Οι Feng και συνεργάτες έδειξαν πως η έκφραση της S100A2 είναι κατεσταλμένη ενώ αντίθετα, οι Heighway και συνεργάτες έδειξαν πως η S100A2 εκφράστηκε ισχυρά στην πλειοψηφία των όγκων. Μελέτη από τους Wang et al κατέληξε στο ότι η S100A2 πρωτεΐνη υπερ-εκφράζεται στο ΜΚΚΠ. Ο χαρακτήρας έκφρασης της S100A2 σε εγχειρήσιμο ΜΚΚΠ κυμαίνεται ευρέως και αυτή η διακύμανση φαίνεται πως συσχετίζεται με την πρόγνωση. Η ένταση της έκφρασης είναι υψηλότερη στα αρχικά και τελικά στάδια της νόσου και κατανέμεται ισότιμα στα μεσαία στάδια γεγονός που μας οδήγησε στην σκέψη για πιθανό διπλό ρόλο της πρωτεΐνης στην καρκινογένεση. Σκοπός της παρούσας μελέτης αναμένεται να είναι η διερεύνηση της πυρηνικής και κυτταροπλασματικής έκφρασης και της έντασης της έκφρασης της πρωτεΐνης S100A2 πριν και μετά τον εμβολιασμό τους με (MicrolynaqTM-VACCINE) και ο συσχετισμός τους με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά καθώς και άλλα μόρια που συμμετέχουν στην καρκινογένεση σε ασθενείς της παρούσας με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΚΚΠ) στους οποίους θα χορηγηθεί συνδυαστική MicrolynaqTM νέο-αντιγονική θεραπεία και (2) η διερεύνηση της επίδρασης τους στην επιβίωση και το διάστημα ελεύθερο νόσου αυτών μεταξύ των ασθενών της ομάδας ελέγχου και των ομάδων ασθενών στους οποίους θα χορηγηθούν συνδυασμοί των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGA.4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δεινδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Σε ιστολογικά παρασκευάσματα παραφίνης ομάδων ασθενών με ΜΚΚΠ αναμένεται να ανιχνευθεί μείωση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών S100A2, Caspase3, Ki67 και p53. Αναμένεται επίσης, να διαπιστωθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της πυρηνικής κατανομής της S100A2 και του διαστήματος ελεύθερο νόσου (p=0.047) σε ασθενείς εμβολιασμένους με **αναμεμειγμένα** με ΤΑAs νεοαντιγόνα MicrolynaqTM εμβόλια σε σύγκριση με αυτούς που δε θα εμβολιασθούν με **αναμεμειγμένα** με ΤΑAs νεοαντιγόνα ογκού κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας. Ασθενείς χωρίς λεμφαγγειακή διήθηση και πρωιμότερο στάδιο νόσου που θα εμβολιασθούν με MicrolynaqTM εμβόλια αναμένεται να έχουν σημαντικά καλύτερη

συνολική επιβίωση και διάστημα ελεύθερο νόσου στην ίδια συνδυαστική χημειοθεραπεία με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab.

ERCC1 & RRM1

Το ERCC1 (Excision repair cross-complementation group 1) είναι ένα από τα πλέον βασικά ένζυμα στη διαδικασία επιδιόρθωσης νουκλεοτιδίων με εκτομή. Το ένζυμο RRM1 (Ribonucleotide reductase subunit M1) εμπλέκεται στη σύνθεση και επιδιόρθωση του DNA και στο μεταβολισμό της gemcitabine, και τα 2 ένζυμα αναμένεται να συσχετισθούν μεταξύ των ομάδων ασθενών σχετικά με την ανταπόκρισή τους σε συνδυασμούς των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab αντίστοιχα. Η σχετική ποσότητα mRNA του ERCC1 και του RRM1 θα μετρηθεί με τη μέθοδο ΔΔCT χρησιμοποιώντας τη β-ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας. Αναμένεται να παρατηρηθεί στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της μείωσης της έκφρασης των γονιδίων αυτών, κλινικοπαθολογικών παραμέτρων, όπως και αύξησης της συνολικής επιβίωσης και του ελεύθερο νόσου διαστήματος σε όλους τους ασθενείς που θα συμμετέχουν στην παρούσα μελέτη. Η διερεύνηση σε μεγαλύτερο αριθμό ασθενών στους οποίους θα χορηγηθούν συνδυασμοί των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab πιθανότατα θα ξεκαθαρίσει τον πραγματικό ρόλο της S100A2 όσο και την RRM1 και ERCC1 σε ασθενή με MKKΠ.

RCAS1

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί ένα σημαντικότερο πρόβλημα υγείας εξαιτίας της επίπτωσης και της θνητότητάς του. Το RCAS1 (Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells) είναι πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων και πιθανολογείται ότι παίζει ρόλο στην ανοσοδιαφυγή των καρκινικών κυττάρων. Σκοπός της παρούσας κλινικής μελέτης είναι να μελετηθεί και να αξιολογηθεί η κλινική σημασία και τα ποσοστά μείωσης της έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1 σε μη μικροκυτταρικά νεοπλάσματα του πνεύμονα μεταξύ των ασθενών στους οποίους θα χορηγηθούν συνδυασμοί In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Στα πλαίσια της διενέργειας της παρούσας κλινικής μελέτης θα δημιουργηθούν ιστικές μικροσυτοιχίες (Tissue MicroArrays) από τα ιστικά δείγματά των όγκων ασθενών με πρωτοπαθές μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Θα ακολουθήσει ανοσοϊστοχημική μελέτη του RCAS1, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και του δείκτη CD3. Η ανάλυση και επεξεργασία των εικόνων (image analysis) θα γίνει με ειδικό πρόγραμμα (software). Η ανάλυση των συσχετίσεων μεταξύ της έκφρασης του RCAS1, του Ki-67 και του CD3 με τις διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους θα γίνει θεωρώντας βαθμό στατιστικής σημαντικότητας p-value=0.05. Η έκφραση του RCAS1 αναμένεται να είναι μικρότερη σε grade III ασθενείς που εμβολιάστηκαν MicrolynaqTM σε σύγκριση με αυτούς που δεν εμβολιάστηκαν με τα ίδια εμβόλια, ανεξάρτητα από τον ιστολογικό τύπο και στα αδενοκαρκινώματα με λεμφαγγειακή διήθηση. Αναμένεται να βρεθεί επίσης, μια θετική συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του Ki-67 κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας. Επιπλέον, αναμένεται να αποδειχθεί η ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ του RCAS1 και του Ki-67 με τη συνολική επιβίωση των ασθενών σε εμβολιασμένους με MicrolynaqTM ασθενείς στους οποίους αναμένεται να σημειωθεί μείωση της έκφρασης του RCAS1 ή του Ki-67 και οποίοι αναμένεται να έχουν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη επιβίωση σε σύγκριση με μη εμβολιασμένους ασθενείς. Τέλος, αναμένεται να βρεθεί θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου και της συνολικής επιβίωσης των εμβολιασμένων με MicrolynaqTM ασθενών. Το RCAS1 πιθανότατα θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας χρήσιμος ανοσοϊστοχημικός προγνωστικός δείκτης της επιθετικότητας του όγκου και της άσχημης πρόγνωσης των ασθενών με MKKΠ στους οποίους θα χορηγηθεί συνδυασμός των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab.

p73

Το γονίδιο p73 διαθέτει έναν εξωτερικό υποκινητή (P1) και έναν εσωτερικό υποκινητή (P2), από τους οποίους συντίθενται οι ισομορφές TAp73 πλήρους μήκους και οι ισομορφές ΔNp73 με περικομμένο αμινοτελικό άκρο, αντίστοιχα. Το τελικό αποτέλεσμα του γονιδίου p73 πιστεύεται ότι εξαρτάται από την αναλογία των αποπτωτικών ισομορφών TAp73 προς τις αντιαποπτωτικές ισομορφές ΔNp73. Η επιλεκτική ενεργοποίηση των υποκινητών του γονιδίου p73 θα μπορούσε να επάγει την έκφραση είτε των αποπτωτικών είτε των αντιαποπτωτικών ισομορφών του p73, μετατοπίζοντας με αυτό τον τρόπο την αναλογία

ΔΝ / ΤΑ προς μια ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική κατεύθυνση. Κατά συνέπεια, οι επιγενετικοί και οι μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν με διαφορεικό τρόπο τους υποκινητές P1 και P2 αποτελούν σημαντικούς καθοριστικούς συντελεστές του ρόλου του γονιδίου p73, αφού μπορούν να μεταβάλλουν την αναλογία ΔΝ / ΤΑ. Ο υποκινητής P1 παρέμεινε ουσιαστικά μη μεθυλιωμένος στην πλειονότητα των καρκινωμάτων του πνεύμονα. Από την άλλη πλευρά, η υπομεθυλίωση του υποκινητή P2 συσχετίστηκε έντονα με την υπομεθυλίωση του μεταθετονίου LINE-1, το οποίο αποτελεί δείκτη συνολικής υπομεθυλίωσης του DNA. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η υπερέκφραση του ΔNp73 ενδέχεται να αποτελεί παθητική συνέπεια της συνολικής υπομεθυλίωσης του DNA. Καθώς η υπερέκφραση των ισομορφών TAp73 δεν αναμένεται να είναι δυνατό να αποδοθεί σε μεταβολή της κατάστασης μεθυλίωσης του υποκινητή P1, διατυπώθηκε η εύλογη υπόθεση ότι θα μπορούσε πιθανόν να οφείλεται σε απορρυθμισμένη ενεργότητα ειδικού ή ειδικών μεταγραφικών παραγόντων. Ο στόχος της παρούσας μελέτης αναμένεται να είναι η κλινική συσχέτιση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε ασθενείς με MMKP, σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab, με τα επίπεδα της έκφρασης νέων επιγενετικών και μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι επηρεάζουν τη σύνθεση των ισομορφών TAp73 και ΔNp73 στον καρκίνο του πνεύμονα, στον οποίο έχουν βρεθεί υπερεκφρασμένες και οι δύο τάξεις ισομορφών. Αρχικά, θα διερευνηθεί η κατάσταση μεθυλίωσης του DNA και των δύο υποκινητών, προκειμένου να καθοριστεί η επιγενετική ρύθμιση της μεταγραφής των αντίστοιχων ισομορφών τους σε πρωτοπαθείς όγκους ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (MKKP) στους οποίους θα χορηγηθούν συνδυασμοί In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Στα πλαίσια της διενέργειας αυτής της συνδυαστικής θεραπείας MicrolynaqTM αναμένεται να καταδειχθεί αύξηση των επιπέδων της έκφρασης του mRNA του TAp73 η οποία θα οφείλεται σε υπερμεθυλίωση του υποκινητή P1 και είναι σπάνια, ενώ αντίθετα μείωση της υπερέκφρασης του mRNA του ΔNp73 η οποία θα οφείλεται σε υπομεθυλίωση του υποκινητή P2 και αναμένεται να αξιολογηθεί ως ένα συχνό συμβάν, ιδιαίτερα μεταξύ ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα εκ πλακωδών κυττάρων κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας.

Γλουταθειόνη-S, Τρανσφέρση-π (GST-π) και η Π-Γλυκοπρωτεΐνη (P-gr)

Πειραματικές μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη διάφορων παραγόντων που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντίστασης στα αντινεοπλασματικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα για την θεραπεία του μη χειρουργήσιμου καρκίνου του πνεύμονα. Μεταξύ αυτών έχουν μελετηθεί: η Γλουταθειόνη-S, Τρανσφέρση-π (GST-π) και η Π-Γλυκοπρωτεΐνη (P-gr). Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι να εξεταστεί η έκφραση αυτών των πρωτεϊνών, για πρώτη φορά στην βιβλιογραφία, σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα ασθενών με μη χειρουργήσιμο καρκίνο του πνεύμονα στους οποίους θα χορηγηθούν συνδυασμοί των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Η έκφραση αυτή θα συσχετισθεί με την απάντηση στην χημειοθεραπεία και την επιβίωση των ασθενών. Όλοι οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα που θα διαγνωστούν κατά την τριετία 2025-2028 στην Πνευμονολογική κλινική στην οποία θα διεξαχθεί η παρούσα κλινική μελέτη και θα δεχθούν να εισαχθούν στο πρωτόκολλο. Η διάγνωση θα βασιστεί σε βρογχικές βιοψίες, βρογχικό έκπλυμα, η βρογχική ψήκτρα που θα εξασφαλισθούν κατά την βρογχοσκόπηση. Η σταδιοποίηση της νόσου θα γίνει κατά τα διεθνή πρότυπα. Όλοι οι ασθενείς θα επανεκτιμηθούν ως προς την απάντηση στην MicrolynaqTM θεραπεία. Η έκφραση των δύο πρωτεϊνών θα γίνει με ανοσοϊστοχημική μέθοδο στα κυτταρολογικά τους παρασκευάσματα ασθενών με Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα (MKKP) οι οποίοι έλαβαν θεραπεία με Προσωποποιημένα Νεοαντιγονικά Εμβόλια MicrolynaqTM-TAAs-VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία ανοσοθεραπεία και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab, όπως και στα ιστολογικά παρασκευάσματα αυτών όταν τα τελευταία θα είναι διαθέσιμα. Σαν επιβίωση θα οριστεί το διάστημα από την διάγνωση μέχρι τον θάνατο ή την επανεξέταση των ασθενών μετά 24 μήνες. Η θετική έκφραση της GST-π και της P-gr θα συσχετιστεί με φτωχή απάντηση στη συνδυαστική MicrolynaqTM χημειοθεραπεία, (p=0,002, p=0,015 αντιστοίχως), όπως και μικρότερη επιβίωση (p=0 0014, p=0,023 αντιστοίχως). Η έκφραση των δύο πρωτεϊνών στα κυτταρολογικά και ιστολογικά παρασκευάσματα αναμένεται να είναι συγκρίσιμη κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας. Η έκφραση των GST-π και P-gr σε κυτταρολογικά παρασκευάσματα ασθενών με MMKP μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν προγνωστικός δείκτης για την έκβαση της MicrolynaqTM συνδυαστικής χημειοθεραπείας.

(hnRNP) A2 / B1

Η υπερέκφραση της ετερογενούς πυρηνικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης (hnRNP) A2 / B1 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης έγκαιρης διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα, σύμφωνα με πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα. Για να αξιολογήσουμε την χρησιμότητα της ανίχνευσης της πρωτεΐνης αυτής σε βρογχοσκοπικά υλικά ασθενών οι οποίοι θα λάβουν MicrolynaqTM συνδυαστική χημειοθεραπεία, θα μετρήσουμε τα επίπεδα έκφρασης της hnRNPA2 / B1 με ανοσοσύτωση (immunoblotting), χρησιμοποιώντας ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα, σε δείγματα brushing και ενδοβρογχικές βιοψίες που θα ληφθούν από τους ασθενείς των ομάδων της παρούσας κλινικής μελέτης. Συνολικά, η υπερέκφραση της hnRNPA2 / B1 αναμένεται να είναι σημαντικά μικρότερη στους πάσχοντες από πνευμονικό καρκίνο στους οποίους θα χορηγηθεί MicrolynaqTM συνδυαστική

χημειοθεραπεία απ' ότι στους ασθενείς της ομάδας ελέγχου στους οποίους δε θα χορηγηθεί η Microlynaq™ συνδυαστική χημειοθεραπεία. Παρόλα αυτά στο σύνολο των ασθενών αυτών στους οποίους θα χορηγηθούν συνδυασμοί In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων Microlynaq™-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab αναμένεται να ανιχνευτεί μείωση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης hnRNP A2 / B1 στα βρογχοσκοπικά δείγματα κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας. Τα δεδομένα αυτά αναμένεται δείξουν τη χρησιμότητα της hnRNP A2 / B1 στην έγκαιρη διάγνωση του πνευμονικού καρκίνου. Συμπεραίνουμε ότι η υπερέκφραση της hnRNP A2 / B1 στο brushing και στις βιοψίες των ασθενών αυτών στους οποίους θα χορηγηθούν συνδυασμοί In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων Microlynaq™-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολύτιμο διαγνωστικό εργαλείο και να χρησιμοποιηθεί σαν ένας ευαίσθητος και ειδικός δείκτης για το σχεδιασμό των μεσοδιαστημάτων του Microlynaq™ εμβολιασμού των ασθενών με καρκίνου του πνεύμονα.

BRCA1, RRM1 και RRM2

Στόχος της παρούσας κλινικής μελέτης θα αποτελέσει η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του συνδυασμού Προσωποποιημένων Νεοαντιγονικών Εμβολίων Microlynaq™-TAAs-VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία ανοσοθεραπεία και της Pembrolizumab ως πρώτης γραμμής X / Θ σε ηλικιωμένους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. >21 ασθενείς αναμένεται να εμφανίσουν πλήρη ανταπόκριση (>32.3%) και 33 ασθενείς (>48.9%) αναμένεται να εμφανίσουν μερική ανταπόκριση ενώ έλεγχος της νόσου αναμένεται να μπορέσει να επιτευχθεί σε πάνω από 61.3%. Το διάμεσο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου αναμένεται να είναι 6.1 μήνες, η διάμεση επιβίωση 11.4 μήνες και η μονοετής και διετής επιβίωση 47.9% και 16.7% αντίστοιχα. Η προοπτική αυτή μελέτη αναμένεται να δείξει ότι η συνδυαστική χημειοθεραπεία 1ης γραμμής με Προσωποποιημένα Νεοαντιγονικά Εμβόλια Microlynaq™-TAAs-VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία ανοσοθεραπεία και της Pembrolizumab θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική στους ηλικιωμένους ασθενείς με μεταστατικό ή τοπικά προχωρημένο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Στόχος της παρούσας κλινικής μελέτης θα αποτελέσει η αξιολόγηση και μέτρηση των επιπέδων έκφρασης mRNA των υποομάδων RRM1 και RRM2 και η συσχέτισή τους με τα κλινικά αποτελέσματα σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα που θα θεραπεύονται με το συνδυασμό Προσωποποιημένων Νεοαντιγονικών Εμβολίων Microlynaq™-TAAs-VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία ανοσοθεραπεία και της Pembrolizumab ως X / Θ 1ης γραμμής. Για να μελετήσουμε την έκφραση των γονιδίων RRM1 και RRM2 θα απομονωθεί RNA από το υλικό του όγκου μετά από μικροτεμαχισμό με laser. Η ποσοτικοποίηση του εξαγόμενου RNA θα γίνει με RT-PCR. Η πολυπαραγοντική αυτή ανάλυση αναμένεται να δείξει ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης mRNA RRM2 θα συσχετίζονται σημαντικά με πτωχή απάντηση στη συνδυαστική χημειοθεραπεία 1ης γραμμής με Προσωποποιημένα Νεοαντιγονικά Εμβόλια Microlynaq™-TAAs-VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV) και DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία ανοσοθεραπεία. Η μελέτη αυτή αναμένεται να δείξει για πρώτη φορά μια θετική σχέση μεταξύ της έκφρασης mRNA της RRM2 και της απάντησης στη συνδυαστική χημειοθεραπεία Microlynaq™ η οποία θα είναι βασισμένη σε Προσωποποιημένα Νεοαντιγονικά Εμβόλια Microlynaq™-TAAs-VACCINE, Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία ανοσοθεραπεία και στη Pembrolizumab σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Στόχος αυτής της μελέτης θα παραμείνει η αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης mRNA των BRCA1, RRM1 και RRM2 και η συσχέτισή τους με τη κλινική απάντηση σε X / Θ 1ης γραμμής με Προσωποποιημένα Νεοαντιγονικά Εμβόλια Microlynaq™-TAAs-VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), DCTs Δενδριτική Ανοσοθεραπεία ανοσοθεραπεία και της Pembrolizumab στους ασθενείς της παρούσας με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Η μεθοδολογία κατεργασίας των δειγμάτων θα είναι όμοια με την περιγραφείσα ανωτέρω. Κλινικά δεδομένα και εξαγωγή RNA για τα γονίδια BRCA1, RRM1 και RRM2 αναμένεται να μπορέσουν να επιτευχθούν σε όλα τα δείγματα των ομάδων ασθενών που θα συμμετέχουν στη παρούσα κλινική μελέτη κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6ης, 13ης και 25ης εβδομάδας. Οι ασθενείς της ομάδας ελέγχου όπως και οι ασθενείς των θα ταξινομηθούν σε 3 ομάδες ανάλογα με τον κίνδυνο προόδου νόσου βασισμένοι στην αλληλεπίδραση των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων Microlynaq™-TAAs με τα επίπεδα έκφρασης των mRNA BRCA1 και mRNA RRM1. Το διάμεσο TTP αναμένεται να είναι >14.13 μήνες για τους ασθενείς χαμηλού κινδύνου >7.97 μήνες για τους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου και >5.23 μήνες για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου (p=0.001). Η έκφραση των RRM1, RRM2, BRCA1 αναμένεται να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την εξατομικευμένη θεραπεία ασθενών με MMKP που τους χορηγήθηκε προσωποποιημένη νέο-αντιγονική θεραπεία Microlynaq™.

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΕΣ ΚΛΙΝΙΚΟ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ-S, ΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΗ-Π (GST-Π), ΤΗΣ Π-ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗ (P-GP), (HNRNP) A2 / B1 ΚΑΙ ΤΩΝ BRCA1, RRM1 ΚΑΙ RRM2 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΙΚΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΟΓΚΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΟΥ ΤΟΥΣ ΧΟΡΗΓΗΘΗΚΑΝ ΠΟΥ ΤΟΥΣ ΧΟΡΗΓΗΘΗΚΑΝ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΜΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΩΝ (Microlynaq™-VACCINE) ΟΠΩΣ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΗΜΕΝΩΝ (Microlynaq™-VACCINE) ΜΕ PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) ΚΑΙ ΑΥΤΟΛΟΓΗ ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΗ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΠΡΟΣΩΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΑΝΟΣΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΤΕΣ ΚΑΙ ΕΝΑΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΣΗΜΕΙΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΣΤΟΧΕΥΟΜΕΝΟΥ ΚΑΤΑ ΤΟΥ PD-1 ΤΗΣ PEMBROLIZUMAB, ΕΦΟΣΩΝ ΑΥΤΟΣ ΕΙΝΑΙ ΔΙΑΘΕΣΙΜΟΣ, ΚΑΤΑ ΤΑ ΧΡΟΝΙΚΑ ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ ΑΡΧΩΝ ΤΗΣ 6ΗΣ, 13ΗΣ ΚΑΙ 25ΗΣ ΕΒΔΟΜΑΔΑΣ

Μέτρηση των κατασταλτικών επιδράσεων των κβαντομοριακών ταξινομημένων (MicrolynaqTM-VACCINE) όπως και των ταξινομημένων (MicrolynaqTM-VACCINE) στη δημιουργία αποικιών των καρκινικών κυττάρων ασθενών που τους χορηγήθηκαν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές και ένας αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Τα κύτταρα ασθενών που θα τους χορηγηθούν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές και ένας αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας θα τοποθετηθούν σε πλάκες 96 φρεατίων στα αντίστοιχα μέσα καλλιέργειας, σε πυκνότητα 1×10^4 κύτταρα / φρεάτιο (εις τριπλούν) σε διάλυμα 100 µL και την επόμενη μέρα, θα επωαστούν με Microlynaq-TM VACCINE. Μετά από 72 ώρες, θα προστεθούν MTT (5 mg / mL) στα φρεάτια και στη συνέχεια τα τρυβλία 96 φρεατίων θα επωαστούν για 4 ώρες. Στη συνέχεια, θα προστεθούν 100 µL DMSO. Η απορρόφηση (OD) θα μετρηθεί στα 570 nm σε έναν φασματόμετρο. Στη συνέχεια, θα πραγματοποιηθεί μια σειρά από κλωνογονικούς προσδιορισμούς επιβίωσης για να εκτιμήσουμε την ευαισθησία των κυττάρων ασθενών που τους χορηγήθηκαν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) και αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία σε συνδυασμό με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων των PD-1, της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας. Μετά από 7 ημέρες, οι αποικίες θα μετρηθούν από κάθε ομάδα και μετά θα κανονικοποιηθούν ως προς την ομάδα ασθενών που δε θα εμβολιαστούν με τα Microlynaq-TM VACCINES.

Μέτρηση των ανασταλτικών επιδράσεων των κβαντομοριακών ταξινομημένων (MicrolynaqTM-TAAs VACCINE) σε επίπεδα επιβίωσης με δόσοεξαρτώμενο και χρονοεξαρτώμενο τρόπο σε προϊόντα λύσης όγκων ασθενών που τους χορηγήθηκαν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές και ένας αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Μία από τις βιολογικές αποκρίσεις των καρκινικών κυττάρων στη θεραπεία με Microlynaq-TM VACCINE αναμένεται να είναι η καταστολή των επιπέδων έκφρασης του mRNA της survivin. Η survivin είναι πρωτεΐνη που αναστέλλει την απόπτωση, συνεπώς ευνοεί την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Για αυτόν τον λόγο, θα διερευνηθούν οι ανασταλτικές επιδράσεις της θεραπείας Microlynaq-TM VACCINE εξετάζοντας τα επίπεδα πρωτεϊνών survivin από ιστούς όγκων πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη χορήγηση των Microlynaq-TM VACCINE, ως φαρμακοδυναμικός δείκτης για επιβεβαίωση της βιολογικής απόκρισης MMKΠ όγκου.

Κυκλοφορούμενες κλινικο-εργαστηριακές σε ελεύθερο κυτταρικό DNA (cfDNA), Ελεύθερο κυτταρικό RNA (cfRNA), και κυκλοφορόντες πρωτεΐνες ασθενών που τους χορηγήθηκαν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές και ένας αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Η βιοψία του ιστού ενδέχεται να μην επιτρέπει την ικανοποιητική ανίχνευση του όγκου σε πρώιμα στάδια ή σε περιπτώσεις υπολειμματικής νόσου και κατά αυτόν τον τρόπο η βιοψία δεν είναι κατάλληλη για έλεγχο. Επιπλέον, η χρονική και χωρική ετερογένεια του όγκου μπορεί να μειώσει την πρακτική χρησιμότητα των ιστών βιοψίας ως εργαλεία, για την παρακολούθηση της προόδου της θεραπείας του όγκου και την σωστή αξιολόγηση της ανταπόκρισης στην θεραπεία. Ειδικότερα, σε πολυεστιακές μορφές όγκων, ενδέχεται να είναι απαραίτητο η διενέργεια λήψης πολλαπλών βιοψιών για να διαπιστωθεί με ακρίβεια η παθολογία του όγκου, καθώς οι όγκοι εξελίσσονται συνεχώς, τόσο χωρικά όσο και χρονικά, κατά ιδίου σκοπού ή και ως αποτέλεσμα ως προς την θεραπεία (Perakis & Speicher, 2017). Με βάση λοιπόν τα προαναφερθέντα, στην παρούσα κλινική μελέτη θα ακολουθηθεί μία ελάχιστη επεμβατική διαδικασία της υγρής βιοψίας μεταξύ των ασθενών που ολοκλήρωσαν τον Εμβολιασμό Microlynaq-TM VACCINE σε συνδυασμό με PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) και αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας η οποία θα αποτελεί λύση σε αυτά τα προβλήματα, ως μια συνεχώς εξελισσόμενη διαδικασία που θα επιτρέψει την διάγνωση και εξέλιξη του όγκου και φυσικά θα δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τον κίνδυνο, την πρόγνωση αλλά και την πιθανότητα υποτροπής της παθολογίας. Η ανάλυση του κυκλοφορόντος DNA του όγκου (ctDNA) θα περιλαμβάνει τον εντοπισμό και την ανάλυση θραυσμάτων DNA που θα εκκρίνονται από τα κύτταρα του όγκου στην κυκλοφορία του αίματος. Με την απομόνωση και την ανάλυση των αλληλουχιών του ctDNA, θα μπορούν να αναγνωριστούν και να αναλυθούν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γενετικών αλλαγών που θα συσχετίζονται με τον όγκο MMKΠ ασθενών που θα εμβολιασθούν με Microlynaq-TM VACCINE εξατομικευμένα εμβόλια και θα τους χορηγηθούν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) και αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία. Οι τεχνολογίες cfDNA μπορούν να ανιχνεύσουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο ctDNA που είναι ενδεικτικές ενός όγκου MMKΠ. Αυτές οι μεταλλάξεις θα μπορεί να περιλαμβάνουν μονονουκλεοτιδικές

μεταβολές (SNVs = single nucleotide variants), εισαγωγές / διαγραφές (indels), ή μεγαλύτερες δομικές μεταβολές, όπως συγχωνεύσεις γονιδίων ή χρωμοσωμικών ανακατατάξεων (Mair & Mouliere, 2022). Η ανάλυση της ποικιλίας του αριθμού αντιγράφων (Copy number variation - CNV) του cfDNA επιτρέπει τον εντοπισμό αλλαγών στον αριθμό αντιγράφων του DNA, όπως ενισχύσεις ή διαγραφές, οι οποίες μπορούν να παρέχουν δεδομένα στο γενωμικό τοπίο των όγκων MMKΠ. Αυτές οι προηγμένες τεχνολογίες θα επιτρέπουν σε πραγματικό χρόνο (real-time) την παρακολούθηση της δυναμικής του όγκου και της ανταπόκρισης του στη θεραπεία με PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) και αυτόλογη δενδριτική DCTs μέσω της ανάλυσης του ctDNA σε διάφορες στιγμές κατά τη διάρκεια της Microlynaq-TM θεραπείας. Αυτό θα επιτρέψει τον εντοπισμό νεοεμφανιζόμενων γενετικών αλλαγών και μηχανισμών ανοχής, καθοδηγώντας έτσι τις αποφάσεις σχετικά με τη συνδυαστική PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και Microlynaq-TM VACCINE εξατομικευμένη νέο-αντιγονική θεραπεία.

Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs και των SNPs γενετικών πολυμορφισμών των rs1982809 G / A, rs1804429 A / C, -972 (rs3760396) G / C, rs3138035 A / G, rs7170924 G / T, rs662959 C / T, rs4487030 A / G, rs469783 T / C, rs1304057 C / A και rs3607157 G / A στο πλάσμα και στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) σε αντιστοιχισμένα δείγματα ασθενών με MMKΠ, που θα εμβολιασθούν με Microlynaq-TM VACCINE εξατομικευμένη νέο-αντιγονική θεραπεία και έλαβαν ταυτόχρονα ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1 / 10-11 κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας.

Σε αυτή τη κλινική μελέτη θα μελετηθεί η έκφραση των miRNAs και των SNPs γενετικών πολυμορφισμών των rs1982809 G / A, rs1804429 A / C, -972 (rs3760396) G / C, rs3138035 A / G, rs7170924 G / T, rs662959 C / T, rs4487030 A / G, rs469783 T / C, rs1304057 C / A και rs3607157 G / A των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό MMKΠ, οι οποίοι θα λάβουν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1 / PD-L1 στην Παθολογική Ογκολογική κλινική στην οποία θα διενεργηθεί η παρούσα κλινική μελέτη κατά το χρονικό διάστημα 2025-2028 και θα πραγματοποιηθεί σύγκριση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ αντιστοιχισμένων δειγμάτων ασθενών στο πλάσμα και στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος. Σε αυτή την κλινική μελέτη θα μελετηθούν μόνο τα miRNAs που θα σχετίζονται με τη ρύθμιση των σημείων ελέγχου (miR-34a, - 2000, miR-2000), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων (miR-155, miR-146) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223), ενώ δε θα μελετηθούν miRNAs που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση της έκφρασης των miRNAs που αναφέρθηκαν παραπάνω μεταξύ αντιστοιχισμένων δειγμάτων ασθενών (matched samples) στο πλάσμα και στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος θα χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία κατάταξης Wilcoxon (Wilcoxon Signed Rank Test). Το αποτέλεσμα της στατιστικής τιμής της δοκιμής Wilcoxon αφορά στην πιθανότητα η μηδενική υπόθεση (null hypothesis), δηλαδή η πιθανότητα δύο πληθυσμοί μεταβλητές να ανήκουν στο ίδιο δείγμα, να προσδιορισθεί σε αληθής. Όσο χαμηλότερη η τιμή p, τόσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά μεταξύ των πληθυσμών. Κατά συνέπεια, η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται. Από την ανάλυση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ αντιστοιχισμένων δειγμάτων άσματος και μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, αναμένεται να βρεθεί ότι η στατιστική τιμή της δοκιμής Wilcoxon για το miR-34a αναμένεται να είναι p<0.001, για το miR-1463 αναμένεται να είναι p<0.001, για το mi 155 αναμένεται να είναι p<0.001, για το miR-2000 αναμένεται να είναι p<0.001, για το miR-2006 αναμένεται να είναι p<0.001 και για το mi 223 αναμένεται να είναι p=0.016 (92). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, άρα η έκφραση των miRNAs στο πλάσμα είναι ανεξάρτητη και δε σχετίζεται με την αντίστοιχη έκφραση στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος.

Σύγκριση της έκφρασης των συστατικών του μηχανισμού ρύθμισης των microRNA, Drosha, Dicer και AGO2 και των let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202 miRNAs στο πλάσμα και στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) σε αντιστοιχισμένα δείγματα ασθενών με MMKΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με Pembrolizumab αναστολέα PD-1 σε συνδυασμό με QMMM-ταξινομημένα και Εξατομικευμένα Νεοαντιγονικά Εμβόλια MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE, Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη Δενδριτική DCTs Ανοσοθεραπεία και γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας.

Σκοπός της παρούσας είναι η συγκριτική μελέτη της κυτταρικής εντόπισης και έκφρασης των συστατικών του μηχανισμού ρύθμισης των microRNA, Drosha, Dicer και AGO2, στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε MMKΠ ασθενείς που δε θα εμβολιασθούν με MicrolynaqTM-TAAS-VACCINES σε σύγκριση με αυτούς που θα εμβολιασθούν με In-Silico σχεδιασμένα, κβαντομοριακά αναμεμειγμένα και εξατομικευμένα νεοαντιγονικά εμβόλια, τα MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE, σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Συγκεκριμένα, θα ελεγχθούν τα επίπεδα έκφρασης και κυτταρικής εντόπισης των Drosha, Dicer και AGO2 στα CTC κύτταρα των 69 εγκεφαλαιωμένων ασθενών με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού. Η παρούσα κλινική μελέτη είναι η πρώτη που μελετά την κυτταρική εντόπιση της Drosha invitro και σε ιστούς από ασθενείς με ανθρώπινο καρκίνο του πνεύμονα στους οποίους χορηγήθηκε συνδυασμός In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE σε ασθενείς με MMKΠ σε συγχρόνηση με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Επίσης, τα κυτταρικά επίπεδα της Drosha αναμένεται να είναι στατιστικά χαμηλότερα στους ανεμβολιαστούς ασθενείς της ομάδας ελέγχου σε σχέση με τα επίπεδα

αυτών που θα εντοπιστούν στους ασθενείς που θα εμβολιαστούν με MicrolynaqTM-TAAS-VACCINES. Τα ευρήματα αυτά αναμένεται να υποδηλώσουν τη συμμετοχή και την επίδραση της MicrolynaqTM θεραπείας στα επίπεδα έκφρασης της ριβονουκλεάσης Droscha στην πνευμονική κακοήγη εξαλλαγή και στην παθογένεια του MMKP όπως επίσης και στην εξέλιξη της νόσου. Η παρούσα εργασία θα είναι η πρώτη που θα μελετά την κυτταρική εντόπιση της Dicer in vitro και σε ιστούς ασθενών στους οποίους χορηγήθηκε συνδυασμός In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE σε ασθενείς με MMKP σε συγχρόνηση με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Τέλος, αναμένεται να παρατηρηθεί ότι τα κυτταρικά επίπεδα της ενδονουκλεάσης AGO2 θα είναι στατιστικά χαμηλότερα στους ανεμβολίαστους ασθενείς της ομάδας ελέγχου σε σχέση με τα επίπεδα αυτών που θα εντοπιστούν στους ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε συνδυασμός In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE σε συγχρόνηση με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Μάλιστα, και για την πρωτεΐνη AGO2 αναμένεται να παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα ανοσοέκφρασης θα είναι στατιστικά χαμηλότερα στους ανεμβολίαστους ασθενείς της ομάδας ελέγχου σε σχέση με τα επίπεδα αυτών που θα εντοπιστούν στους ασθενείς των οποίους χορηγήθηκε συνδυασμός In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE σε ασθενείς με MMKP σε συγχρόνηση με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Σε αυτή την κλινική μελέτη θα μελετηθεί η έκφραση των miRNAs των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό MMKP, οι οποίοι θα λάβουν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με Pembrolizumab αναστολέα PD-1 σε συνδυασμό με In-Silico σχεδιασμένα και κβαντομοριακώς **αναμεμειγμένα** Εξατομικευμένα Νεοαντιγονικά Εμβόλια MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE 1,2, Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές στην Παθολογική Ογκολογική κλινική όπου θα διενεργηθεί η παρούσα κλινική μελέτη κατά το χρονικό διάστημα 2025-2028 κατά την οποία θα πραγματοποιηθεί σύγκριση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ των αντιστοιχισμένων δειγμάτων των εμβολιασμένων και των ανεμβολίαστων ασθενών της ομάδας ελέγχου στο πλάσμα και στα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Η εύρεση και επιλογή του δείγματος των ομάδων ασθενών, καθώς επίσης τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού θα περιγράφονται σε αυτή την κλινική μελέτη στην παράγραφο <<Υλικά και Μέθοδοι>>. Σε αυτή τη κλινική μελέτη θα μελετηθούν μόνο τα miRNAs που σχετίζονται με τη ρύθμιση των σημείων ελέγχου (miR-34a, - 2000, miR-2000), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων (miR-155, miR-146) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223), ενώ δε θα μελετηθούν miRNAs που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση της έκφρασης των miRNAs που αναφέρθηκαν παραπάνω μεταξύ αντιστοιχισμένων δειγμάτων ασθενών (matched samples) και των ανεμβολίαστων ασθενών της ομάδας ελέγχου στο πλάσμα και στα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος θα χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία κατάταξης Wilcoxon (Wilcoxon Signed Rank Test). Στην ομάδα των ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό MMKP, οι οποίοι θα έχουν λάβει συνδυασμό In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και του αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, τα αποτελέσματα των αναλύσεων αναμένεται να δείξουν ότι τα miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 θα εμφανίσουν μία διαφορετική έκφραση μεταξύ των εμβολιασμένων ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs θα συσχετιστούν με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως αναμένεται να είναι η κλίμακα λειτουργικής κατάστασης, το στάδιο της νόσου, το πλήθος των μεταστατικών εστιών, η παρουσία ηπατικών και οστικών μεταστάσεων, ενώ παράλληλα θα συσχετιστούν και με την ελεγχόμενη πορεία νόσου και την παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσο. Το αποτέλεσμα της στατιστικής τιμής της δοκιμής Wilcoxon θα αφορά στην πιθανότητα η μηδενική υπόθεση (null hypothesis), δηλαδή η πιθανότητα δύο πληθυσμοί μεταβλητές να ανήκουν στο ίδιο δείγμα, να προσδιοριστεί σε αληθής. Όσο χαμηλότερη η τιμή p, τόσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά μεταξύ των πληθυσμών. Κατά συνέπεια, η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται. Από την ανάλυση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ αντιστοιχισμένων δειγμάτων μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, αναμένεται να βρεθεί ότι η στατιστική τιμή της δοκιμής Wilcoxon για το miR-34a αναμένεται να είναι p<0.001, για το miR-1463 αναμένεται να είναι p<0.001, για το miR-155 αναμένεται να είναι p<0.001, για το miR-2000 αναμένεται να είναι p<0.001, για το miR-2006 αναμένεται να είναι p<0.001 και για το miR-223 αναμένεται να είναι p=0.016. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, άρα η έκφραση των miRNAs στο πλάσμα είναι ανεξάρτητη και δε θα σχετίζεται με την αντίστοιχη έκφραση στα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος.

Συγκριτική ανάλυση της διαφορετικής έκφρασης των μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων miRNAs στόχων στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου των ανεμβολίαστων ασθενών κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης της έκφρασης των miRNAs-στόχων μεταξύ των δειγμάτων των 69 ασθενών σε σχέση με τα δείγματα της ομάδας ελέγχου των ανεμβολίαστων ασθενών, θα πραγματοποιηθεί με τη δοκιμή Mann-Whitney U τεστ. Από την

ανάλυση αναμένεται να προκύψει ότι στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των αναμένεται να παρουσιάσει το miR-268, το miR-300, το miR-34a, το miR-146a, το miR-155, miR-195, το miR-2000, το miR-200c, το miR-202 και το miR-223. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των miR (p<0.001), miR-30d (p<0.001), miR-342 (p<0.001), miR-146a (0<0.001), miR-155 (p<0.001), miR-2000 (p<0.001), miR-200c (p<0.001), miR-202 (p<0.001) και miR-223 (p<0.001) αναμένεται να είναι χαμηλότερη στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ αντίθετα η έκφραση του miR-195 (p<0.001) αναμένεται να είναι υψηλότερη στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου των ανεμβολιαστων ασθενών. Μόνο για το let-7d δεν αναμένεται να παρατηρηθούν σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ της των ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Η μέση τιμή έκφρασης για το κάθε miRNA στόχο, καθώς και η σχετική έκφραση για τα δείγματα των ασθενών και της ομάδας ελέγχου των ανεμβολιαστων ασθενών θα καταγράφονται και θα συγκεντρώνονται όπως και τα παραπάνω αποτελέσματα υπό μορφή διαγραμμάτων box plot κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας.

Κυκλοφορούμενες κλινικο-εργαστηριακές σε κυκλοφορούντα κύτταρα του όγκου (CTCs) ασθενών που τους χορηγήθηκαν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Τα CTCs είναι κύτταρα που προέρχονται από έναν πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή (μεταστατικό) όγκο και συμμετέχουν στη μεταστατική διαδικασία. Ωστόσο, η κυτταρική μετακίνηση είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και οι παθογενετικοί της μηχανισμοί πρέπει να διασαφηνιστούν πλήρως. Επίσης, παραμένει ασαφές εάν τα CTCs προέρχονται από κεντρικούς υποπληθυσμούς του όγκου ή αν αντιπροσωπεύουν το σύνολο του όγκου. Αυτά τα κύτταρα εισέρχονται στη ροή των διαφόρων βιολογικών υγρών, όπως το αίμα και τα ούρα. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι, στην περίπτωση των μη-πλακωδών όγκων ασθενών που θα τους χορηγηθεί αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένοι ανοσοτροποποιητές και ο αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας, τα CTCs θα συλλέγονται από το αίμα ασθενών στους οποίους έχει ήδη διενεργηθεί ENB ενδοβρογχική βιοψία λεμφαδένων η οποία θα γίνεται από πνευμονολόγο ή θωρακοχειρουργό. Επιπλέον, η VATS βιοψία μετά από θωρακοσκόπηση ασθενών που ολοκλήρωσαν τον παραπάνω συνδυασμό με τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE αναμένεται να παρέχει πιο ακριβή αποτελέσματα σε σύγκριση με αυτήν του αίματος, αν και η αιμοληψία φαίνεται να είναι λιγότερο επεμβατική και λιγότερο επικίνδυνη όσον αφορά τις πιθανές επιπλοκές από Βιοψία με τέμνουσα βελόνη η οποία θα πρέπει να γίνεται από επεμβατικό ακτινολόγο.

Κυκλοφορούμενες κλινικο-εργαστηριακές σε εξωκυττάρια κυστίδια / Εξωσωμάτια (Extracellular Vesicles, EVs / Exosomes) και μικρο-ριβονουκλεϊκά οξέα (micro-ribonucleic acids, miRNAs) ασθενών που τους χορηγήθηκαν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV), αυτόλογη δένδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1 της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Αρχικά, τα εξωσώματα θεωρούνταν ως απόβλητα των κυττάρων, αλλά τώρα γνωρίζουμε ότι λειτουργούν ως κυστίδια σήματος μεταξύ των κυττάρων και αποτελούν συντονιστές της κυτταρικής επικοινωνίας μέσω της μεταφοράς πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων (Théry, 2011). Η μεταφορά των εξωσωμάτων εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου-αποδέκτη και συμβαίνει κυρίως μέσω φαγο- ή ενδοκυττάρωσης (Christianson et al., 2013; Cocucci & Meldolesi, 2015). Τα εξωσώματα παίζουν κύριο ρόλο στην παθοφυσιολογία των ασθενειών, καθώς και στην κυτταρική ανάπτυξη, την ομοιοστάση και την ανοσοαντίδραση (De Toro et al., 2015; Skouras, Gargalionis, et al., 2023). Τα κύτταρα του όγκου εκπέμπουν έναν υψηλό αριθμό εξωσωμάτων στον εξωκυτταρικό χώρο, τα οποία ερευνήθηκαν αρχικά ως μη-κυτταρικά θεραπευτικά αντιγόνα για την ανάπτυξη εμβολίων κατά των όγκων ή των μολυσματικών ασθενειών (Kai ré et al., 2002; Chaput et al., 2004), και τα περισσότερα από τα οποία είναι δομημένα από λειτουργικά βιομόρια miRNAs (Romano et al., 2020). Σε αυτό το πλαίσιο, τα εξωσώματα ασθενών που τους χορηγήθηκαν PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) και ο αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων των PD-1, της Pembrolizumab, εφόσον αυτός είναι διαθέσιμος, σε συνδυασμό με τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας, θα εξετασθούν ως προς τα επίπεδα των miRNAs και άλλων ενώσεων που θα μπορούν να αντικατοπτρίσουν την πρόοδο νόσου MMKP, και κατ' επέκταση να χρησιμεύσουν ως αντιπροσωπευτικά εργαλεία για το μοριακό προφίλ του αντίστοιχου όγκου ασθενή που θα του χορηγηθούν τα εμβόλια Microlynaq-TM VACCINE σε συνδυασμό με PACLITAXEL 200 MG / M², CARBOPLATIN AUC 6 (IV) και ο αναστολέας σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος συμπεριλαμβανομένων των PD-1, της Pembrolizumab, κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας.

Μέθοδοι μετρήσεις των δεικτών αγγειογένεσης χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) στα δείγματα των ασθενών κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Τα επίπεδα VEGF και EGFR στον ορό θα μετρηθούν κατά την έναρξη και πριν από τον τρίτο και τον έκτο κύκλο Microlynaq-TM θεραπείας σε όλους τους ασθενείς χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ενζυμικής ανοσοαπορρόφησης ELISA (enzyme-

linked immunosorbent assay). Η μέτρηση αυτών των δεικτών θα λάβει χώρα στο ερευνητικό τμήμα της εταιρείας myoncotherapy.com. Η ανωτέρω μέθοδος είναι κατάλληλη για την ανίχνευση-μέτρηση πεπτιδίων (αντιγόνα, αντισώματα) σε διάφορα υγρά (πλάσμα, ορός, υλικό καλλιέργειας κυττάρων). Η αρχή της μεθόδου θα στηρίζεται στη σύνδεση των υπό μελέτη πεπτιδίων (CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1 αντιγόνων) με τα πρωτογενή αντισώματά τους. Στο πρωτογενές αντίσωμα προσδένεται ακολούθως το λεγόμενο δευτερογενές αντίσωμα το οποίο φέρει συνδεδεμένο κατάλληλο ένζυμο. Το τελευταίο καταλύει την σύνδεση των δύο αντισωμάτων παράγοντας οπτικό σήμα (αλλαγή χρώματος) Το παραγόμενο οπτικό σήμα ανιχνεύεται με σπεκτομετρία, η δε έντασή του είναι ανάλογη της αντίδρασης που το προκαλεί (πολλαπλασιαζόμενο από την ενζυμική δραστηριότητα). Κατάλληλα διαγράμματα αντιστοιχούν εντάσεις σήματος με συγκεντρώσεις του προς μέτρηση πεπτιδίου. Όλες οι αντιδράσεις θα πραγματοποιούνται σε κατάλληλα επεξεργασμένη στερεή επιφάνεια, στη λεγόμενη αντιγονική πλάκα. Όλα τα δείγματα θα φυγοκεντρηθούν στις 2000 στροφές για 15 λεπτά. Ο ορός του ολικού αίματος θα τοποθετηθεί σε πολλαπλά σωληνάρια αποθήκευσης (aliquots), τα οποία θα καταψυχθούν στους -80° C έως την μέτρηση τους. Για την μέτρηση του VEGF-A (VEGF) και του EGFR θα χρησιμοποιηθούν οι ειδικές πλάκες (kit) της BioVentor Human ELISA (biotin labeled antibody). Τα δείγματα θα επωαστούν 4 φορές σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αφού επιτευχθεί το επιθυμητό χρώμα, η ενζυμική αντίδραση θα τερματιστεί με την προσθήκη ειδικού όξινου διαλύματος τερματισμού και η πλάκα θα διαβαστεί σε φασματοφωτόμετρο σε μήκος κύματος 450nm. Στη συνέχεια θα δημιουργηθεί μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, από τις συγκεντρώσεις VEGF 15,6, 31, 3, 62. 5, 125,0, 2500, 500,0 και 1000.0 pg / ml και οι ενδιάμεσες, μεγαλύτερες ή μικρότερες συγκεντρώσεις θα προκύψουν υπολογιστικά από αυτήν την καμπύλη. Η ευαισθησία της μεθόδου αναμένεται να είναι 7pg / ml. Στα δείγματα βρογχικής και διαβρογχικής βιοψίας θα διενεργηθεί προσδιορισμός της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης αντίστοιχα των EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERbB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF των 69 ασθενών της Microlynaq-TM θεραπείας σε αυτόματο μηχάνημα BOND της LEICA με πλήρες ανιχνευτικό σύστημα ανοσοϊστοχημείας δυο σταδίων, πολυμερές, ελεύθερης βιοτίνης, κοντής αλυσίδας (BOND POLYMER REFINE DETECTION). Η απο παραφίνωση των τομών θα διενεργηθεί με dewax solution σε αυτόματο μηχάνημα ανοσοϊστοχημικής χρήσης (BOND) κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας. Πριν την εφαρμογή του αντισώματος θα διενεργηθεί ανάκτηση αντιγόνου σε υψηλή θερμοκρασία (99 βαθμών κελσίου) με χρήση διαλύματος ανάκτησης κυτρίκων 0,01M pH=6 (citrate buffer) BOND EPITOPE RETRIEVAL ERIK EDTA PH=8 BOND EPITOPE RETRIEVAL ER2 για 30'.

High Resolution Melting Analysis (HRMA)Έλεγχος EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERbB2, MYC, KRAS, M ET,CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF μεταλλάξεων στα δείγματα των ασθενών κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας

Μεταλλαγές στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον Υποδοχέα Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) σχετίζονται με ανταπόκριση των ασθενών σε στοχευμένη θεραπεία. Πρόκειται για μικρές απαλοιφές αμινοξέων ή σημειακές μεταλλαγές που εντοπίζονται στην αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την περιοχή κινάσης τυροσίνης (εξώνια 18-21). Λόγω αυξημένου οικονομικού κόστους, θα διενεργηθεί μια επιλογή των ασθενών των οποίων αναδρομικά οι βιοψίες θα ελεγχθούν μόνο για την ύπαρξη EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERbB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF μεταλλάξεων. Έτσι θα διενεργηθεί ανάλυση μιας υποομάδας ασθενών με μακρά επιβίωση (1,9 έτη). Για τον έλεγχο των μεταλλάξεων, θα αποσταλεί καρκινικός ιστός εγκλεισμένος σε παραφίνη στην εταιρεία BIOGENEA.GR (MYONCOTHERAPY.COM). Από τα υπό εξέταση δείγματα θα εκχυλιστεί γενωμικό DNA. Η ανίχνευση των μεταλλαγών θα διενεργηθεί με High Resolution Melting Analysis (HRMA) και ταυτοποίησή τους με απευθείας προσδιορισμό της αλληλουχίας DNA (sequencing - ABI Prism 3130 sequencer) των εξωνίων κατά τα χρονικά μεσοδιαστήματα των αρχών της 6^{ης}, 13^{ης} και 25^{ης} εβδομάδας.

Ανεπιθύμητες ενέργειες

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες θα διαβαθμιστούν σύμφωνα με τα κοινά κριτήρια τοξικότητας για τις ανεπιθύμητες ενέργειες του αμερικάνικου Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου, έκδοση Events 4.0. Οι ασθενείς της Microlynaq-TM θεραπείας θα εκτιμηθούν για όλους τους βαθμούς των ανεπιθύμητων ενεργειών, για τις σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες και τις ανεπιθύμητες ενέργειες που απαιτούν προσωρινή ή οριστική διακοπή της συνδυαστικής θεραπείας της παρούσας μελέτης. Για βαθμούς 1 ή 2 τοξικές επιδράσεις, συμπτωματική θεραπεία δε θα συνιστάται μείωση της δόσης των εμβολίων **MicrolynaqTM**. Για βαθμούς 3 τοξικές επιδράσεις, η μείωση της δόσης (**MicrolynaqTM** 100 mg) ή η προσωρινή διακοπή της συνδυαστικής Microlynaq-TM θεραπείας αναμένεται να είναι αναγκαία. Συνίσταται προσωρινή διακοπή της συνδυαστικής Microlynaq-TM θεραπείας σε τυχόν πνευμονική αιμορραγία ή οποιοδήποτε σοβαρό αιμορραγικό επεισόδιο (βαθμού 3 ή υψηλότερη), ιδιαίτερα σε ασθενείς που λαμβάνουν Pembrolizumab και τη **MicrolynaqTM** θεραπεία συνδυασμού.

Στατιστική Ανάλυση

Στην Microlynaq-TM μελέτη οι συνεχείς μεταβλητές θα παρουσιάζονται με τις διάμεσες τιμές τους και με το εύρος τιμών ενώ οι δυαδικές ως συχνότητες με τα αντίστοιχα ποσοστά. Οι διαφορές μεταξύ των θα αξιολογηθούν με Fisher και chi-square εκτιμητές και για τις συνεχείς μεταβλητές θα χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία Mann-Whitney. Η συνολική επιβίωση θα υπολογιστεί από την διάγνωση έως τον θάνατο ή την τελευταία επικοινωνία που είχαμε με κάθε ασθενή ενώ η επιβίωση χωρίς υποτροπή θα υπολογιστεί από την διάγνωση μέχρι την πιστοποιημένη πρόοδο της νόσου, το θάνατο χωρίς πιστοποιημένη υποτροπή ή την τελευταία επικοινωνία με τον ασθενή. Η συνολική επιβίωση και η επιδείνωση χωρίς υποτροπή θα εκτιμηθούν με την μέθοδο Kaplan Meier και οι διαφορές μεταξύ των καμπυλών θα εκτιμηθούν με log-rank test. Για όλες της συγκρίσεις το επίπεδο

σημαντικότητας αναμένεται να είναι απ 0.05. Μονομεταβλητα και πολυμεταβλητά μοντέλα θα δημιουργηθούν προκειμένου να εξεταστεί η προγνωστική αξία των κλινικών χαρακτηριστικών αλλά και των δεικτών αγγειογένεσης. Προκειμένου να εκτιμηθεί η προγνωστική αξία της συγκέντρωσης των δεικτών αγγειογένεσης ως προς την συνολική επιβίωση και την επιβίωση χωρίς υποτροπή, θα χωρίσουμε τους ασθενείς σε δύο ομάδες χρησιμοποιώντας ως σημείο αποκοπής (cut off) την θετική έκφραση κατά 50% συγκέντρωσης κάθε δείκτη στον ορό και στη βρογχική βιοψία αντίστοιχα. Έτσι οι ασθενείς θα χωριστούν σε αυτούς που θα έχουν υψηλές τιμές συγκέντρωσης των *EGFR*, *CDA*, *RRM1*, *RRM2*, *dCK*, *hENT1*, *ERBB2*, *MYC*, *KRAS*, *MET*, *CCND1*, *CDK4*, *EML4-ALK fusion*, *BCL2* και *VEGF* όπως και των επιπέδων της διαφορικής έκφρασης των μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων των *miR-26a*, *miR-30d*, *miR-34a*, *miR-146a*, *miR-155*, *miR-195*, *miR-200b*, *miR-200c*, *miR-202* και *miR-223* μεταξύ των ασθενών των Ομάδων και σε αυτούς με χαμηλές, μικρότερες από το 50% του δείγματος για κάθε δείκτη χωριστά.

Εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία

Η αξιολόγηση της ανταπόκρισης των ασθενών των Ομάδων στη Microlynaq-TM θεραπεία θα διενεργηθεί με βάση τα κριτήρια αξιολόγησης της απόκρισης σε συμπαγείς όγκους (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST, 1.1 criteria) και τις διαθέσιμες αξονικές (computed tomography, CT) και μαγνητικές (magnetic resonance imaging, MRI) τομογραφίες από το φάκελο νοσηλείας του κάθε ασθενή. Με βάση την ανταπόκριση στη θεραπεία, οι ασθενείς θα χαρακτηριστούν με μερική απόκριση (partial response, PR), σταθερή νόσο (stable disease, SD) και πρόοδο νόσου (progressive disease, PD). Ως αντικειμενική ανταπόκριση στη θεραπεία (Objective response rate, ORR) θα οριστεί το σύνολο των ασθενών που παρουσίασαν μερική απόκριση (PR), ως βέλτιστη απόκριση στη χορηγούμενη Microlynaq-TM θεραπεία. Ως ελεγχόμενη πορεία νόσου (disease control rate, DCR) θα οριστεί το σύνολο των ασθενών που παρουσίασαν είτε μερική απόκριση (PR), είτε σταθερή νόσο, ως βέλτιστη απόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία. Τέλος, ως παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσος (prolonged duration of disease control, PDDC) θα οριστεί το σύνολο των ασθενών που παρουσίασαν είτε μερική απόκριση (PR), είτε σταθερή νόσο για διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών, ως βέλτιστη απόκριση στη χορηγούμενη Microlynaq-TM θεραπεία.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κλινικά, η θεραπεία του ΜΚΚΠ χωρίς χημειοθεραπεία είναι ευπρόσδεκτη και αποδεκτή από όλο και περισσότερους ασθενείς λόγω των μειωμένων πιθανών παρενεργειών της. Επομένως, ο τρόπος βελτίωσης της αντικαρκινικής θεραπευτικής αποτελεσματικότητας χωρίς αύξηση των προφανών τοξικοτήτων και παρενεργειών είναι η προϋπόθεση της κλινικής προώθησης. Το εμβόλιο νεοαντιγόνου μπορεί να προκαλέσει τη διήθηση των ειδικών για τον όγκο Τ κυττάρων χωρίς σημαντική αύξηση της τοξικότητας και είναι μία από τις καλύτερες επιλογές για επιλογές θεραπείας κλινικού συνδυασμού. Εν τω μεταξύ, το φορτίο μετάλλαξης όγκου του ΜΚΚΠ είναι υψηλό μεταξύ όλων των όγκων, γεγονός που παρείχε μεγαλύτερη σκοπιμότητα στους ασθενείς να ελέγχουν εξατομικευμένα και υψηλής ποιότητας νεοαντιγόνα όγκου για την παρασκευή εμβολίου. Η παρούσα κλινική μελέτη αναμένεται να επιβεβαιώσει ότι ο συνδυασμός θεραπείας πρώτης γραμμής με In-Silico σχεδιασμένα, κβαντομοριακά **αναμειγμένα** και εξατομικευμένα νεοαντιγονικά εμβόλια MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE θα μπορούσε να βελτιώσει περαιτέρω την αποτελεσματικότητα και να παρουσιάσει καλή ασφάλεια στον ΜΚΚΠ. Στη μελέτη μας, αναμένεται αρχικά ότι το εμβόλιο νεοαντιγόνου σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab έναντι του ΜΚΚΠ να επιδείξει καλή ασφάλεια και σκοπιμότητα. Η διπλή αναστολή που αναμένεται να επιτευχθεί με τη χορήγηση των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINES σε ασθενείς με ΜΚΚΠ σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab αναμένεται να μειώσει πολλαπλάσια τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών όγκων σε σύγκριση με τον αποκλεισμό του VEGF ή του EGFR μόνο του. Ωστόσο, η παρούσα κλινική μελέτη αναμένεται να οδηγήσει σε στατιστικά σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης υπέρ του reprotizumab ή των MicrolynaqTM ή του συνδυασμού τους με αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, αποτέλεσμα που συνάδει με την πρόσφατη βιβλιογραφία, με ένα όφελος επιβίωσης 255 ημερών (8,5 μήνες) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, στατιστικά σημαντικό. Επιπλέον, ο συνδυασμός reprotizumab και MicrolynaqTM αναμένεται να καθυστερήσει την εξέλιξη της νόσου μέχρι το τέλος του πρώτου έτους θεραπείας. Ο συνεργικός ρόλος των MicrolynaqTM στην αναστολή της αγγειογένεσης και της ανάπτυξης του όγκου αναμένεται να προσφέρει μια εξήγηση στην καθυστέρηση εξέλιξης της νόσου παράλληλα, αναμένεται να καθυστερήσει η ανάπτυξη αντίστασης έναντι των εμβολίων MicrolynaqTM ή του συνδυασμού τους με αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία και της Pembrolizumab από τα καρκινικά κύτταρα η οποία αναμένεται να καταστήσει τις στοχευμένες θεραπείες μη ανενεργές ακόμα και μετά το χρονικό διάστημα των 10-14 μηνών, πέρα από το οποίο η ανάπτυξη αντίστασης του όγκου στους EGFR-TKI οδηγεί στην υποτροπή της νόσου, γεγονός που αντανάσσεται να φανεί στην παρούσα μελέτη. Ο συνδυασμός των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab αναμένεται να αποδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική θεραπείας πρώτης γραμμής με υψηλή θεραπευτική αποτελεσματικότητα σε

διάφορους συμπαγείς όγκους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα και του ήπατος. Στην παρούσα μελέτη αναμένεται να αναδειχθεί ότι ο συνδυασμός των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακά ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών Εμβολίων MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab θα μπορέσει να αυξήσει σημαντικά τη διήθηση των CD4 και CD8+ T λεμφοκυττάρων εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου αυξάνοντας το ποσοστό έκφρασης του Mki67 βιοδείκτη, ο οποίος είναι ένας δείκτης ενεργού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό τους, αυξάνοντας περαιτέρω τον αριθμό των τελεστικών κυττάρων με αντικαρκινικές επιδράσεις, τα οποία συμβάλουν στο σχηματισμό της ανοσολογικής μνήμης, επιτρέποντας στα κύτταρα να ανταποκριθούν καλύτερα στο ίδιο αντιγόνο κατά την επανεμφάνιση, διατηρώντας έτσι τις μακροπρόθεσμες ανοσολογικές επιδράσεις κατά του όγκου, αποτρέποντας την υποτροπή και τη μετάσταση του όγκου. Ωστόσο, τα περισσότερα από αυτά τα κύτταρα είναι παρευρισκόμενα T κύτταρα (π.χ. ιός γρίπης, ιός EBV) με μικρή αντικαρκινική δράση και αναμένεται να περιορίσουν τη βελτίωση της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας. Συνολικά, αυτή η προσέγγιση είναι πολλά υποσχόμενη ως μια νέα στρατηγική χωρίς σημαντική δόση χημειοθεραπείας για τη θεραπεία του ΜΚΚΠ. Με συνέπεια, η έρευνά μας αναμένεται επίσης να δείξει ότι η συνδυασμένη θεραπεία MicrolynaqTM μπορεί να προκαλέσει τη διαφοροποίηση των αφελών CD8+ T κυττάρων σε Mki67-θετικά T κύτταρα εντός του όγκου, οδηγώντας σε αυξημένο εμπλουτισμό των ειδικών για νεοαντιγόνο Mki67-θετικών CD8+ T κυττάρων στο σημείο του όγκου, υποδεικνύοντας ισχυρές αντικαρκινικές ανοσολογικές επιδράσεις. Συνοπτικά, στα πλαίσια ολοκλήρωσης της παρούσας κλινικής μελέτης θα έχουμε καθιερώσει μια ασφαλή και εφικτή ολοκληρωμένη θεραπευτική προσέγγιση για τον προχωρημένο ΜΚΚΠ συνδυάζοντας εξατομικευμένα νέο-αντιγονικά εμβόλια ταξινομημένων νέο-επιτόπων με TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) σε συνδυασμό με αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου ενισχύοντας έτσι σημαντικά τον εμπλουτισμό των ειδικών για νεοαντιγόνο Mki67 T κυττάρων εντός του όγκου και βελτιώνοντας έτσι τις αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Παρόλο ότι για την μεγαλύτερη κατά το δυνατόν ομογενοποίηση και βέλτιστη ερμηνεία των αποτελεσμάτων τα δείγματα ιστού που συμπεριλήφθηκαν στην ερευνητική αυτή εργασία προήλθαν εξ ολοκλήρου από τον πρωτοπαθή όγκο των ασθενών, είναι πιθανό το προφίλ της ενδο-ογκικής μεταγραφικής έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στο βιοψτικό υλικό να διαφέρει από εκείνο των δευτεροπαθών εντοπίσεων ή / και σε άλλες περιοχές του πρωτοπαθή όγκου, ιδίως στους ασθενείς με μετάχρονη μεταστατική νόσο. Το εν λόγω ζήτημα δεν αφορά, βέβαια, μόνο στην προβλεπτική ισχύ των προαναφερθέντων γονιδίων, αλλά και στην πλειονότητα των μοριακών βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην καθημερινή ογκολογική κλινική πράξη. Αυτή η συνδυαστική θεραπεία θα προσφέρει μια νέα θεραπευτική επιλογή χωρίς χημειοθεραπεία για ασθενείς που είχαν δυσανεξία ή δυσανεξία στη χημειοθεραπεία. Η επί του παρόντος συνδυαστική MicrolynaqTM θεραπεία αναμένεται επίσης να ανταποκριθεί θετικά στη θεραπεία με αντισώματα αντι-PD-1 / PD-L1 όπως και σε συνδυασμό με άλλες ανοσοθεραπείες οι οποίες εξαρτώνται από το μικροπεριβάλλον του όγκου (TIME), το οποίο μπορεί να διακριθεί ως ανοσογονικό (θερμό) TIME ή μη ανοσογονικό (ψυχρό) TIME διεγείροντας την In-Vivo παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων TILs και κυτοκινών όπως και υψηλά επίπεδα έκφρασης PD-L1 τα οποία δύναται να εμφανίζονται σε θερμούς όγκους, ενώ οι ψυχροί όγκοι δεν δείχνουν σχεδόν καμία έκφραση PD-L1 και καμία διήθηση T-κυττάρων. Επομένως, κάποιος από τους λόγους για τους οποίους η συνδυαστική με αντισώματα anti-PD-1 / PD-L1 MicrolynaqTM θεραπεία θα μπορεί να παρέχει καλύτερα κλινικά αποτελέσματα είναι οι εξής: 1) θα δύναται να δημιουργήσει ένα θερμό TIME, για παράδειγμα, αύξηση της έκφρασης PD-1 ή αύξηση των TIL, η οποία μπορεί να ενισχύσει την αντικαρκινική δραστηριότητα. 2) θα μπορεί να στοχεύει σε άλλους τύπους κυττάρων στο TIME, όπως τα MDSC, και θα είναι σε θέση να παρέχει αθροιστική επίδραση σε ολόκληρο το μικροπεριβάλλον του όγκου ή 3) θα μπορεί να μειώνει τη δόση ή τον χρόνο θεραπείας σε σύγκριση με μία μόνο θεραπεία, η οποία μπορεί να μειώσει τις παρενέργειες των φαρμάκων. Συνολικά, υπάρχουν πολλές μέθοδοι συνδυαστικής θεραπείας και αυτές οι συνδυαστικές θεραπείες έχουν συνεργετικά αποτελέσματα, τα οποία μπορούν να βελτιώσουν την αποτελεσματικότητα των θεραπειών σε διάφορους καρκίνους (Jiang et al., 2019). Τα εμβόλια όμως με βάση το RNA έχουν αναδειχθεί ως ένα πολλά υποσχόμενο υποκατάστατο για τα συμβατικά εμβόλια. Το πεδίο ενός ανανεμιγμένου με TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) νεοαντιγονικού εμβολίου κατά του καρκίνου του πνεύμονα βρίσκεται σε φάση ανάπτυξης και μόνο λίγες μελέτες είναι διαθέσιμες, ιδιαίτερα για την θεραπεία του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα τους υποδηλώνουν τη σημασία της ανοσοθεραπείας που βασίζεται σε mRNA πληροφορία σε συνδυασμούς με αναστολείς του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Khan et al., 2021). Επιπλέον, συνδυάζοντας τα μεταγραφικά πρότυπα του συνόλου των γονιδίων EGFR, CDA, RRM1, RRM2, dCK, hENT1, ERBB2, MYC, KRAS, MET, CCND1, CDK4, EML4-ALK fusion, BCL2 και VEGF, και των μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων (microRNA)s: miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 θα επιχειρηθεί στην παρούσα κλινική μελέτη η διαμόρφωση ενός σύνθετου, πολυεπίπεδου, περιγραφικού και συνδυαστικού βιοδείκτη ικανού να προβλέψει την κλινική έκβαση με βάση τον βαθμό χημειοευαισθησίας του όγκου στη συνδυαστική Microlynaq-TM θεραπεία. Παράλληλα και δεδομένης της διαφορικής αλληλεπίδρασης του BRCA1 status με τη δραστηριότητα της Paclitaxel 200 mg / m² ταξάνων και της Carboplatin AUC 6 (IV) από την άλλη, η προβλεπτική ικανότητα της μεταγραφικής έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων, καθώς επίσης η ενδεχόμενη αλληλεπίδραση τους με το σύνολο των γονιδίων και των μικρο-ριβονουκλεϊκών οξέων (microRNA) της παρούσας κλινικής μελέτης θα ελεγχθεί ξεχωριστά στην ομάδα ασθενών της παρούσας κλινικής μελέτης όπου τα εξατομικευμένα νεοαντιγονικά εμβόλια MicrolynaqTM-TAAs-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE θα συνδυαστούν με Paclitaxel 200 mg / m², με Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab. Εξ όσων γνωρίζουμε, η παρούσα μελέτη θα είναι μέχρι σήμερα η

μεγαλύτερη σε αριθμό ασθενών που έχει διερευνήσει εκτενώς και συνδυαστικά τον δυνητικό προβλεπτικό ρόλο όλων των προαναφερθέντων γονιδίων στο θεραπευτικό πλαίσιο της χορήγησης In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων Microlynaq™-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, and ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένων ανοσοτροποποιητών και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab και η πρώτη που θα καταδεικνύει σημαντική συσχέτιση τόσο σε στατιστικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο μεταξύ της συνδυασμένης μεταγραφικής τους έκφρασης και της κλινικής έκβασης κατόπιν χημειοθεραπείας με βάση τη Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV) και Pembrolizumab. Ο εκ των προτέρων προσδιορισμός των μηχανισμών αντίστασης για την έναρξη στοχευμένων θεραπειών θα απεικονίσει μια σημαντική πρόκληση. Η βαθύτερη ανάλυση του καρκινικού όγκου, συμπεριλαμβανομένης της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος, της αλληλουχίας μονοκυτταρικού RNA, της πολυδιάστατης κυτταρομετρίας ροής ή της επιγενετικής ενδέχεται να εφαρμοστούν στο μέλλον για την εύρεση χρήσης εξατομικευμένων στρατηγικών ανοσοθεραπείας (Horvath et al., 2020). Συμπερασματικά, οι νεοαντιγονικοί Εμβολιασμοί Microlynaq™-TM VACCINE θα αξιολογηθούν ως μια εφικτή θεραπευτική στρατηγική για ανοσολογικά ψυχρούς όγκους με σχετικά χαμηλό μεταλλακτικό φορτίο με στόχο τη μείωση του αριθμού των CD4+ T κυττάρων που έχουν αναφερθεί σε όγκους MMKP που υποτροπιάζουν ταχέως μεταξύ των ασθενών με χαμηλά επίπεδα διάγνωσης. Τα ανοσοφαινοτυπικά άρτια ΔΚ θα ωριμάζουν σε μεγάλη κλίμακα με χρήση των βιοαντιδραστήρων, για πρώτη φορά σε αυτού του είδους τις καλλιέργειες χρησιμοποιώντας το κοκτέιλ των αγωνιστών R848 (4μg/ml) & Poly(I:C) (20μg/ml) R848 (4μg/ml), Poly(I:C) (20μg/ml) & Εμβολίων Microlynaq™ VACCINE βάση βιβλιογραφίας για 24, 48 και 72ώρες με μέσα χαμηλότερου κόστους έναντι των συμβατικών μεθόδων ωρίμανσης και αναμένεται να είναι άκρως λειτουργικά και ικανά να αντιγονοπαρουσιάσουν και να επάγουν ειδικές ανοσοαποκρίσεις. Σε αντίθεση με τις καθιερωμένες μεθόδους ωρίμανσης των ΔΚ που περιλαμβάνουν τη χρήση TLR Ls και αυξητικών παραγόντων (IL-1β, TNF-α, PGE-E2, GM-CSF, IL-4) για 48 ώρες, ως εναλλακτικό τρόπο ωρίμανσης προτείνουμε τη χρήση των In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων Microlynaq™ VACCINE καθώς θα περιέχουν TLR-Ls και θα μπορούσαν να έχουν παρόμοια απόκριση. Τα Εμβόλια αυτά είναι παρασκευασμένα για κλινική χρήση ενώ είναι σαφώς οικονομικότερα συγκριτικά με τα προϋπάρχοντα και αναμένεται να μπορούν να συμβάλλουν σε επιτυχή αντιγονοπαρουσίαση με ικανοποιητική έκφραση των συνδιεγερτικών μορίων CD86, CD83 και CD40 ενώ παράλληλα να ωριμάζουν τα κύτταρα ώστε να εκκρίνουν τις απαραίτητες για Th1 απόκριση κυτοκίνες. Σκοπός της παρούσας μελέτης θα είναι και η βελτιστοποίηση των γενετικών αλγορίθμων ευρετικής αναζήτησης που προβλέπουν την ανοσογονικότητα των επιτόπων CD8+, τις νεοεπιτόπιες συστηματικές ανοσοαποκρίσεις και τελικά τις νεοεπιτόπιες συστηματικές ανοσοαποκρίσεις των επιτόπων CD4+, οι οποίοι μπορούν να βοηθήσουν στην αποσαφήνιση αυτών των αποτελεσμάτων καθώς και στην ενίσχυση της ανοσογονικότητας εξατομικευμένων νέο-αντιγονικών εμβολίων. Αυτή θα είναι μια δοκιμή φάσης I-II διερεύνησης της ασφάλειας και της ανοσολογικής απόκρισης του νέου εμβολίου Microlynaq™-TM σε ασθενείς με MMKP. Επειδή η εξέλιξη του όγκου, η μετάσταση και η αγγειογένεση εξαρτώνται από την ενεργοποίηση πολλαπλών οδών και γενετικών αλλαγών, αναμένεται ότι η ταυτόχρονη δέσμευση των διαφόρων οδών σηματοδότησης θα μπορεί να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα αυτής της συνδυαστικής θεραπείας. Αυτό είναι το σκεπτικό για το συνδυασμό στοχευμένων θεραπειών σε ασθενείς με MMKP. Το κλινικό πρωτόκολλο Microlynaq™-TM θα επικεντρώνεται στην πρόβλεψη και το σχεδιασμό Ειδικών In-Silico σχεδιασμένων, κβαντομοριακώς ταξινομημένων και εξατομικευμένων Νεοαντιγόνων για τον Καρκίνο από σωματικές μεταλλάξεις του ίδιου του ασθενούς που διαφέρουν από τα αντιγόνα άγριου τύπου και θα είναι ειδικό για κάθε μεμονωμένο ασθενή.

Πρωτεύοντα τελικά σημεία:

Προσδιορισμός του προφίλ ασφάλειας και ανεκτικότητας του συνδυασμού In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων Microlynaq™-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και την τυπική θεραπεία με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος, την Pembrolizumab.

Δευτερεύοντα τελικά σημεία:

Περιγραφικές αναλύσεις των επαγόμενων T-κυττάρων ανοσοαποκρίσεων μετά από εμβολιασμούς με Microlynaq™-TM VACCINE σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m², Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab.

Συνολική επιβίωση με το Microlynaq™-TM VACCINE με προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητικές σε πρόσφατα διαγνωσμένο MMKP σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, την Pembrolizumab.

Επιβίωση χωρίς εξέλιξη με το Microlynaq™-TM VACCINE με προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητικές σε πρόσφατα διαγνωσμένο MMKP σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με έναν αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, την Pembrolizumab.

Πρωταρχικός Σκοπός: Θεραπεία

Κατανομή : N / A

Επεμβατικό Μοντέλο: Ενιαία Ομαδική Ανάθεση

Απόκρυψη: Κανένα (Ανοιχτή ετικέτα)

Όπλα και Επεμβάσεις

Ποια θα είναι η μέτρηση της μελέτης;

Μέτρα πρωτογενούς αποτελέσματος

Μέτρο Αποτελεσμάτων	Περιγραφή μέτρου	Χρονικό Πλαίσιο
Ασφάλεια και ανοχή	Προσδιορισμός του προφίλ ασφάλειας και ανεκτικότητας συνδυαστικής θεραπείας In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE σε ασθενείς με MMKΠ σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m ² , Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab	Συνεχώς για περίπου 40 εβδομάδες συν παρακολούθηση

Δευτερεύοντα Μέτρα Αποτελεσμάτων

Μέτρο Αποτελεσμάτων	Περιγραφή μέτρου	Χρονικό Πλαίσιο
Ανοσολογική απόκριση των T-κυττάρων	Περιγραφική ανάλυση των επαγόμενων ανοσοαποκρίσεων των T-κυττάρων μετά από εμβολιασμούς με Microlynaq-TM VACCINE φαρμακευτικά προϊόντα με προσωποποιημένους ανοσοτροποποιητές και την τυπική θεραπεία αναστολέων σημείων ελέγχου ανοσοποιητικού συστήματος.	έως 24 μήνες από τον Εμβόλιασμο
Συνολική επιβίωση (OS)	Συνολική επιβίωση σε συνδυαστική θεραπεία In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE σε ασθενείς με MMKΠ σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m ² , Carboplatin AUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab.	έως 24 μήνες από τον Εμβόλιασμο
Επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS)	Επιβίωση χωρίς εξέλιξη σε συνδυαστική θεραπεία In-Silico σχεδιασμένων και κβαντομοριακώς ταξινομημένων εξατομικευμένων νεοαντιγονικών εμβολίων MicrolynaqTM-TAAS-(CAGE, GBU4-5, HuD, NY-ESO-1, p53, SOX2, ZNF573, BRAF, MAGE.A4, BMI1, FXR1, HuC, και ESO1) VACCINE σε ασθενείς με MMKΠ σε συνδυασμό με Paclitaxel 200 mg / m ² , CarboplatinAUC 6 (IV), αυτόλογη δενδριτική DCTs ανοσοθεραπεία, γενετικά πρόσωπο-επιλεγμένους ανοσοτροποποιητές και ενός αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος στοχευόμενου κατά του PD-1, της Pembrolizumab.	έως 12 μήνες από τον Εμβόλιασμο

Συνεργάτες και Ερευνητές

Ανάδοχος

-Ογκολογική Κλινική

Συνεργάτες

- Biogenea Pharmaceuticals Ltd

Ερευνητές

- Κύριος Ερευνητής: Γρηγοριάδης Ιωάννης

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACT: Adoptive Cell Therapy, Θεραπεία υιοθετούμενων κυττάρων

ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, εξαρτώμενη από αντισώματα κυτταρομεσολαβητική κυτταροτοξικότητα

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase, Κινάση αναπλαστικού λεμφώματος

APCs: antigen presenting cells, αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα

BCR: B cell receptor, υποδοχέας B κυττάρου

CAR: chimeric antigen receptor, χιμαϊρικοί αντιγονικοί υποδοχείς

CTLA-4: cytotoxic T lymphocyte antigen 4, αντιγόνο-4 του κυτταροτοξικού T λεμφοκυττάρου

CTLs: cytotoxic T lymphocytes, κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα

DCs: dendritic cells, δενδριτικά κύτταρα

ECM: extracellular matrix, εξωκυτταρική μήτρα

FDA: Food and Drug Administration, Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων

HLA: Human Leukocyte Antigen, Ανθρώπινα Λευκοκυτταρικά Αντιγόνα

IARC: World Health Organization's International Agency for Research on Cancer, Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο

ICIs: immune checkpoint inhibitors, αναστολείς ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου

IFNs: interferons, ιντερφερόνες IHC: immunohistochemistry, ανοσοϊστοχημεία

IL-2: Interleukin-2, Ιντερλευκίνη-2

irAEs: immune related adverse events, ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό mAbs: monoclonal antibodies, μονοκλωνικά αντισώματα

MAPK: mitogen-activated protein kinase, ενεργοποιημένη μιτογόνος πρωτεϊνική κινάση

MHC: Major Histocompatibility Complex, μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας mTOR: mammalian Target of Rapamycin, αυξημένος στόχος δράσης της ραπαμυκίνης

NF-κB: Nuclear factor-κB, Πυρηνικός παράγοντας – κB 11

MKKII: Non-small cell lung cancer, Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα

ORR: Overall response rate, συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης

OS: Overall-survival, συνολική επιβίωση

PD-1: Programmed cell death protein 1, Πρωτεΐνη 1 προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου

PD-L1: Programmed cell death-ligand 1, Συνδέτης 1 προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1

PFS: progression free survival, συνολική επιβίωση χωρίς εξέλιξη

PI3K: phosphoinositide 3-kinase, φωσφοϊνοσιτιδική 3-κινάσης

SCLC: Small cell lung cancer, Μικροκυτταρικός Καρκίνος Πνεύμονα

TAA: termed tumour-associated antigens, αντιγόνα που σχετίζονται με τον όγκο

TC: T cytotoxic, T κυτταροτοξικά

TCR: T-cell receptor, υποδοχέας T κυττάρου

TILs: Tumor-Infiltrating Lymphocytes, διηθητικά λεμφοκύτταρα σε όγκο

TIME: Tumor Immune Microenvironment, ανοσολογικό μικροπεριβάλλον όγκου

TLR: Toll-Like Receptor, Toll-Like υποδοχέας

TPS: Tumor Proportion Score, ποσοστό έκφρασης αντιγόνου στα κύτταρα όγκου

Treg: T regulatory cell, T ρυθμιστικό κύτταρο

EGFR: Epidermal growth factor receptor, Υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

NK: Natural killer cells, κύτταρα φυσικοί φονείς

TH: T helper, T βοηθητικά

TMB: Tumor mutational burden, Φορτίο μετάλλαξης όγκου

TNM: Tumor Node Metastasis, Όγκος Λεμφαδένες Μετάσταση

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ Γ ΟΝΙΔΙΩΝ

5hmC
5-hydroxymethylcytosine

5mC
methylcytosine

bHLH
basic helix-loop-helix

DEG
differentially expressed gene

DhMR
differentially hydroxyl-methylated region

DMR
differentially methylated region

DNMT
DNA methyltransferase

EMT
epithelial–mesenchymal transition

FDR

false discovery rate

GO

gene ontology

HIF

hypoxia-inducible factor

hMeDIP

hydroxymethylated DNA immunoprecipitation

HRE

hypoxia response element

KEGG

Kyoto Encyclopedia of Genes **and** Genomes

MBD

methyl binding protein domain

MeDIP

methylated DNA immunoprecipitation

MKKII

non-small-cell lung cancer

RPKM

reads per kb per million reads

TET

ten-eleven translocation

TSS

transcriptional start site

ΓΛΩΣΣΑΡΙ

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

Frameshift mutation: παραλλαγή που τροποποιεί το πλαίσιο ανάγνωσης

Genotype: γονότυπος

Insertions / deletions (Indels): απαλείψεις / εισχωρήσεις

Missense mutation: παρανοηματική μετάλλαξη

Mutation hotspot: περιοχή με υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων

Next Generation Sequencing (NGS): αλληλούχιση νέας γενιάς

Non sense mutation: μη νοηματική μετάλλαξη

Rearrangements: γενωμικές αναδιατάξεις

Single Nucleotide Polymorphism (SNP): μονονουκλεοτιδικός πολυμορφισμός

Single Nucleotide Variant (SNV): παραλλαγή του ενός νουκλεοτιδίου

Splice site mutation: μετάλλαξη που επηρεάζει το κανονικό μάτισμα

The Cancer Genome Atlas (TCGA): Άτλαντας Καρκινικού Γονιδιώματος

Structural variant (SV): δομική παραλλαγή

Variant calling: ανίχνευση γενετικών παραλλαγών

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