



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Optimització del tractament oncològic pel pacient amb càncer colorectal metastàtic RAS natiu

Julen Fernández Plana

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**OPTIMITZACIÓ DEL TRACTAMENT ONCOLÒGIC PEL PACIENT AMB CÀNCER
COLORECTAL METASTÀTIC RAS NATIU**

Tesi presentada per

Julen Fernández Plana

Per optar al grau de Doctor en Medicina

Director de tesi: Clara Montagut Viladot

Tutor de tesi: Aleix Prat Aparicio

Centre de Recerca: Hospital Universitari MútuaTerrassa

Línia de Recerca: Oncologia i Hematologia

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

2018

A la meva família

“Tot surt del gran llibre de la naturalesa.
El gran llibre,
sempre obert i que hem de fer un esforç per llegir,
és el de la Naturalesa,
i els altres llibres es prenen a partir d’ell,
i en ells es troben els errors i males interpretacions dels homes”

Antoni Gaudí

Agraïments

A tots el malalts que voluntàriament han participat en els estudis que es presenten en aquesta tesi.

A tots els investigadors de diferents hospitals que han fet possibles els estudis que es presenten en aquesta tesi. Pel seu interès en la ciència i en els malalts.

Per tots el professors que he tingut al llarg de la vida. Gràcies per tantes respostes. Gràcies per motivar el meu interès per aprendre.

Per tots els companys del hospital i dels comitès de tumors amb qui treballo cada dia.

A la Conxi i la Dolors pel seu suport.

A tot el Servei d'Oncologia, per la seva amistat i companyia.

Al Dr. Cirera, sense ell aquesta tesi no hagués estat possible.

A la Dra. Montagut per dirigir aquesta tesi i al Dr. Prat per ser-ne tutor.

Als meus pares, sogres i germà, per la vostra empenta, suport i estima.

A la Júlia, per ser la meva llum i el meu somriure.

A l'Òlbia. La teva força i capacitat de treball ho fa tot fàcil. La teva estima fa que tot valgui la pena. Compartir la vida amb tu és un regal.

PRODUCCIÓ CIENTÍFICA

Els resultats exposats en aquesta tesi s'han publicat en revistes científiques i s'han presentat en congressos internacionals.

Publicacions en revistes indexades

Fernández-Plana J, Pericay C, Quintero G, Alonso V, Salud A, Mendez M, Salgado M, Saigi E, Cirera L; ACROSS Study Group. Biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 in the first-line treatment of wild-type KRAS metastatic colorectal cancer: final results of a phase II, open-label, clinical trial (OPTIMIX-ACROSS Study). *BMC Cancer* 2014;14:865

Alonso V, Escudero P, Fernández-Martos C, Salud A, Méndez M, Gallego J, Rodríguez JR, Martín-Richard M, **Fernández-Plana J**, Manzano H, Méndez JC, Zanui M, Falcó E, Gil-Raga M, Rojo F, Cuatrecasas M, Feliu J, García-Albéniz X, Maurel J. Coexpression of p-IGF-1R and MMP-7 Modulates Panitumumab and Cetuximab Efficacy in RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Neoplasia* 2018 Jul;20(7):678-686

Comunicacions en congressos

Fernández-Plana J. Co-autor Prospective evaluation of BRAF, PI3K and PTEN as predictive and prognostic biomarkers in firstline advanced KRAS wildtype colorectal cancer treated with FOLFOX or FOLFIRI plus biweekly cetuximab. GEMCAD 1002. *Abstract 3533 presentat al congrés anual de la European Society for Medical Oncology (ESMO) 2016*

Fernández-Plana, J. Co-autor. Effect of coexpression of p-IGF-1R and MMP-7 on panitumumab and cetuximab efficacy in RAS wild-type metastatic colorectal cancer patients. *Abstract presentat al congrés anual de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2018 annual meeting number for publication: e15576*

Fernández-Plana, J. Co-autor. Phase II prospective biomarker study in advanced RAS wild-type colorectal cancer: POSIBA trial—GEMCAD 10-02 *Abstract presentat a ASCO 2018 annual meeting. number for publication: e15506*

Fernández-Plana J. Co-autor. Prospective biomarker study in advanced RAS wild-type colorectal cancer. POSIBA trial. *Abstract acceptat, serà presentat ESMO 2018 Abstract: 3440*

Fernández-Plana J. Co-autor. Clinical impact of circulating tumor RAS and BRAF mutation dynamics in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy plus anti-EGFR therapy. Combined analysis of two prospective clinical trials. GEMCAD Group. *Abstract acceptat, serà presentat a ESMO 2018. Abstract: 3454*

ABREVIATURES

ADCC: citotoxicitat cel·lular lligada a anticòs o *antibody-dependent cell mediated-citotoxicity*

CAFs: fibroblastes associats al càncer

CECOG: *Central European Co-operative Oncology Group*

CCR: càncer colorectal

CCRM: càncer colorectal metastàtic

CMS: consensus molecular subtype

CTL: limfòcits citotòxics T

DP: *double-positive phenotype*

EGFR: *epidermal growth factor receptor*

EMT: transició epiteli-mesènquima

Fc γ Rs: *receptors for the Fc portion of IgG or Fc gamma receptors*

IGFR: *insulin-like growth factor receptor*

IGF-1R: *type 1 insulin-like growth factor receptor*

IGFBP-3: *insulin-like growth factor-binding protein 3*

MMP-7: *matrix metalloproteinase-7*

MSI: inestabilitat de microsatèl·lits

NF- κ B: *nuclear factor kappa B*

NK: *natural killers*

RECIST: *response evaluation criteria in solid tumors*

RFS: recurrence free survival

VEGFR: *vascular endothelial growth factor receptor*

SG: supervivència global

SLP: supervivència lliure de progressió

STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3*

TAM: macròfags associats a tumor o *tumor-associated macrophages*

VEGF : *vascular endothelial growth factor*

Vs: versus

WT: *wild-type*

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ.....	15
1.1 Epidemiologia i generalitats en el maneig oncològic del càncer colorectal (CCR)	15
1.2 El receptor del creixement del factor epidèrmic (EGFR)	16
1.2.1 Tractaments anti-EGFR. Cetuximab i panitumumab.....	16
1.2.2 Perfil de toxicitat dels tractaments anti-EGFR.....	17
1.3 Desenvolupament dels tractaments anti-EGFR	18
1.3.1 Desenvolupament previ a la incorporació de biomarcadors de resposta	18
1.3.2 Biomarcadors de resposta a tractament anti-EGFR	19
1.3.2.1 Incorporació de RAS com a biomarcador de resposta a tractaments anti-EGFR.	19
1.3.2.2 BRAF com a biomarcador en CCRm	22
1.3.2.3 Lateralitat tumoral	23
1.3.2.4 Classificació molecular-genètica-immunològica	25
1.3.2.4.1 Classificació molecular	25
1.3.2.4.2 Classificació immunològica.....	29
1.3.2.4.2.1 Macròfags associats a tumor	31
1.3.2.5 Heterogeneïtat molecular temporal i espacial.....	32
1.3.2.6 IGF i MMP-7.....	33
1.3.2.7Altres biomarcadors en CCRm.....	36
2. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....	37
Objectiu 2.1	37
Objectiu 2.2	37
3. PUBLICACIONS.....	39
4. DISCUSSIÓ	57
5. CONCLUSIONS	65
6. BIBLIOGRAFIA.....	67

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Epidemiologia i generalitats en el maneig oncològic del càncer colorectal (CCR)

El càncer colorectal és el tercer tumor en incidència nivell mundial. Representa 1.3 milions de nous diagnòstics de càncer i 694000 morts a l'any 2012 (1).

El CCR és també una de les més freqüents de càncer en els països occidentals i és la segona causa de mort per càncer a Espanya.

A Espanya es diagnostiquen cada any més de 40.000 casos nous de CCR (2) amb més de 15000 morts per aquest tumor cada any (Institut Nacional d'Epidemiologia. Mortalitat per càncer 2014).

Dels casos nous diagnosticats, el 15-20% presenten malaltia metastàtica en el moment del diagnòstic i fins al 50 % de tots els pacients presentaran finalment malaltia metastàtica.

Històricament, la mitjana de supervivència dels pacients afectes d'un càncer colorectal metastàtic ha estat de 10-12 mesos si són tractats amb fluoropirimidines (5-fluorouracil).

Nombrosos factors clínics s'han relacionat amb el pronòstic i la resposta a la quimioteràpia del CCR. Alguns relacionats amb el pacient, com són l'edat, l'estat general (*performance status/PS*), la pèrdua ponderal, l'anèmia i la funció del òrgans vitals (fetge, ronyó i medul·la). Altres, relacionats amb el tumor, com són l'estadi tumoral, el nombre i localització de metàstasis, paràmetres de càrrega tumoral (leucocitosi, CEA, LDH), l'interval lliure de malaltia, entre d'altres (3). També marcadors moleculars i genètics, destacant la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i mutacions en RAS i BRAF(4).

La introducció d'oxaliplatí i irinotecan va augmentar la mitjana de supervivència fins als 19-20 mesos (5).

Amb intenció de millorar els resultats assolits amb quimioteràpies com 5-fluorouracil, irinotecan i oxaliplatí, es varen desenvolupar teràpies biològiques o dirigides. Entre d'altres cal destacar els tractaments dirigits contra el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) i contra el receptor de creixement vascular (VEGFR)(6)(7)(8).

1.2 El receptor del creixement del factor epidèrmic (EGFR)

EGFR és una proteïna tirosina quinasa que s'expressa en múltiples tipus de cèl·lules tumorals, incloent-hi els tumors de mama, ovari, bufeta, cap i coll, pròstata i tumor colorectal, entre d'altres.

El tractament que inhibeix processos bioquímics de la carcinogènesi dependents d'EGFR aconseguen que el tumor disminueixi (respongui al tractament). Així mateix, el tractament amb anticossos monoclonals inhibidors d'EGFR augmenta la supervivència del pacient amb càncer colorectal metastàtic. Actualment, existeixen dos anticossos monoclonals aprovats pel tractament del càncer colorectal metastàtic, cetuximab i panitumumab.

1.2.1 Tractaments anti-EGFR. Cetuximab i panitumumab

Cetuximab és un anticòs quimèric de la subclasse IgG1. El anticòs té una afinitat d'unió a EGFR major que el lligant natural EGF. Cetuximab bloqueja la unió d'EGF i TGF- α , inhibint l'activació induïda pels lligants d'aquest receptor tirosina quinasa, i per tant, inhibeix així el creixement tumoral. També produeix la internalització del receptor EGFR, impedit la interacció amb el receptor. Com a molècula IgG1 estimula la immunitat cel·lular depenent d'anticòs (9). Cetuximab té un efecte antitumoral additiu en ser combinat amb quimioteràpia

Panitumumab és un altre anticòs anti-EGFR destacat. Panitumumab és un anticòs IgG2 totalment humanitzat que, com cetuximab, bloqueja la unió de EGF i TGF- α amb el seu receptor, inhibint així el creixement tumoral. Pel fet de ser totalment humanitzat estimula dèbilment la immunitat cel·lular depenent d'anticòs (10).

Els anticossos actuen directament sobre les cèl·lules tumorals o indirectament mitjançant les cèl·lules immunes del microambient tumoral. La seva capacitat de induir la regressió tumoral depèn de la seva naturalesa bifuncional: el fragment d'unió

a l'antigen (Fab) confereix una especificitat contra el antigen, mentre que el fragment constant (Fc) desencadena funcions efectores anticòs-dependents mitjançant la participació de una varietat de receptors de Fc (Fc γ Rs). Aquestes funcions efectores inclouen la citotoxicitat i la fagocitosi cel·lular depenent de anticossos (ADCC i ADCP) i la citotoxicitat dependent del complement (CDC).

Els anticossos clínics són de la classe IgG, que es subdivideixen en 4 isotips: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. La regió Fc d'aquest 4 isotip s'uneix als Fc γ Rs amb diferent afinitat i especificitat. Los Fc γ Rs estan localitzats en la superfície de les cèl·lules immunes efectores NK (*Natural Killers*), neutròfils, macròfags/monòcits. Poden exercir un rol activador quan correspon a Fc GRI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA o bé un acció inhibidòria quan correspon a Fc γ RIIb(11). Cal destacar que els anticossos IgG2 i els IgG4 interactuen escassament amb els Fc γ Rs i presenten funcions efectores escasses, mentre que els IgG1 i IgG3 interactuen més fortament amb els Fc γ Rs i, per tant, produeixen funcions efectores potents. En particular, l'IgG1 és isotip més eficaç en la mediació ADCC.

1.2.2 Perfil de toxicitat dels tractaments anti-EGFR

El tractament amb agents anti-EGFR s'ha associat amb toxicitat dermatològica. És habitual rash cutani, el creixement anormal de les parpelles i trastorns oculars (12). L'efecte advers més freqüent associat a tractaments anti-EGFR és l'erupció acneïforme que apareix en 80% del pacients tractats. La majoria són esdeveniments d'intensitat lleu o moderada. Aquest rash apareix normalment a cara, part superior del tòrax i esquena, i es caracteritza l'aparició de lesions papulopustulars. El maneig consisteix en la utilització d'antibiòtics orals i tòpics, corticoides tòpics i cremes emol·lients (13) (14). El tractament preventiu precoç disminueix de manera significativa la seva incidència e intensitat millorant la qualitat de vida dels pacients tractats amb agents anti-EGFR (15).

Altres toxicitats relacionades amb els tractaments anti-EGFR són: les reaccions d'hipersensibilitat (5%, <3% greus), diarrea, hipomagnesèmia i neutropènia.

1.3 Desenvolupament dels tractaments anti-EGFR

1.3.1 Desenvolupament previ a la incorporació de biomarcadors de resposta

Al 2004 es va publicar un estudi randomitzat en què es va demostrar que cetuximab era actiu en tumors de còlon metastàtic resistent a irinotecan. Es va objectivar que la combinació d'irinotecan més cetuximab tenia un 22% de respostes, mesurada per criteris RECIST (16), i si el cetuximab era utilitzat en monoteràpia condicionava un 10% de respostes (17). En aquest estudi els pacients encara no se seleccionaven per cap biomarcador molecular.

Amb el suport d'aquests resultats, es va estudiar l'activitat de cetuximab en la primera línia del tractament oncològic del càncer colorectal metastàtic (CCRm).

L'estudi CRYSTAL, és un estudi randomitzat, amb el qual es va valorar l'eficàcia de FOLFIRI + cetuximab setmanal en la primera línia de tractament. El disseny d'aquest estudi fase III compara FOLFIRI + cetuximab versus FOLFIRI (18).

Paral·lelament es va desenvolupar l'estudi OPUS. Aquest és un estudi fase II randomitzat, en què es va valorar l'eficàcia de FOLFOX més cetuximab setmanal versus FOLFOX en la primera línia de tractament (19).

Tant l'estudi CRYSTAL com l'estudi OPUS van demostrar que afegir cetuximab a quimioteràpia en primera línia és més eficaç que tractar amb quimioteràpia sola.

La pauta d'administració estàndard de cetuximab implica una infusió setmanal del fàrmac (18) (19). Un estudi Fase I, publicat al 2010, va objectivar que l'administració bisetmanal era funcionalment equivalent a l'administració setmanal de cetuximab (20). Posteriorment, es van publicar diversos estudis Fase 2, en segona i tercera línia de tractament en població no seleccionada biomarcador, que donaven suport a l'opció d'utilitzar cetuximab en règim bisetmanal. Un estudi publicat al 2010, avaluava el perfil de seguretat en 70 pacients tractats amb cetuximab bisetmanal més irinotecan (21). En l'estudi es va objectivar com principals efectes adversos del tractament la diarrea severa per un 13 % dels pacients i el rash cutani sever en un 10%. Després d'objectivar també una supervivència lliure de progressió a les 24 setmanes del 22%, els autors van concloure que la pauta bisetmanal de cetuximab és activa i segura, per la segona

línia de tractament associat a irinotecan. Una pauta bisetmanal de Cetuximab tindria avantatges en termes de comoditat pels pacients i en termes d'eficiència sanitària

1.3.2 Biomarcadors de resposta a tractament anti-EGFR

1.3.2.1 Incorporació de RAS com a biomarcador de resposta a tractaments anti-EGFR.

En el successiu desenvolupament dels tractaments anti-EGFR, es van identificar diversos biomarcadors de resposta que permetien maximitzar el benefici del tractament amb anti-EGFR. Després d'un anàlisi retrospectiu de l'estudi CRYSTAL, es va identificar que el 37% del pacients presentaven una mutació en el gen KRAS. La mutació de KRAS condicionava absència de benefici del tractament amb anti-EGFR. Per altra banda, es va objectivar que els pacients sense mutació en l'exó 2 de KRAS obtenien un benefici major del tractament anti-EGFR que la població global de l'estudi. Els tumor KRAS nadius tractats amb quimioteràpia més anti-EGFR responien en 57% del casos i en un 39% dels casos si es tractaven amb quimioteràpia sola. Amb aquest resultat, es va confirmar que l'estatus mutacional de KRAS era un biomarcador d'eficàcia per cetuximab setmanal + FOLFIRI(22). Resultats similars es van objectivar en termes d'eficàcia per FOLFOX + cetuximab setmanal, després de fer un anàlisi retrospectiu de l'estatus de KRAS de la població inclosa en l'estudi OPUS(23).

L'any 2012, es van publicar els resultats d'un metanàlisi dels estudi CRYSTAL i OPUS, amb que va objectivar la consistència del benefici d'afegir cetuximab a la primera línia de quimioteràpia en pacients KRAS natiu en termes de taxa de resposta, supervivència lliure de progressió i supervivència global (24).

Al 2007 un anàlisi retrospectiu de l'estudi pivotal Fase III de panitumumab en monoteràpia per CCRm, definit prospectivament, va aportar evidència que panitumumab beneficiava clínicament als pacients KRAS-WT (25).

El estudi PRIME va avaluar el paper de panitumumab associat a quimioteràpia, esquema FOLFOX, en primera línia de tractament per pacients KRAS-WT (26).

L'estudi PRIME va assolir el seu objectiu principal, en augmentar la SLP de forma significativa per pacients amb CCRm KRAS-WT.

L'estudi PLANET va comparar panitumumab associat a FOLFOX o FOLFIRI en primera línia de tractament, sense objectivar diferències segons la quimioteràpia assignada (27).

Altres mutacions en la via de RAS (EGFR) poden predir absència de benefici dels tractament contra EGFR. Un anàlisi posterior del mateix estudi PRIME, va objectivar que els tumors amb una mutació als exons 3 i 4 de KRAS o una mutació als exons 2,3,4 de NRAS tampoc es beneficiaven de tractament anti-EGFR. D'altra banda, es va objectivar un major benefici del tractament per aquells pacient sense les noves mutacions (mutacions de resistència) descrites (28). A partir de la publicació d'aquests resultats, l'avaluació de NRAS, va ser inclosa de forma generalitzada en les guies de pràctica clínica.

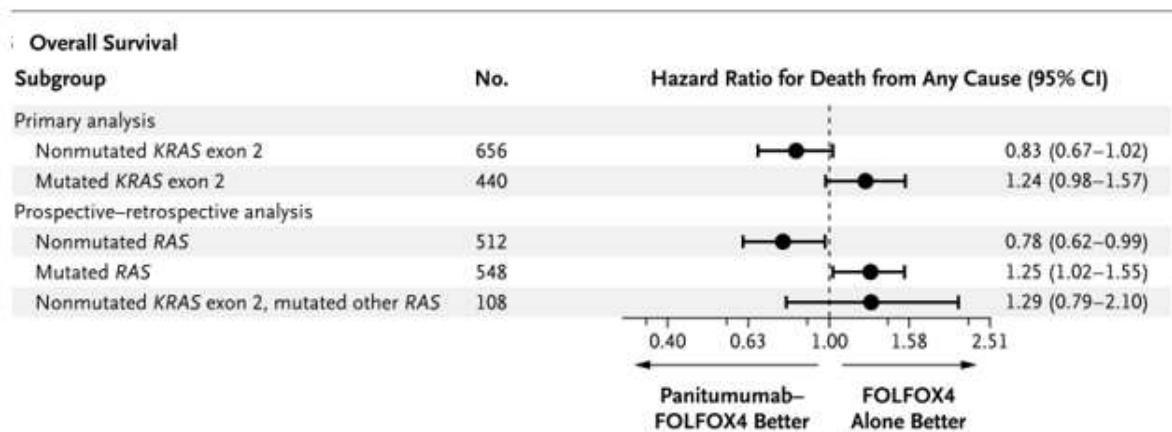


Figura 1 . Hazard ratio de supervivència global segons el perfil mutacional del KRAS i RAS, en pacients afectes de CCRm tractats, en primera línia, amb FOLFOX vs FOLFOX-panitumumab. Adaptat de: *Douillard J-Y. et al. N Engl J Med. 2013; 369 (11):1023–34.*

Posteriorment, l'interès es va centrar en comparar els tractaments de quimioteràpia més anti-EGFRs amb els tractament de quimioteràpia més antiangiogènics

L'estudi PEAK és un estudi randomitzat fase 2 en que comparava FOLFOX més panitumumab contra FOLFOX més bevacizumab (29). L'estudi va objectivar una augment de SLP en pacients diagnosticats de un CCRm RAS-WT. També es va objectivar una augment SG per població RAS-WT/BRAF-WT (30).

L'estudi FIRE-3 va comparar, en primera línia de tractament de CCRm, FOLFIRI + cetuximab versus FOLFIRI + bevacizumab. En aquest estudi es van incloure 592 pacients KRAS exó 2-WT. Les dades d'eficàcia en població RAS-WT (n=400) objectiven que la SG mitjana va ser millor en la branca de FOLFIRI + cetuximab que en la branca de FOLFIRI + bevacizumab. La branca amb QT + cetuximab va assolir una SG de 33 mesos i amb QT + bevacizumab va assolir una SG de 25 mesos (31) .

L'estudi CALGB també va comparar, en primera línia, quimioteràpia, ja fos FOLFOX o FOLFIRI, associat a cetuximab o bevacizumab. A diferència de l'estudi FIRE-3, no es van objectivar diferències entre ambdues branques (32).

La pauta d'administració de cetuximab en règim bisetmanal en primera línia i població KRAS-WT, ha estat avaluada pel grup CECOG (*Central European Co-operative Oncology Group*) . El grup CECOG va portar a terme un estudi fase II randomitzat. En aquest estudi es van randomitzar 152 pacients a rebre FOLFOX + cetuximab bisetmanal, o bé, la mateixa quimioteràpia i cetuximab setmanal. L'estudi va objectivar una taxa de resposta de 62% amb la pauta cetuximab bisetmanal versus 53% amb la pauta de cetuximab setmanal. La SLP va ser similar per les dos branques, 9.2 i 9.5 mesos, respectivament. La SG també va ser similar entre ambdues branques, amb mitjanes de 23 i 25 mesos, respectivament. La conclusió dels autors va ser que el tractament amb FOLFOX i cetuximab setmanal o bisetmanal, són igualment actius (33) .

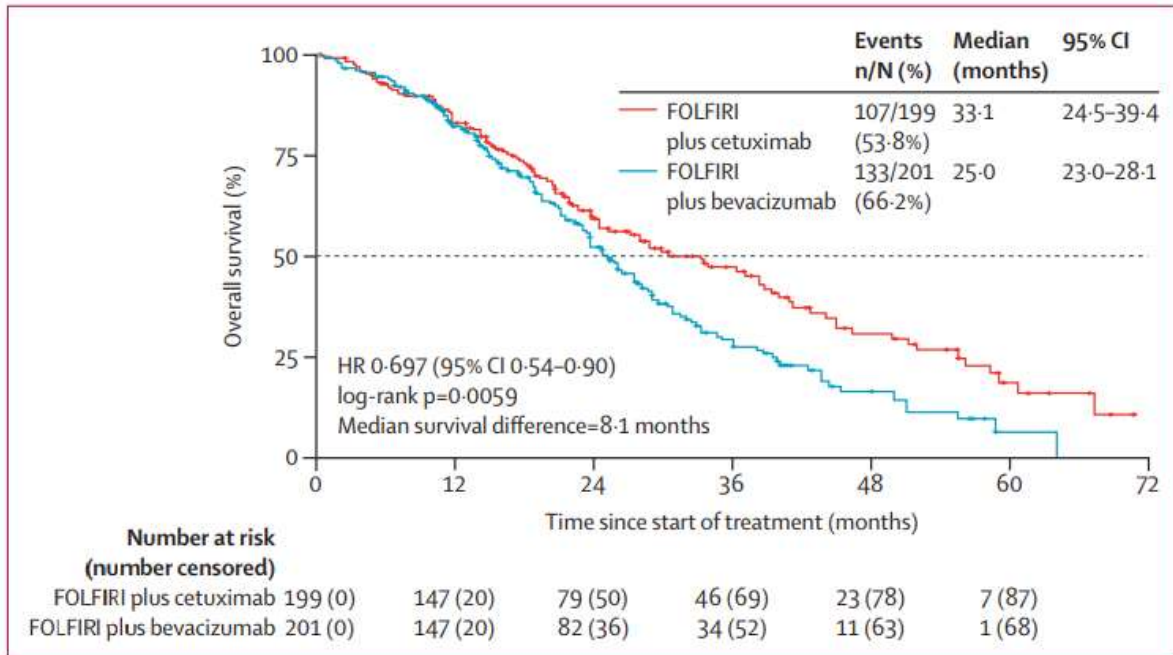


Figura 2. Supervivència global dels pacients RAS-WT inclosos en l'estudi FIRE-3 segons el grup de tractament assignat.

Adaptat de: *Stintzing S. et al. Lancet Oncol 2016;17:1426–1434.*

1.3.2.2 BRAF com a biomarcador en CCRm

BRAF és un altre biomarcadors destacat en CCRm. Les mutacions de BRAF (gairebé sempre V600E) es troben en un 8%-12% dels pacients amb CCRm. La mutació en V600E en BRAF és un biomarcador pronòstic negatiu destacat en CCRm. Tran et al van reportar un mediana de supervivència per pacients CCRm BRAF-mutat de 10.4 mesos, molt inferior al 34 mesos assolits pel grup BRAF-WT (34). Els pacients amb que pateixen un tumor BRAF mutat, tenen en 2/3 dels casos el tumor en el costat dret, associat a un augment de carcinomatosi peritoneal i metàstasis ganglionars a distància. Al voltant d'un 1/3 del tumors BRAF mutat tenen també inestabilitat de microsatèl·lits (MSI). Malgrat el valor predictiu negatiu de BRAF no està fermament demostrat, dos metanàlisis van objectivar que el benefici dels tractaments anti-EGFR és major en pacients RAS i BRAF-WT que pels tumors RAS-WT/BRAF mutat (35) (36). Per altra banda i recentment, s'ha descrit que les mutacions No-V600 en BRAF defineixen un subtipus clínic diferent de excel·lent pronòstic (37). En l'estudi OPUS, mencionat abans, es va determinar que BRAF estava mutat en 7.9% dels casos i que aquesta mutació s'associava negativament a supervivència global (HR=1.82); però

no a la supervivència lliure de progressió. Les guies clíniques europees recomanen la determinació de BRAF a tots els pacient amb CCRm donat el seu destacat valor pronòstic (38) (39).

BRAF és també un biomarcador positiu de resposta a tractament inhibidors de BRAF. El tractament amb vemurafenib, un inhibidor de BRAF, associat a cetuximab més irinotecan ha demostrat, recentment, un augment de la SLP i la Taxa de respostes. El bloqueig simultani a EGFR i BRAF és una estratègia de tractament prometedora pels pacient amb CCRm BRAF V600E mutat (40) .

1.3.2.3 Lateralitat tumoral

Els tumors de còlon dret són menys incidents. S'acompanyen de mutacions a BRAF amb més freqüència del que ho fan els tumors de còlon esquerre. Al diagnòstic presenten tumors amb un estadi més avançat i s'associen a un pitjor pronòstic que els tumor de còlon esquerre (41) (42).

Una possible explicació d'aquestes diferències és el diferent origen embriològic de la part proximal i distal del còlon. Ambdues parts s'adjunten a l'alçada dels dos terços proximals i el terç distal del còlon transvers i tenen diferent aportació sanguínia i diferent drenatge venós i limfàtic. A més a més, destacaria que la lateralitat tumoral es relaciona amb una biologia i característiques moleculars diferenciades (43).

L'anàlisi de diferents estudis avaluant l'eficàcia dels tractaments oncològics ha posat en relleu la rellevància de la localització tumoral del CCR en termes pronòstic i també predictius de resposta als tractaments anti-EGFR.

En un anàlisi retrospectiu dels estudis CRYSTAL i FIRE-3, es va analitzar els resultats segons lateralitat pels pacients RAS-WT(44). Es va objectivar una marcada millora en termes de taxa de resposta, SLP i SG pels pacients amb tumor de còlon esquerre respecte als tumor de còlon dret. En tumors de còlon esquerre, FOLFIRI + cetuximab va millorar significativament la SG respecte a FOLFIRI + bevacizumab. En tumors de còlon dret, s'objectivava un escàs benefici d'afegir cetuximab a la quimioteràpia estàndard (estudi CRYSTAL) i no s'objectivaven diferències entre FOLFIRI + cetuximab o bevacizumab (estudi FIRE-3).

En un destacat anàlisi retrospectiu del estudi CALGB/SWOG 80405 es va analitzar els resultats segons lateralitat pels pacients KRAS-WT (44). En primer lloc, val a dir que la supervivència dels pacients amb un tumor KRAS-WT de còlon dret era significativament menor que si el tumor estava localitzat al còlon esquerre (HR de 1.56; OS 34.2 mesos versus 19.4 mesos, respectivament). En segon lloc, els pacients amb un tumor en còlon esquerre presentaven una discreta milloria en SG si rebien tractament amb quimioteràpia QT + cetuximab enlloc de QT + bevacizumab (SG de 37 i 34 mesos respectivament, sense diferències estadísticament significatives). Contràriament, els pacients afectes d'un tumor de còlon dret, assolien una discreta milloria quan eren tractats amb quimioteràpia + bevacizumab (SG de 9 i 7 mesos respectivament, sense assolir diferències significatives).

En un anàlisi retrospectiu conjunt dels estudis PRIME i PEAK (45), els pacients amb CCRm RAS-WT afectes d'un tumor esquerre assolien, de nou, millors resultats en termes de taxa de resposta, SLP i SG, respecte als tumors de còlon dret. Els tumors de còlon esquerres es beneficiaven significativament de l'addició de panitumumab a la QT.

Finalment, al 2017 es publiquen 2 metaanàlisi que conclouen que els tumor de còlon esquerre tenen millor pronòstic que els tumor de còlon dret. La lateralitat, si el tumor és de còlon esquerre, és un factor predictiu de resposta, SLP i SG per tractaments anti-EGFR (46)(47).

En resum, la lateralitat reflecteix una diferent biologia i característiques moleculars, que condicionen un millor pronòstic pels tumors de còlon esquerre(48) i prediu uns millors resultats pels pacients amb tumors de còlon esquerre RAS-WT quan són tractats amb quimioteràpia + anti-EGFR respecte als comparadors dels diferents estudis mencionats. El CCRm amb primari a còlon dret necessita un abordatge diferent; la seva especial genètica obliga a un abordatge diferent.

1.3.2.4 Classificació molecular-genètica-immunològica

1.3.2.4.1 Classificació molecular

L'evolució dels tractaments diana en CCRm ha consistit fonamentalment en reconèixer biomarcadors que permetin predir una resposta negativa als tractaments anti-EGFR. Recents avenços en el nostre coneixement de subtipus genòmics i transcriptòmics estan influenciant positivament el desenvolupament d'aquests biomarcadors.

El CRC va ser un dels primers tumors sòlids en ser molecularment caracteritzat. El model que va descriure Vogelstein i col·laboradors descriuen com una acumulació progressiva d'esdeveniments genètics i epigenètics abocaven a la formació de adenoma i carcinoma (49). Es descrivia una alteració progressiva en gens supressors tumoral com APC, TP53 i SMAD4; així com en oncogens com KRAS i PI3K; que portaven a la gènesi i progressió del CCR.

L'expressió gènica està íntimament relacionada amb el fenotip i comportament tumoral i s'ha utilitzat per identificar subtipus biològicament homogenis dins el CCR. El resultat ha estat la descripció d'una classificació molecular consensuada que permet categoritzar la majoria de CCR en un de quatre subtipus moleculars (50). Els subgrups són el *consensus molecular subtype 1* o CMS1 o MSI-Immune, que representa el 14% dels tumors en estadi inicial; el CMS2 o canònic, 37% dels tumors en estadi inicial; CMS3 o metabòlic, 13% dels tumors estadi inicial i CMS4 o mesenquimal, 23% dels tumors estadi inicial.

Els tumors classificats com a CMS1 o MSI-immune es caracteritzen per ser hipermutats, hipermetilats, estar enriquit per mutacions de BRAF V600E i tenir una rellevant infiltració i activació immune. Presenten millor pronòstic si no recauen i un pitjor pronòstic després de la recaiguda, respecte a la resta de subtipus. La majoria dels tumors MSI estan classificats dins aquest subgrup.

Els tumors classificats com CMS2 o canònics es caracteritzen per tenir una alta inestabilitat cromosòmica amb una destacada alteració en el número de còpies somàtiques (*SCNA high*). Es caracteritza també per una activació de les vies de WNT

i MYC i un augment de l'expressió d'oncogens com EGFR, HER2, IGF2, ciclines, entre altres.

El tumors classificats com CMS4 o mesenquimals es caracteritzen per tenir també una alta inestabilitat cromosòmica, així com activació de la via de transició epiteli-mesènquima i *stemness*, amb un rol destacat per TGF β i altres integrines, mostra una sobreexpressió de proteïnes relacionades amb la remodelació de la matriu extracel·lular i el complement; així com infiltració de cèl·lules estromals, particularment CAFs o *càncer-associated fibroblasts*. És el grup amb pitjor supervivència lliure de recaiguda i SG.

El tumors classificats com CMS3 o metabòlics, tenen un perfil genòmic i epigenòmic globalment diferenciat comparat amb els altres subgrups, consistent amb menys alteracions en número de còpies somàtiques. La característica dominant a nivell de vies de senyalització tumoral és la reprogramació metabòlica amb activació de la glutaminolisi i lipidogènesi. A més estan enriquits amb mutacions activadores de KRAS.

Així, els diferents subgrups moleculars tenen diferent pronòstic. A més, la previsió pronòstica de cada subgrup molecular canvia segons l' estadificació de la malaltia. Així doncs, per malaltia en estadis inicials, el CMS1 és el de millor pronòstic i el CMS4 el de pitjor pronòstic. En cas de malaltia en estadi avançat, el CMS2 és el de millor pronòstic sent els de pitjor pronòstic els CMS1 i CMS4.

CMS1 MSI immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGF- β activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Figura 3. Subtipus moleculars del CCRm i les seves principals característiques. Adaptat de: *Guinney J et al. Nat Med. 2015;21(11):1350–6.*

Els subgrups moleculars semblen tenir també un paper predictiu de resposta.

Pel que fa al tractament adjuvant del CCR, el subgrups moleculars permetrien predir la resposta a oxaliplatí. Al 2016, Song i col·laboradors, van publicar un anàlisi del estudi NSABP C-07 d'adjuvència, amb 1035 pacients inclosos, en que s'analitzava la utilitat de afegir oxaliplatí a 5-fluorouracil en estadi III, segons el subgrup molecular(51). Es va objectivar que el subgrup CMS2 es beneficiava de forma significativa de afegir oxaliplatí, amb una HR de 0,61 per *recurrence-free-survival* (RFS). Per la resta de subgrups moleculars, no s'assolia una millora estadísticament significativa RFS.

Pel que fa al tractament de CCRm, s'ha objectivat una diferent sensibilitat als tractaments anti-EGFR segons els diferents subgrups. De Sousa i col·laboradors, van identificar, no només que el subgrup molecular mesenquimal conferia mal pronòstic, si no, que a més, conferia resistència als tractaments anti-EGFR en pacients prèviament tractats (52).

L'any 2017 es van comunicar els resultats del estudi FIRE-3 segons els subtipus moleculars. Stintzing i col·laboradors conclouen que no s'objectiven diferències

estadísticament significatives en supervivència pels pacients RAS-WT segons els subgrups CMS, observant-se una marcada tendència en el subgrup CMS4 a favor de FOLFIRI més cetuximab respecte a FOLFIRI + bevacizumab(53).

Per altra banda, el mateix any 2017, es van comunicar els resultats segons el subgrups moleculars del estudi CALGB 80405. Lenz i col·laboradors van comunicar que els pacients inclosos en l'anàlisi amb un CMS1 assolien una millor supervivència quan rebien quimioteràpia més bevacizumab enlloc de cetuximab. Contràriament, els pacients del subgrup molecular CMS2 assolien una millor supervivència quan rebien quimioteràpia més cetuximab enlloc bevacizumab. Amb aquest resultat suggereixen que alguns subgrups moleculars són predictius de resposta a bevacizumab o cetuximab(54).

L'aplicació generalitzada de la classificació transcriptòmica dels subtipus moleculars en la pràctica clínica diària implica dificultats, tant pels costos de la tècnica, com requeriments de material tumorals necessaris. Una mètode alternatiu és la immunohistoquímica que representa una eina molt útil en el diagnòstic clínic, per ser una eina cost-efectiva i de ràpida implementació. El tumors poden ser subclassificats molecularment amb l'ús de la immunohistoquímica analitzant l'expressió de 5 marcadors cel·lulars tumorals, el HTR2B, FRMD6, ZEB1, CDX2 i la pancitoqueratina, amb una alta correlació amb la classificació transcriptòmica(55).

El recent descobriment del subgrups moleculars en CCR ha revelat correlacions entre subtipus molecular, propensió a metastatitzar i resposta a tractament. Aquests subgrups es caracteritzen per una activitat diferenciada en les diverses vies de senyalització cel·lular. A més, els diferents subtipus moleculars també alberguen diferent pronòstic. La classificació per subtipus moleculars (CM) associa els tumors tipus mesenquimal/CMS4 (56) amb mal pronòstic (50)(52) i amb relativa resistència al tractament amb quimioteràpia i a anti-EGFR (55). Cal tenir present que la classificació molecular està basada en l'anàlisi de tumors primaris colorectals i, en l'actualitat, es desconeix si l'estan preservats en malaltia metastàtica. La disseminació i nidificació tumoral en diferents òrgans requereix de l'adaptació de la cèl·lula tumoral per sobreviure i proliferar i això podria implicar una alteració en els patrons d'expressió gènica. És més, l'expressió gènica podria canviar en la mesura que el tumor està

pressionat per tractament oncològics, ja siguin neoadjuvant, adjuvants o pal·liatius(57)(58)(59).

Recentment s'ha publicat la discordància en la classificació molecular entre el tumor primari i les metàstasis hepàtiques de fins al 45%. Aquesta discordància és més notòria en els pacients que haurien rebut tractament amb quimioteràpia prèvia a la resecció de metàstasis hepàtiques, que aquells pacients que no n'haurien rebut. En aquests casos el canvi predominantment hauria estat d'un tumor primari tipus epitelial (no exposat prèviament a quimioteràpia) cap a unes metàstasis amb un patró mesenquimal (exposades a quimioteràpia). Aquestes troballes suggereixen que el tractament amb quimioteràpia neoadjuvant influeix la biologia cel·lular i condueix el tumor cap a un fenotip mesenquimal (60). Aquesta troballa és important, doncs implica que la subclassificació molecular via immunohistoquímica del tumor primari, no pot ser simplement extrapolada per subclassificar el tumor metastàtic, que pot canviar condicionat pel tractaments rebuts.

1.3.2.4.2 Classificació immunològica.

El grup de Galon i col·laboradors van ser els primers en demostrar la rellevància de signatures immunològiques específiques pel que fa al pronòstic del CCR en estadis inicials (61). La infiltració del tumor per limfòcits citotòxics T (CTLs) i cèl·lules Th1 amb un perfil immunològic dominat per interferó- γ , es correlaciona positivament amb la supervivència. Contràriament, la infiltració del tumor per cèl·lules Th17 i un perfil immunològic dominat per Interleukina-17 es correlaciona amb mal pronòstic (56). Estudis recents han establert un anàlisi comprensiu dels perfils immuno-fenotípics del CCR.

El CCR pot tenir un perfil dominat per defectes en la via de *mismatch repair*, hipermutat i amb inestabilitat de microsatèl·lits. Aquest primer subtipus immunològic es caracteritza per l'alta infiltració de cèl·lules T citotòxiques i cèl·lules Th1, que alhora estan inhibides per una sobreexpressió de múltiples elements clau de la resposta immune o *immune checkpoints* (62)(56). Alguns exemples d'aquest *checkpoints* serien *CTL-associated antigen 4 (CTLA4)* o *programmed death protein (PD1)*, entre d'altres. Aquest immunofenotip es correspon habitualment al grup molecular CMS1.

Un altre subtipus immune característic és el tipus inflamat. En aquest subtipus inflamat, el CCR es caracteritza per una marcada sobreexpressió de factors immunosupressors, com ho és TGF- β , i una alta expressió de gens que codifiquen quimiocines per atreure cèl·lules mieloides, incloent-hi *chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)*, *IL-23* i *IL-17*. Aquest subtipus inflamat està lligat al EMT i a CMS4. Els tumors CMS4 no solament estan infiltrats per cèl·lules endotelials i per CAFs sinó també per cèl·lules immunes de la immunitat innata. Aquest subgrup presenta un pitjor pronòstic i va associat a un microambient pro-metastàtic (63).

Finalment un subtipus immune correspon a aquells tumors pobrement immunogènics. Presenten una absència de infiltració limfocitària i de citoquines immuno-reguladores. Aquest subgrup correspon fonamentalment als subtipus moleculars CMS2 i CMS3.

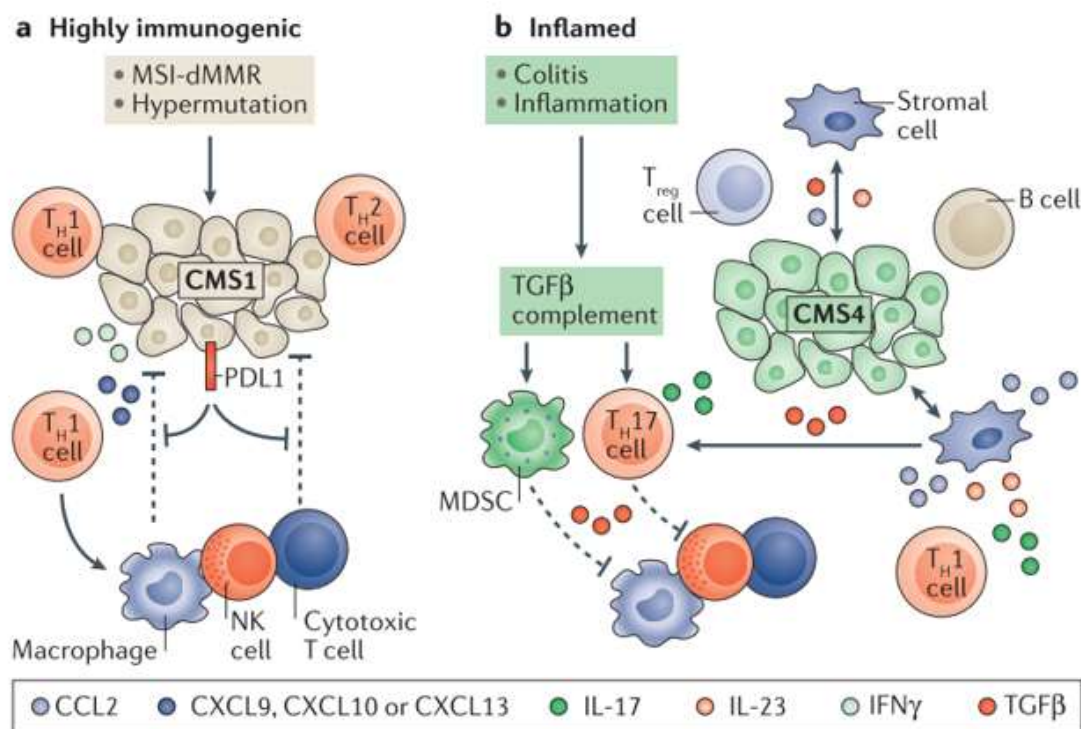


Figura 4. Classificació immunològica del CCR.

Adaptat de: Dienstmann R et al. *Nat Rev Cancer*. 2017 Feb;17(2):79-92. (108)

1.3.2.4.2.1 Macròfags associats a tumor

Els macròfags estan involucrats en diferents processos fisiològics i patològics (64), però més enllà d'aquestes funcions, el macròfags s'han identificat com a una peça clau per orquestrar el microambient tumoral (65). Els macròfags associats a tumor (*TAM*) són de fet un component destacat de la inflamació relacionada amb el càncer, que poden exercir una influència dual en el tumor, depenent de la seva activació, polaritzant-se cap a un fenotip clàssic (M1) que juga un paper proinflamatori i supressor tumoral; o bé, polaritzant-se cap a un fenotip alternativament activat (M2) que juga un paper immunosupressor, protumoral i proangiogènic (66). El fenotip M1 indueix una reacció de les cèl·lules T *helper* tipus I (Th1), mentre que el fenotip M2 ho fa de cèl·lules T *helper* tipus II (67). Els macròfags que infiltren els teixits tumorals són estimulats per citoquines i quimiocines derivades del tumor i de les cèl·lules T a que es polaritzin cap a un fenotip M2 (68). L'eix CCL2/CCR2, el factor de creixement derivat de les plaquetes (PIGF) i HRG (*histidine-rich glycoprotein*) regulen la polarització dels fenotip M1 i M2 i el reclutament de *TAMs* cap al microambient tumoral. Els *TAMs* estan fortament regulats pels nuclear factor-Kappa b (NF-κB) en la inflamació associada a càncer (69). NF-κB promou la progressió tumoral propiciant la sobreexpressió de factors proangiogènics i citoquines protumorals com el VEGF i lligant de quimiocines 18 (CCL-18) que aboca a la angiogènesi tumoral, la migració i la immunosupressió (70) (71).

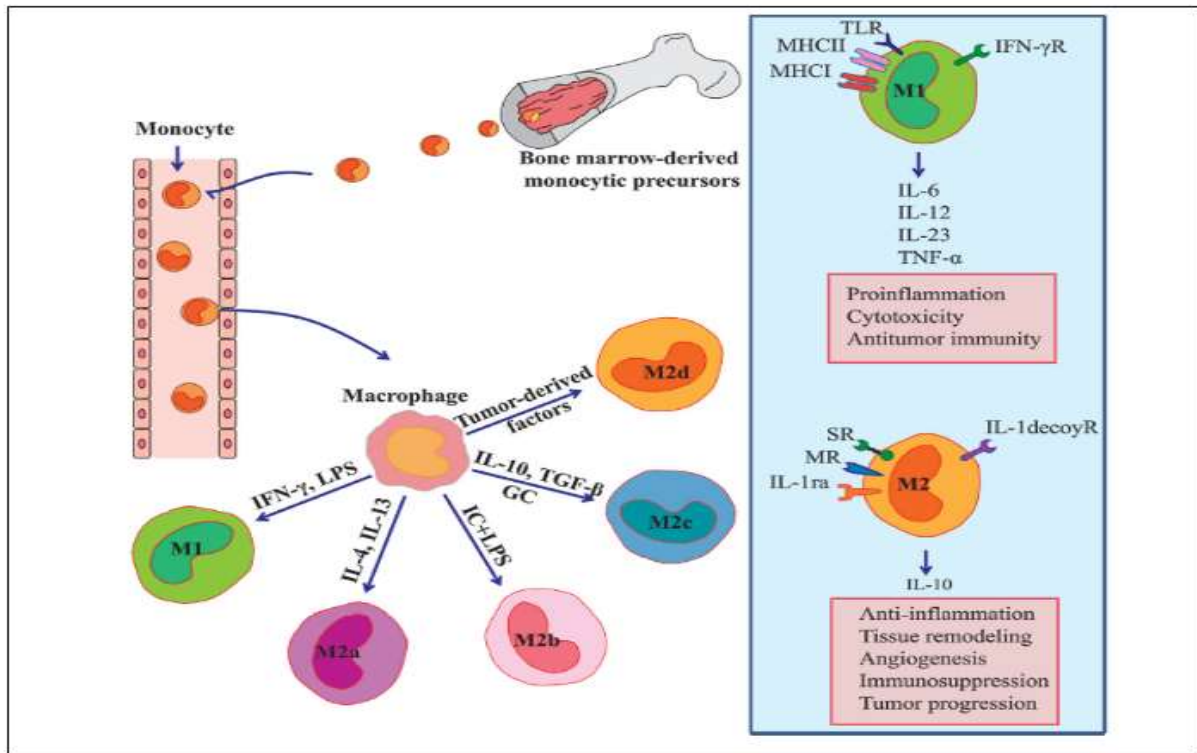


Figura 5 . Polarització i funció dels macròfags. Adaptat de: *Gordon S et al. Immunity. 2010;32(5):593–604.*

1.3.2.5 Heterogeneïtat molecular temporal i espacial

Tots els estudis mencionats prèviament, revelen una heterogeneïtat tumoral del CRC a nivell genòmic, transcriptòmic i a nivell immunològic. La heterogeneïtat tumoral ha estat avaluada també a nivell espacial i temporal.

S'ha determinat que hi ha una alta correlació entre oncogens *driver*, com *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*, entre tumor primari i metàstasis naïve de tractament (72)(73)(74).

Així mateix, s'ha publicat una alta correlació entre l'anàlisi de mutacions de RAS en teixit tumoral i DNA circulant en sang perifèrica (75).

Malgrat aquesta alta correlació inicial, a mesura que es sotmet el tumor a la pressió terapèutica dels agents anti-EGFR, apareixen mutacions de resistència que disminueixen la eficàcia del tractament (76)(77). Així mateix, les discordances mutacional entre àrees tumorals incrementen, com a resultat d'una selecció clonal.

A més de la heterogeneïtat espacial, també s'ha descrit canvis mutacional d'acord al factor temps. Quan la pressió terapèutica baixa, la fraccions clonal mutades baixen, i ens permet reconsiderar retractar amb agents anti-EGFR, concepte conegut com "rechallenge" terapèutic (78) .

Així la heterogeneïtat espacial i temporal són factors rellevant al hora d'indicar un possible tractament anti-EGFR.

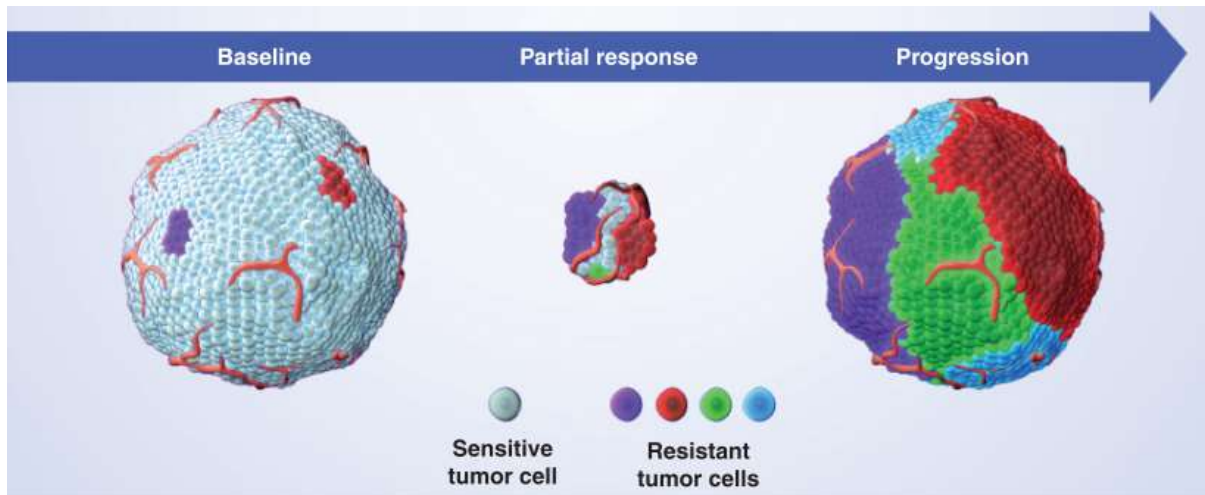


Figura 6. Heterogeneïtat molecular condiona resistència secundària a tractaments anti-EGFR. Adaptat de: *Misale S. et al. Nature 2012; 486 (7404):532-6.*

1.3.2.6 IGF i MMP-7

Malgrat els doblets FOLFIRI o FOLFOX més cetuximab o panitumumab són efectius en primera línia de tractament per pacients amb CCRm RAS-WT (79)(32)(28), no tots els pacients es beneficien plenament d'aquests tractament anti-EGFR. Per aquest motiu cal nous biomarcadors per guiar-ne el seu ús d'una forma més eficient.

El tipus 1 del receptor del *insulin-like growth factor* (IGF-1R) és una glicoproteïna transmembrana composta per dos subunitats extracel·lulars i dos subunitats citoplasmàtiques que actuen com a receptor tirosina quinasa(80)(81). IGF-1R està activat en el CCR, mitjançant processos claus com la proliferació cel·lular, la resistència a l'apoptosi i la regulació de la transició epiteli-mesènquima en les cèl·lules tumorals (EMT)(82)(83).

STAT3, necessari per la proliferació i supervivència inicial de la cèl·lula tumoral (84), està també constitutivament activat en el CCR mitjançant diversos receptors de creixement cel·lular (EGFR i IGF1R) a través de AKT/mTOR/RAC1 (85) o induït pels fibroblasts associats al càncer (CAFs) mitjançant IL-6-JAK1/2 (86)(87).

Matrix metalloproteinase 7 (MMP-7), també coneguda com matrilisina, és un membre de una família de endopeptidases dependents de zinc(88). MMP-7 és secretada per les cèl·lules tumorals i afavoreix la progressió, la invasió i la metàstasi tumoral. MMP-7 està sobreexpressat en tumor de pàncrees i es correlaciona amb una disminució de la SG (89). MMP-7 està alhora induït per STAT3 (90).

S'ha objectivat una retroalimentació en la activitat MMP-7 i IGF-1R. MMP-7 juga un paper clau en la biodisponibilitat de IGF-I i IGF-II mitjançant la degradació d'*Insulin-like growth factor-binding protein 3* (IGFBP-3) (91)(92)(93), que alhora mesurava tant en l'activació de NF- κ B dependent de IGF-1R (94), com en l'activació de NF- κ B independent de IGF-1R (95).

El terme NF- κ B fa referència a una família de factors de transcripció lligats a una seqüència comú del DNA coneguda com κ B site. Es considera que NF- κ B té un rol crític en la regulació de l'apoptosi donada la seva capacitat d'activar l'expressió de molts gens anti-apoptòtics (96).

Per altra banda, s'ha demostrat que el bloqueig de IGF-1R condiciona una supressió de la invasió cel·lular tumoral, mitjançant la regulació decreixent de MMP-7(97).

Recentment, s'ha reportat que IGF-II activa IGF-1R i STAT3 d'una forma més efectiva que IGF-I i a més induïx EMT (98).

Així doncs, IGF-1R i MMP-7 contribueixen per múltiples vies de senyalització tumoral a activar dos factors transcripcionals destacats STAT3 i NF- κ B.

El grup GEMCAD va publicar els resultats d'un estudi on es correlacionava, l'expressió concomitant de MMP-7 i l'activació de IGF-1R, amb mal pronòstic per pacient KRAS-WT pretractats amb quimioteràpia i tractats amb anti-EGFR(99), però fins al moment actual, aquest resultat restaven per ser validats.

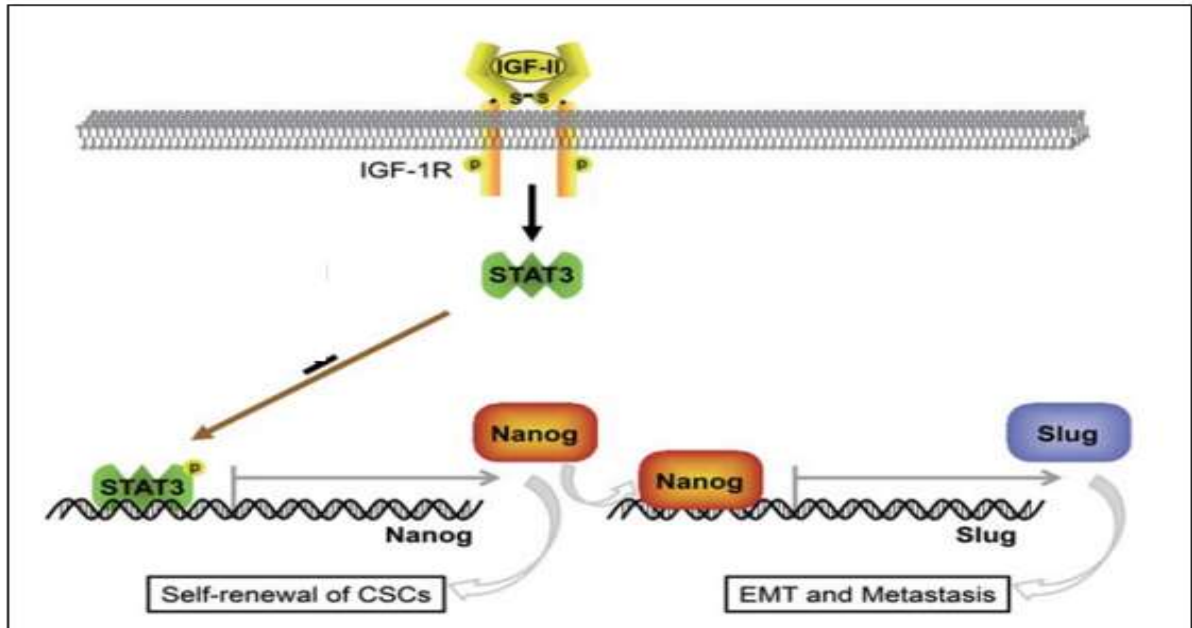


Figura 7. IGF-1R i STAT3 intervienen en processos claus com la proliferació cel·lular i la regulació de la transició epiteli-mesènquima en les cèl·lules tumorals. *Adaptat de: Yao C. et al. Stem Cells 2016; 34 (4): 820-31.*

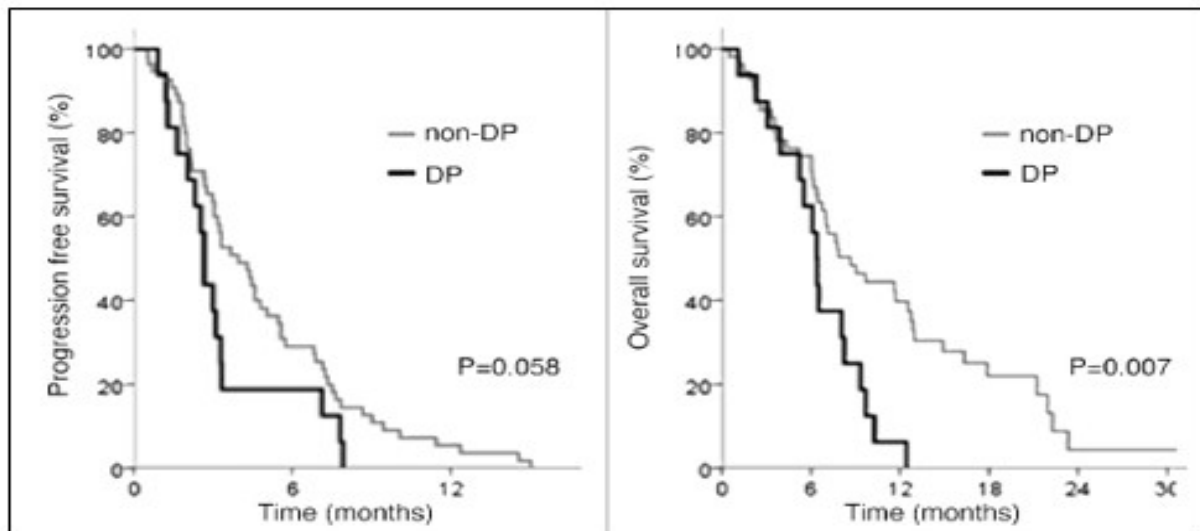


Figura 8 . Supervivència dels pacients amb CCRm KRAS-WT segons la coexpressió de p-IGF-1R i MMP-7 (DP). *Adaptat de: Hörndler C. et al. Cancer Biol Ther 2011; 11(2):177-83.*

1.3.2.7 Altres biomarcadors en CCRm

HER2: L'amplificació d' HER2 ha demostrat ser un mecanisme de resistència a tractaments anti-EGFR. Aproximacions terapèutiques per aquest tipus de pacients estan en desenvolupament (100).

PTEN: L'expressió de PTEN està associada amb SG en pacients amb càncer de còlon tractats amb anti-EGFRs. Els tumors que no expressen PTEN tenen un pitjor pronòstic. El seu rol com a factor predictiu de resposta és controvertit (101).

Fusions a ALK, ROS i NTKR: Els pacients que pateixen un tumor que alberga una fusió en ALK, ROS o NTKR presenten una supervivència inferior als pacients que no la presenten, presentant una mitjana de supervivència de 15 mesos versus 33 mesos respectivament. Els pacients pateixen un CCRm que presenta reordenaments a ALK, ROS i NTKR presenten resistència primària a tractaments anti-EGFR (102).

Fusions a RET: Els pacients que pateixen un CCRm que alberga una fusió a RET presenten una pitjor supervivència global que aquells que no l'alberguen, amb mitjanes de SG de 14 m i 38 mesos, respectivament (103).

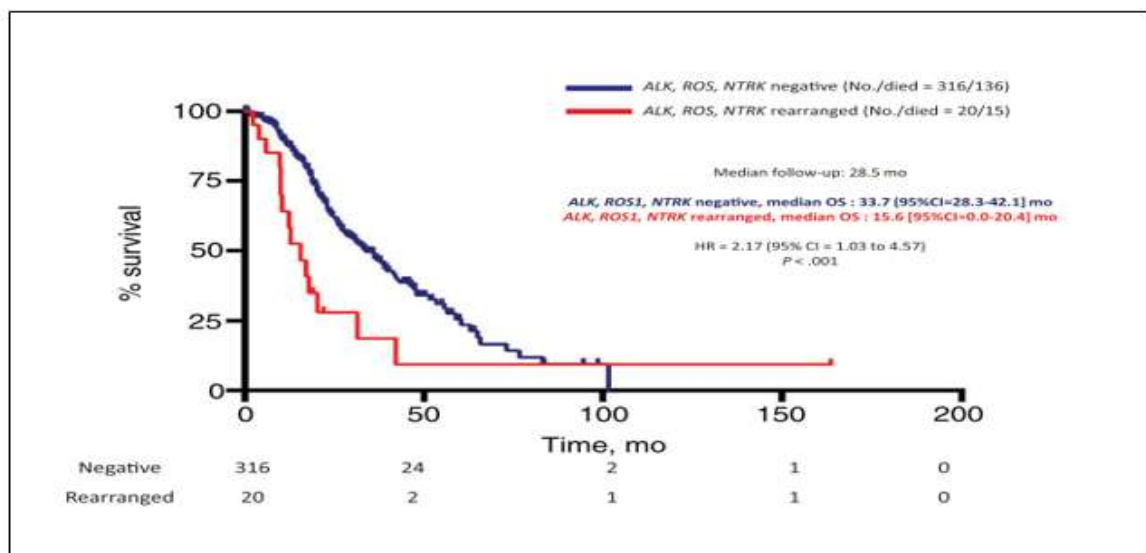


Figura 9. Supervivència dels pacients amb CCRm portadors d'un arrencament a ALK, ROS o NTKR. Adaptat de: *Pietrantonio F. et al. ALK, ROS1, and NTRK rearrangements in metastatic colorectal cancer. J Natl Cancer Inst. 2017;109 (12)*

2. HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi

- L'administració de cetuximab en règim bisetmanal pot ser igual d'eficaç que l'administració setmanal estàndard.
- La determinació de nous biomarcadors pot ajudar-nos a identificar els pacients diagnosticats de CCRm RAS-WT que més es beneficiaran d'un tractament anti-EGFR associat a quimioteràpia.

Objectiu 2.1

Determinar la eficàcia, mitjançant la taxa de respostes objectives, d'un règim de cetuximab bisetmanal associat a quimioteràpia (esquema FOLFOX) en el tractament de primera línia de CCRm KRAS natiu i demostrar, que és equivalent a la que la literatura científica atribueix a la pauta setmanal de cetuximab .

Així mateix avaluar la SLP i SG i la toxicitat d'un règim de cetuximab bisetmanal associat a quimioteràpia en primera línia de tractament.

Objectiu 2.2

Avaluar la coexpressió de p-IGF-1R i de MMP-7 com a biomarcador pronòstic i predictiu de resposta en pacients diagnosticats de CCRm RAS no mutats. Així mateix, identificar altres possibles nous biomarcadors predictius.

3. PUBLICACIONES

Primera publicació:

Biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 in the first-line treatment of wild-type KRAS metastatic colorectal cancer: final results of a phase II, open-label, clinical trial (OPTIMIX-ACROSS Study).

Fernandez-Plana J, Pericay C, Quintero G, Alonso V, Salud A, Mendez M, Salgado M, Saigi E, Cirera L; ACROSS Study Group.

BMC Cancer. 2014 Nov 22;14:865

Segona publicació:

Coexpression of p-IGF-1R and MMP-7 Modulates Panitumumab and Cetuximab Efficacy in RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Patients.

Alonso V, Escudero P, Fernández-Martos C, Salud A, Méndez M, Gallego J, Rodríguez JR, Martín-Richard M, Fernández-Plana J, Manzano H, Méndez JC, Zanui M, Falcó E, Gil-Raga M, Rojo F, Cuatrecasas M, Feliu J, García-Albéniz X, Maurel J.

Neoplasia. 2018 Jul;20(7):678-686

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 in the first-line treatment of wild-type *KRAS* metastatic colorectal cancer: final results of a phase II, open-label, clinical trial (OPTIMIX-ACROSS Study)

Julen Fernandez-Plana¹, Carlos Pericay², Guillermo Quintero³, Vicente Alonso⁴, Antonieta Salud⁵, Miguel Mendez⁶, Mercedes Salgado⁷, Eugeni Saigi⁸, Luis Cirera^{9*} on behalf of the ACROSS Study Group

Abstract

Background: This phase II study aims to evaluate the efficacy and safety of biweekly cetuximab in combination with oxaliplatin, leucovorin, and fluorouracil (FOLFOX-4) as first-line treatment of metastatic wild-type *KRAS* colorectal cancer.

Methods: Previously untreated patients with wild-type *KRAS* tumours received biweekly cetuximab (500 mg/m² on day 1) plus FOLFOX-4 (oxaliplatin 85 mg/m² on day 1, leucovorin 200 mg/m² on days 1 and 2, and fluorouracil as a 400 mg/m² bolus followed by a 22-hour 600 mg/m² infusion on day 1 and 2). Treatment was continued until disease progression, onset of unacceptable toxicities, metastases surgery, or discontinuation request. The primary endpoint was ORR.

Results: The intention-to-treat population included 99 patients with a median age of 64.1 years (range, 34-82). The ORR was 60.6% (95% CI, 50.3% to 70.3%). The median follow-up was 17.8 months; the median OS and PFS were 20.8 and 10.1 months, respectively. Metastases from colorectal cancer were surgically resected in 26 (26.3%) patients, with complete resection achieved in 18 (69.2%) patients. Median PFS and OS in patients undergoing metastatic resection were 12.6 and 29.5 months, respectively. The most common grade 3-4 toxicities were neutropenia (32.3%), acne-like rash (15.2%) and diarrhoea (11.1%).

Conclusions: The efficacy of the biweekly combination of cetuximab with FOLFOX-4 in patients with wild-type *KRAS* tumours supports the administration of cetuximab in a dosing regimen more convenient for patients and healthcare providers. The activity of the biweekly administration is similar to what has been reported for the weekly regimen. Reported toxicity was also consistent with the known toxicity profile of weekly cetuximab.

Trial registration: EudraCT Number 200800690916

Keywords: Cetuximab, FOLFOX-4, Metastatic colorectal cancer, First-line, Wild-type *KRAS*

Background

Colorectal cancer (CRC) is the second most common cancer and the second leading cause of cancer mortality in Europe [1]. The major cause of death in CRC are distant metastases [2]. It is expected that approximately 25% of patients diagnosed with CRC present with metastasis at initial diagnosis, whereas approximately 50% of

patients will develop metastatic CRC (mCRC) during the follow-up [3].

Significant advances in the treatment of mCRC have been made within the last years after decades of only modest progress with 5-fluorouracil (5-FU) monotherapy. Consequently, the combination of oxaliplatin or irinotecan with 5-FU have markedly improved treatment outcomes [4-6]. Furthermore, the addition of targeted therapies to conventional mCRC chemotherapy regimens has resulted in further improvement of efficacy results [7].

* Correspondence: lcirera@mutuaterrassa.es

⁹Hospital Universitario Mútua Terrassa, Plaça del Dr. Robert N°5, Terrassa, Barcelona 08221, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Cetuximab, a chimeric monoclonal antibody that targets the epidermal growth factor receptor (EGFR), is currently a component of the standard of care for mCRC [8]. Two randomised clinical trials demonstrated the clinical efficacy of adding weekly cetuximab to irinotecan- or oxaliplatin-based chemotherapy regimens in the first-line treatment of patients with wild-type *KRAS* mCRC [9-12].

The standard cetuximab dosing regimen, both as a monotherapy and in combination with chemotherapy, involves an initial intravenous infusion of 400 mg/m² with subsequent weekly doses of 250 mg/m². In contrast, a biweekly dosing schedule -every 14 days- would offer several advantages in terms of convenience and a more economical use of healthcare resources [13]. Moreover, these benefits would be enhanced in mCRC treatment regimens as standard first-line chemotherapy regimens approved for use in combination with cetuximab in wild-type *KRAS* mCRC, such as oxaliplatin, 5-FU infusion and leucovorin (FOLFOX) or irinotecan plus 5-FU infusion and leucovorin (FOLFIRI), are already administered in a biweekly basis.

The feasibility of a biweekly cetuximab administration schedule was demonstrated in a two-part phase I dose-escalation study [14]. This study demonstrated that cetuximab can be safely administered as single agent or in combination with FOLFIRI at doses between 400 and 700 mg/m² in a biweekly schedule, and 500 mg/m² was established as the recommended dose on the basis of pharmacokinetic exposure data [14]. Furthermore, data provided by several studies involving a combined regimen of cetuximab and irinotecan support the hypothesis that safety and efficacy of a biweekly schedule are similar to a weekly schedule [15-17].

Seeking to increase convenience for patients and healthcare providers, this phase II study was designed with the aim to evaluate the efficacy and safety of biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 in the first-line treatment of wild-type *KRAS* mCRC.

Methods

Study design

This multicentre, single-arm, open-label, phase II clinical trial was carried out in 15 Spanish centres (EudraCT Number: 2008-006909-16). The local authorities and ethic committees or institutional review boards at each participating centre approved the study protocol and its amendments. The study was conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki. All patients provided written informed consent.

Patients

Inclusion criteria were an age of 18 years of older, histologically confirmed colorectal carcinoma, wild-type *KRAS* tumours, first occurrence of metastatic disease, at

least one radiologically measurable lesion, a life expectancy of ≥ 12 weeks, an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status ≤ 1 , and adequate hematologic, hepatic and renal function. Patients with prior exposure to anti-EGFR therapy or chemotherapy for metastatic disease (with the exception of oxaliplatin if completed ≥ 6 months prior to inclusion) were not eligible for inclusion.

Study treatment

Patients received a biweekly intravenous (IV) infusion of cetuximab (500 mg/m² on day 1) followed by FOLFOX-4 (2-hour oxaliplatin 85 mg/m² infusion on day 1 in tandem with a 2-hour leucovorin 200 mg/m² infusion on day 1 and 2, and 5-FU as a 400 mg/m² bolus followed by a 22-hour 600 mg/m² infusion on day 1 and 2). Cetuximab was administered over 2 hours in the first cycle, over 1.5 hours in the second cycle and over 1 hour thereafter. Appropriate prophylactic medication was administered to prevent the occurrence of acute hypersensitivity reactions before each cetuximab administration.

Protocol dose modifications were permitted in the event of predefined toxic effects related to chemotherapy or cetuximab [17]. In the event of unacceptable toxicity due to 5-FU/leucovorin, oxaliplatin, or cetuximab, the agent responsible could be discontinued and the patient could continue with the other study medications. However, protocol modifications did not allow the maintenance of oxaliplatin as a monotherapy or in combination with cetuximab. Treatment was continued until disease progression, onset of unacceptable toxic effects, a patient/physician request to discontinue, or surgery for metastases.

Study assessments

Pre-treatment evaluations included the determination of *KRAS* mutation status. Mutation analysis was performed centrally at the Hospital Universitario Mútua Terrassa. Tumour DNA was extracted from formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissues. Mutant *KRAS* in exon 2 was detected using a validated *KRAS* mutation kit (DxS LTD., Manchester UK) that identifies seven somatic mutations located in codons 12 and 13 using allele-specific real-time PCR. The analysis was performed in an ABI Prism 7300 instrument (Applied Biosystems).

Computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI) was performed at baseline, every 8 weeks during the first 6 months of the study, and every 12 weeks thereafter until disease progression. Adverse events were collected throughout the study period. All adverse events recorded were graded according to the Common Toxicity Criteria of the National Cancer Institute (CTC-NCI) version 3.0.

Statistical analysis

The primary endpoint of the study was the objective response rate (ORR) defined according to the Modified Response Criteria in Solid Tumours (RECIST 1.1) [18]. Secondary endpoints included progression-free survival (PFS), duration of response, overall survival (OS) and toxicity profile of biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4. Patients who underwent surgery for metastases were censored at the date of surgery in the PFS analysis. Median PFS and OS following metastasectomy were also assessed for this group of patients. The cut-off date for collection of survival data was November 19th, 2012.

A sample size of 98 patients was calculated to detect a 95% confidence interval (CI) for the ORR of 50-70%, assuming an estimated rate of 60% according to previous studies and an anticipated 10% of patient loss to follow-up [9].

The intention to treat population (ITT) included all patients that received at least one dose of the combination chemotherapy (four drugs) and had at least one radiological assessment at 8 weeks. Safety analysis was conducted in the group of patients that received at least one dose of any of the four drugs (oxaliplatin, leucovorin, 5-FU or cetuximab).

Numerical variables were summarized as mean and standard deviation (SD). For categorical variables, absolute and relative frequencies were calculated. Time-to-event variables were analysed using the Kaplan-Meier method. Relative dose intensity (RDI) was calculated by dividing the dose intensity of the administered regimen by the dose intensity of the drug in the standard planned regimen. Data analysis was performed using the Statistical Analysis System version 9.2 (SAS 9.2).

Results

Patient disposition and baseline characteristics

From July 2009 until December 2011, 101 patients were included in the study. Two patients immediately withdrew their consent. The ITT population consisted of 99 patients. Safety analysis was carried out on the 99 patients who received at least one dose of any component of the study treatment. Demographic and clinical characteristics at baseline are shown in Table 1. Median age of the patients was 64.1 years (range: 34-82 years). Thirty-five patients presented with metastases limited to the liver. The median duration of follow-up was 17.8 months.

Efficacy

The best confirmed ORR was 60.6% (95% CI, 50.3% to 70.3%) (4 complete and 56 partial responses) (Table 2). Thirty patients (30.3%) had stable disease. Therefore, the disease control rate (DCR) was 90.9% (95% CI, 83.4% to 95.8%). In the 60 patients with a partial or complete

Table 1 Demographic and clinical data at baseline in the intention-to-treat population

Characteristic	N = 99
Male, n (%)	66 (66.7)
White/Caucasian ethnicity, n (%)	98 (99.0)
Median age, years (range)	64.1 (34-82)
ECOG status, n (%)	
0	51 (51.5)
1	48 (48.5)
Tumor status at diagnosis, n (%)	
T1	1 (1.0)
T2	6 (6.1)
T3	43 (43.4)
T4	25 (25.3)
Unknown	24 (24.2)
Node status at diagnosis, n (%)	
N0	22 (22.2)
N1	24 (24.2)
N2	25 (25.3)
Unknown	28 (28.3)
Metastases status at diagnosis, n (%)	
M0	21 (21.2)
M1	76 (76.8)
Unknown	2 (2.0)
Primary tumor site, n (%)	
Colon	59 (59.6)
Rectum	40 (40.4)
Metastases sites*, n (%)	
Liver	87 (87.9)
Lung	39 (39.4)
Lymph nodes	27 (27.3)
Other	17 (17.1)
Prior therapy, n (%)	
Adjuvant chemotherapy (FOLFOX)	9 (9.1%)
Neoadjuvant chemo-radiotherapy for rectal cancer	7 (7.1%)
Surgery	48 (48.5%)

Abbreviations: ECOG Eastern Cooperative Oncology Group, ITT Intention to treat, Q1-Q3 Interquartile range.

*A patient may have had metastases in more than one organ.

response, median time to onset of response was 1.9 months and median duration of response was 8.6 months.

Objective disease progression was observed in 68 patients. Median PFS was 10.1 months (Q1-Q3, 6.5-14.8) (Table 2; Figure 1). Time to progression, defined as time from the first treatment administration to the first objective disease progression in the 60 patients who had a complete/partial response, was 10.4 months (Q1-Q3, 6.8-17.9). At the time of data collection cut-off there were 57 deaths (57.6%). The median OS was 20.8 months (Q1-Q3, 11.6-32.8) (Table 2; Figure 2).

Table 2 Efficacy in the intention-to-treat population

Variable	ITT population N = 99
Response, n (%)	
Complete response	4 (4.0)
Partial response	56 (56.6)
Stable disease	30 (30.3)
Progressive disease	5 (5.1)
Not available	4 (4.0)
ORR, % (95% CI)	60.6 (50.3 to 70.3)
DCR, % (95% CI)	90.9 (83.4 to 95.8)
Progression-free survival	
Progression event, n (%)	68 (68.7)
Months of progression-free survival, median (Q1-Q3)	10.1 (6.5-14.8)
Overall survival	
Death, n (%)	57 (57.6)
Months of overall survival, median (Q1-Q3)	20.8 (11.6-32.8)

Abbreviations: CI confidence interval, DCR disease control rate, ITT intention-to-treat, ORR objective response rate, Q1-Q3 Interquartile range.

Twenty-six patients (26.3%) underwent surgery for liver metastases, with complete surgical resection (R0) observed in 18 (18.2%) patients. The median PFS and OS after surgical resection of metastases were 12.6 months and 29.5 months, respectively. Twenty-one patients (80.8%) who underwent surgery for metastases received adjuvant chemotherapy. Thirteen of the 21 patients continued with cetuximab-containing regimens after surgery.

Treatment exposure

The median duration of cetuximab treatment was 20.9 weeks (range: 1-148). The median cumulative dose of cetuximab was 4659.4 mg/m² and the median intensity of dose per cycle was 447.1 mg/m²; therefore the median cetuximab dose used in this study was similar to the recommended 500 mg/m² dose. Consequently, the median relative dose intensity was 89%, with a total of eighty-two patients (82.8%) receiving ≥80% relative dose intensity (RDI) of cetuximab. Thirty-nine patients (39.4%) had at least one cetuximab dose reduction. Delays in cetuximab dosing were mostly due to skin reactions. As for chemotherapy, the median duration of oxaliplatin and 5-FU treatment was 18.3 weeks (range: 1-46) and 22.9 weeks (range: 1-83), respectively. A RDI ≥80% was achieved in 58 patients (58.6%) for oxaliplatin and in 55 patients (55.6%) for 5-FU. Two or more lines of treatment were received by 62.6% of patients, whereas 5.1% of patients underwent surgery and did not receive additional lines of treatment post-surgery.

Safety

Adverse events (AEs) of any grade occurring in at least 10% of patients and grade 3 or 4 AEs occurring in at least 2% of patients are summarized in Table 3. Seventy-seven patients (77.8%) presented at least one grade 3 or 4 AE. The most common grade 3 or 4 AEs were neutropenia (32.3%) and diarrhoea (13.1%).

For grade 3 or 4 special adverse events, 15.2% patients presented with acne-like rash, 6.1% presented with nail toxicity (this special event category included the preferred terms nail toxicity and paronychia) and no patient presented with infusion-related reactions (this special event category included the preferred terms “infusion related reaction” and “pyrexia”). Hypomagnesemia was reported in only one patient (grade 4). Cetuximab was discontinued in 33 patients (33.3%), oxaliplatin was discontinued in 41 patients (41.4%) and 5-FU was discontinued in 25 patients (25.3%) due to adverse events.

Disease progression was the primary cause of death (91.2% of deaths). Two patients died due to an unrelated AE and one patient died due to a related AE. This patient presented with pulmonary fibrosis that was considered related to oxaliplatin and/or cetuximab.

Discussion

This study showed that the efficacy of biweekly-administered cetuximab in combination with FOLFOX-4 is similar to what has been reported for the standard weekly cetuximab dosing regimen as first-line treatment of wild-type *KRAS* mCRC. The ORR obtained in the present study (61%) was similar to the figure reported in a previous phase II study with a weekly administration of cetuximab in combination with FOLFOX-4 [10]. A similar ORR was also obtained (62%) in the biweekly cetuximab arm of the recently published randomised study performed by the Central European Co-operative Oncology Group (CECOG) [19]. In the weekly cetuximab arm of that phase II study, a lower ORR was obtained (53%). The CECOG trial was not powered to establish non-inferiority of biweekly administration versus weekly administration of cetuximab, so further studies would be needed to confirm their findings.

The median PFS (10.1 months) observed is also in line with the 8.3 months and 9.5 months reported in previous studies with weekly cetuximab combined with FOLFOX-4, and very similar to the figure obtained in the biweekly arm of the CECOG trial (9.2 months) [10,19]. It was also slightly longer than the range of 8.4-9.1 months reported for standard weekly cetuximab in combination with other oxaliplatin-based chemotherapy regimens in patients with wild-type *KRAS* mCRC [7,20]. Although the short median follow-up of our study does not permit us to draw

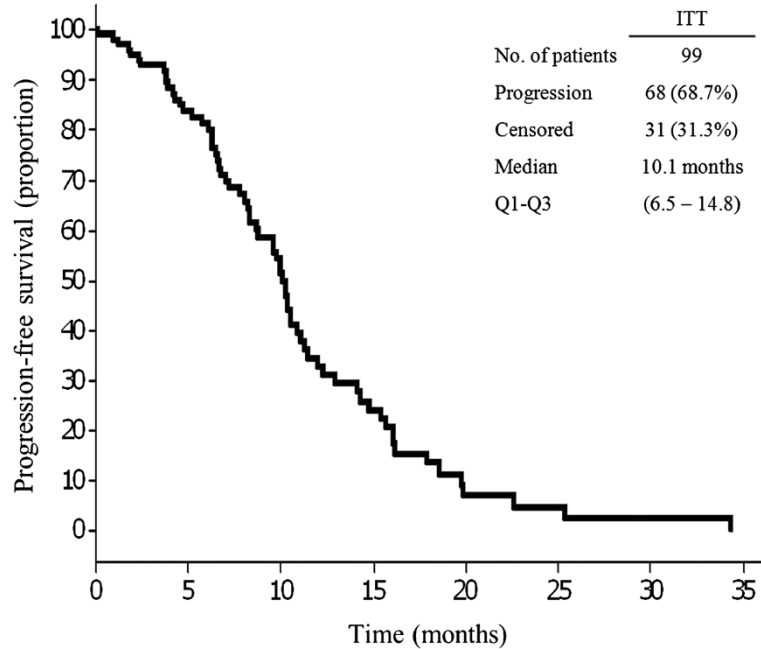


Figure 1 Kaplan-Meier plot for progression-free survival in the intention to treat (ITT) population.

definitive conclusions regarding OS, the median time obtained (20.8 months) was slightly shorter but consistent with the median OS reported for standard weekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 and in the biweekly arm of the CECOG trial [10,19].

Complete surgical resection of colorectal liver metastases is potentially curative and provides clear survival benefits in patients with disease confined to the liver. Within this context, 35 out of 99 patients in our study presented with only liver metastases. 26.3% of patients

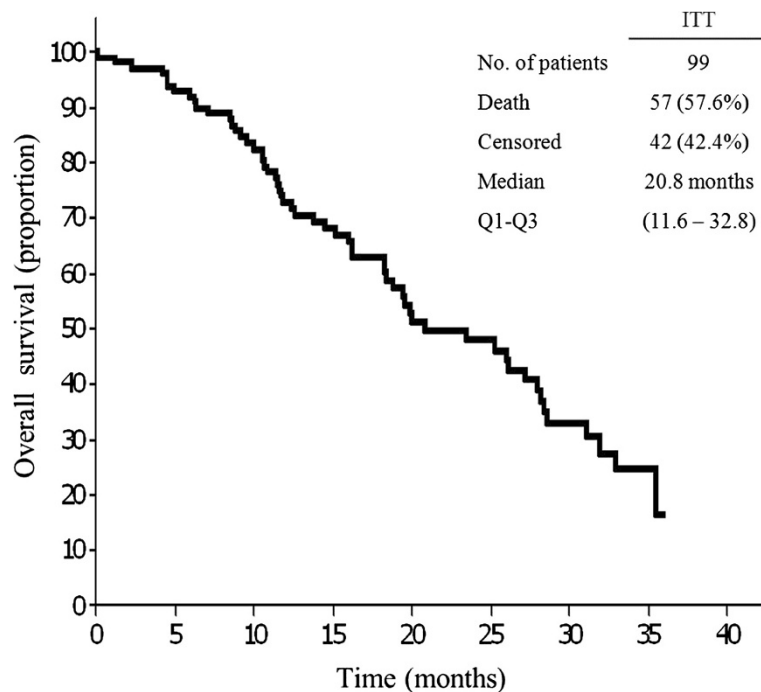


Figure 2 Kaplan-Meier plot for overall survival in the intention to treat (ITT) population.

Table 3 Adverse events

Adverse event	Any grade	Grade 3 or 4
Any adverse event*	97 (98.0%)	77 (77.8%)
Blood and lymphatic system disorders		
Anaemia	11 (11.1%)	2 (2.0%)
Febrile neutropenia	6 (6.1%)	5 (5.1%)
Leukopenia	15 (15.2%)	1 (1.0%)
Neutropenia	49 (49.5%)	32 (32.3%)
Thrombocytopenia	23 (23.2%)	2 (2.0%)
Gastrointestinal disorders		
Abdominal pain	30 (30.3%)	2 (2.0%)
Diarrhoea	58 (58.6%)	13 (13.1%)
Intestinal obstruction	8 (8.1%)	8 (8.1%)
Nausea	28 (28.3%)	2 (2.0%)
Stomatitis	52 (52.5%)	5 (5.1%)
Vomiting	21 (21.2%)	1 (1.0%)
General disorders and administration site disorders		
Asthenia	65 (65.7%)	8 (8.1%)
Immune system disorders		
Drug hypersensitivity	9 (9.1%)	3 (3.0%)
Metabolism and nutrition disorders		
Anorexia	25 (25.3%)	2 (2.0%)
Musculoskeletal and connective tissue disorders		
Back pain	8 (8.1%)	2 (2.0%)
Nervous system disorders		
Dysaesthesia	11 (11.1%)	2 (2.0%)
Dysgeusia	12 (12.1%)	1 (1.0%)
Peripheral neuropathy	11 (11.1%)	2 (2.0%)
Neurotoxicity	22 (22.2%)	2 (2.0%)
Paraesthesia	40 (40.4%)	6 (6.1%)
Psychiatric disorders		
Anxiety	3 (3.0%)	2 (2.0%)
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders		
Pulmonary embolism	3 (3.0%)	2 (2.0%)
Skin and subcutaneous tissue disorders		
Dry skin	23 (23.2%)	4 (4.0%)
Vascular disorders		
Deep vein thrombosis	3 (3.0%)	2 (2.0%)
Special adverse event categories		
Acne-like Rash	91 (91.9%)	15 (15.2%)
Infusion related reaction ^a	14 (14.1%)	0 (0.0%)
Nail toxicity ^b	28 (28.3%)	6 (6.1%)

*Listed are adverse events of any grade occurring in at least 10% of patients and adverse events of grade 3 or 4 occurring in at least 2% of patient.

^aThis special event category included the preferred terms infusion related reaction and pyrexia.

^bThis special event category included the preferred terms nail toxicity and paronychia.

underwent surgery for colorectal liver metastases and a R0 resection rate was achieved in 18% of patients. This R0 resection rate is higher than that reported in the cetuximab weekly arm (5%) and in the cetuximab every second week arm (10%) of the CECOG trial [10,19].

However, in contrast to the CECOG trial metastases resectability was not a selection criterion in the present study. Therefore, while some patients were initially candidates for surgery, other patients presented with unresectable metastases. In our study, surgical resected

patients presented a median OS considerably longer than unresected patients. These results confirm the improved prognosis of patients undergoing surgery for colorectal liver metastases.

The toxicity profile of the biweekly administration of cetuximab is also consistent with the known safety profile of the standard weekly cetuximab dosing regimen. The incidence rate of grade 3 or 4 AEs was in line with that reported previously for cetuximab in combination with FOLFOX-4 [10,18,19]. Therefore, a higher dose of cetuximab administered on an every-2-weeks basis is not associated with a greater incidence of grade 3 or 4 adverse events. As expected, the most common grade 3 or 4 adverse events were neutropenia and acne-like rash. The high proportion of patients that required at least one cetuximab dose reduction are attributable to dose adjustments planned in case of dose delay of chemotherapy due to haematological toxicity.

Conclusions

In conclusion, despite the known limitations of a non-randomised single arm study, our results support the administration of cetuximab in a dosing regimen more convenient for both patients and healthcare providers. The option to synchronise the administration of cetuximab and chemotherapy would reduce the number of administration visits. Such reductions would improve patient's quality of life and simplify treatment administration for healthcare workers. Additionally, the reduction in the number of visits would reduce the costs of treatment of patients with mCRC without reducing the efficacy previously observed for cetuximab combined with FOLFOX-4.

Abbreviations

5-FU: 5-fluorouracil; AE: Adverse Event; CEGOG: Central european cooperative oncology group; CI: Confidence interval; CRC: Colorectal cancer; CT: Computed tomography; CTC-NCI: Common toxicity criteria of the national cancer institute; DCR: Disease control rate; ECOG PS: Eastern cooperative oncology group performance status; EGFR: Epidermal growth factor receptor; FOLFIRI: Irinotecan plus infusional 5-fluorouracil and leucovorin; FOLFOX: Oxaliplatin plus infusional 5-fluorouracil and leucovorin; ITT: Intention to treat population; IV: Intravenous; mCRC: Metastatic colorectal cancer; MRI: Magnetic resonance imaging; ORR: Objective response rate; OS: Overall survival; RDI: Relative dose intensity; RECIST: Response criteria in solid tumours; SD: Standard deviation.

Competing interests

JFP has participated as a main local investigator in clinical trials across cooperative groups and also as national coordinator of clinical trials across cooperative groups. MS is member of regional and national advisory boards for Galicia and Spain, respectively; has received consulting and educational honoraria from several pharmaceutical companies including Merck, Roche, Amgen and Sanofi; and has participated as main local investigator in clinical trials from Merck, Roche, Amgen, Sanofi, Bayer and Lilly. All other authors declare no conflicts of interests as a consequence of this paper.

Authors' contributions

JFP and LC conceived the study and its design, coordinated the study group, participated in the quality control of the data, and contributed to the manuscript writing. CP, GQ, VA, AS, MM, MS and ES participated in clinical

data collection and reviewed the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank the participating patients and their families. We also like to thank the ACROSS Group investigators: L. Cirera (Hospital Universitario Mútua Terrassa); J. Fernández-Plana (Hospital Universitario Mútua Terrassa); F. Losa (Hospital General de l'Hospitalet); C. Pericay (Corporación Sanitaria Parc Taulí); A. Salud (Hospital Arnau de Vilanova); M. Gay (Hospital General de Vic); V. Alonso (Hospital Miguel Servet); M. Méndez (Hospital de Móstoles); J. Alfaro (Consorci Hospitalari de Terrassa); P. Vicente (Hospital General de Granollers); G. Quintero (Hospital Xeral-Calde); M. Salgado (Complejo Hospitalario Universitario de Ourense); M. Jorge (Complejo Hospitalario Universitario Xeral-Cies); C. Grande (Hospital de Meixoeiro); J. de la Cámara (Hospital Arquitecto Marcide); E. Falcó (Hospital Son Llàtzer); and E. Saigí (Corporación Sanitaria Parc Taulí). Clinical monitoring: C. Muñoz and M. Nicolau (TFS Develop, Spain). Data management: M. Pircher (TFS Develop, Spain). Statistical analysis: X. Núñez (TFS Develop, Spain). Medical writing: Marta Muñoz-Tudurí, Beatriz del Val, and Emili González-Pérez (TFS Develop, Spain).

Role of the funding source

The monitoring, statistical analysis and medical writing of this study was supported by Merck KGaA, Darmstadt Germany. Merck KGaA reviewed the manuscript; however, the views and opinions described in the publication do not necessarily reflect those of Merck KGaA who had no involvement in the decision to submit this manuscript for publication.

Author details

¹Hospital Universitario Mútua Terrassa, Terrassa, Spain. ²Corporación Sanitaria Parc Taulí, Sabadell, Spain. ³Hospital Universitario Lucus Augusti (HULA), Lugo, Spain. ⁴Hospital Miguel Servet, Zaragoza, Spain. ⁵Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain. ⁶Hospital de Móstoles, Móstoles, Spain. ⁷Complejo Hospitalario Universitario de Ourense, Ourense, Spain. ⁸Corporación Sanitaria Parc Taulí, Sabadell, Spain. ⁹Hospital Universitario Mútua Terrassa, Plaça del Dr. Robert N°5, Terrassa, Barcelona 08221, Spain.

Received: 13 May 2014 Accepted: 11 November 2014

Published: 22 November 2014

References

1. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F: **Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012.** *Eur J Cancer* 2013, **49**(6):1374–1403.
2. Penna C, Nordlinger B: **Colorectal metastasis (liver and lung).** *Surg Clin North Am* 2002, **82**(5):1075–1090. x-xi.
3. Van Cutsem E, Nordlinger B, Cervantes A, Group EGW: **Advanced colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for treatment.** *Ann Oncol* 2010, **21**(Suppl 5):v93–v97.
4. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C, Cortes-Funes H, Cervantes A, Freyer G, Papamichael D, Le Bail N, Louvet C, Hendler D, De Braud F, Wilson C, Morvan F, Bonetti A: **Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer.** *J Clin Oncol* 2000, **18**(16):2938–2947.
5. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P: **Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial.** *Lancet* 2000, **355**(9209):1041–1047.
6. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirota N, Elfring GL, Miller LL: **Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer: Irinotecan Study Group.** *N Engl J Med* 2000, **343**(13):905–914.
7. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH, Idziaszczyk S, Harris R, Fisher D, Kenny SL, Kay E, Madi A, Jasani B, James MD, Bridgewater J, Kennedy MJ, Claes B, Lambrechts D, Kaplan R, Cheadle JP, MRC COIN Trial Investigators: **Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial.** *Lancet* 2011, **377**(9783):2103–2114.
8. **NCCN clinical practice guidelines in oncology: colon cancer.** In http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.

9. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zobel A, Koralewski P: **Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(5):663–671.
10. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zobel A, Celik I, Schlichting M, Koralewski P: **Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study.** *Ann Oncol* 2011, **22**(7):1535–1546.
11. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G: **Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer.** *N Engl J Med* 2009, **360**(14):1408–1417.
12. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, Shchepotin I, Maurel J, Cunningham D, Tejpar S: **Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status.** *J Clin Oncol* 2011, **29**(15):2011–2019.
13. Tabernero J, Pfeiffer P, Cervantes A: **Administration of cetuximab every 2 weeks in the treatment of metastatic colorectal cancer: an effective, more convenient alternative to weekly administration?** *Oncol* 2008, **13**(2):113–119.
14. Tabernero J, Ciardiello F, Rivera F, Rodriguez-Braun E, Ramos FJ, Martinelli E, Vega-Villegas ME, Rosello S, Liebscher S, Kisker O, Macarulla T, Baselga J, Cervantes A: **Cetuximab administered once every second week to patients with metastatic colorectal cancer: a two-part pharmacokinetic/pharmacodynamic phase I dose-escalation study.** *Ann Oncol* 2010, **21**(7):1537–1545.
15. Martin-Martorell P, Rosello S, Rodriguez-Braun E, Chirivella I, Bosch A, Cervantes A: **Biweekly cetuximab and irinotecan in advanced colorectal cancer patients progressing after at least one previous line of chemotherapy: results of a phase II single institution trial.** *Br J Cancer* 2008, **99**(3):455–458.
16. Pfeiffer P, Nielsen D, Bjerregaard J, Qvortrup C, Yilmaz M, Jensen B: **Biweekly cetuximab and irinotecan as third-line therapy in patients with advanced colorectal cancer after failure to irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil.** *Ann Oncol* 2008, **19**(6):1141–1145.
17. Roca JM, Alonso V, Pericay C, Escudero P, Salud A, Losa F, Lopez LJ, Guasch I, Mendez M, Quintero-Aldana G, Grande C, Vicente P, Arrivi A, Martin C, Moreno I, Garcia P, Antón I, Constenla M, Yubero A, Cirera L, ACROSS Cooperative Group: **Cetuximab given every 2 weeks plus irinotecan is an active and safe option for previously treated patients with metastatic colorectal cancer.** *Chemotherapy* 2010, **56**(2):142–146.
18. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J: **New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1).** *Eur J Cancer* 2009, **45**(2):228–247.
19. Brodowicz T, Ciuleanu TE, Radosavljevic D, Shacham-Shmueli E, Vrbancic D, Plate S, Mrcsic-Krmpotic Z, Dank M, Purkalne G, Messinger D, Zielinski CC: **FOLFOX4 plus cetuximab administered weekly or every second week in the first-line treatment of patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a randomized phase II CECOG study.** *Ann Oncol* 2013, **24**(7):1769–1777.
20. Ocvirk J, Brodowicz T, Wrba F, Ciuleanu TE, Kurteva G, Beslija S, Koza I, Papai Z, Messinger D, Yilmaz U, Faluhelyi Z, Yalcin S, Papamichael D, Wenczl M, Mrcsic-Krmpotic Z, Shacham-Shmueli E, Vrbancic D, Esser R, Scheithauer W, Zielinski CC: **Cetuximab plus FOLFOX6 or FOLFIRI in metastatic colorectal cancer: CECOG trial.** *World J Gastroenterol* 2010, **16**(25):3133–3143.

doi:10.1186/1471-2407-14-865

Cite this article as: Fernandez-Plana *et al.*: Biweekly cetuximab in combination with FOLFOX-4 in the first-line treatment of wild-type KRAS metastatic colorectal cancer: final results of a phase II, open-label, clinical trial (OPTIMIX-ACROSS Study). *BMC Cancer* 2014 **14**:865.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Coexpression of p-IGF-1R and MMP-7 Modulates Panitumumab and Cetuximab Efficacy in RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer Patients

Vicente Alonso^{*}, Pilar Escudero[†], Carlos Fernández-Martos[‡], Antonia Salud[§], Miguel Méndez[¶], Javier Gallego[#], Jose-R. Rodriguez^{**}, Marta Martín-Richard^{††}, Julen Fernández-Plana^{‡‡}, Hermini Manzano^{§§}, José-Carlos Méndez^{¶¶}, Monserrat Zanui^{##}, Esther Falcó^{***}, Mireia Gil-Raga^{†††}, Federico Rojo^{‡‡‡}, Miriam Cuatrecasas^{§§§}, Jaime Feliu^{¶¶¶}, Xabier García-Albéniz^{###,1} and Joan Maurel^{****,1}

^{*}Medical Oncology Service, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain; [†]Medical Oncology Service, Hospital Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain; [‡]Medical Oncology Department, Fundación Instituto Valenciano de Oncología, Valencia, Spain; [§]Medical Oncology Service, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; [¶]Medical Oncology Service, Hospital de Móstoles, Móstoles, Spain; [#]Medical Oncology Service, Hospital General Universitario of Elche, Elche, Spain; ^{**}Medical Oncology Service, Hospital Infanta Cristina, Badajoz, Spain; ^{††}Medical Oncology Service, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; ^{‡‡}Medical Oncology Service, Hospital Mutua de Terrasa, Spain; ^{§§}Medical Oncology Service, Hospital Son Espases, Palma, Spain; ^{¶¶}Medical Oncology Service, Centro Oncologico de Galicia, A Coruña, Spain; ^{##}Medical Oncology Service, Hospital de Mataró, Mataró, Spain; ^{***}Medical Oncology Service, Hospital Son Llàtzer, Palma, Spain; ^{†††}Medical Oncology Service, Hospital de Sagunto, Sagunto, Spain; ^{‡‡‡}Pathology Service, Hospital Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain; ^{§§§}Department of Pathology, Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona, Spain; ^{¶¶¶}Medical Oncology Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; ^{###}Department of Oncology, Harvard School of Public Health, Boston (MA), United States of America; ^{****}Medical Oncology Department, Hospital Clinic of Barcelona, Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors Group, IDIBAPS, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

INTRODUCTION: The coexpression of pIGF-1R and MMP-7 (double-positive phenotype, DP) correlates with poor overall survival (OS) in *KRAS* wild-type (WT) (exon 2) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with irinotecan-cetuximab in second/third line. **METHODS:** We analyzed two prospective biomarker design trials of newly diagnosed *RAS*-WT mCRC patients treated with panitumumab-FOLFOX6 (PULSE trial; NCT01288339) or

cetuximab plus either FOLFOX6/FOLFIRI (POSIBA trial; NCT01276379). The main exposure was DP phenotype (DP/non-DP), as assessed by two independent pathologists. DP cases were defined by immunohistochemistry as >70% expression of moderate or strong intensity for both MMP-7 and pIGF-1R. Primary endpoint: progression-free survival (PFS); secondary endpoints: OS and response rate. PFS and OS were adjusted by baseline characteristics using multivariate Cox models. **RESULTS:** We analyzed 67 patients (30 non-DP, 37 DP) in the PULSE trial and 181 patients in the POSIBA trial (158 non-DP, 23 DP). Response rates and PFS were similar between groups in both studies. DP was associated with prolonged OS in PULSE (adjusted HR: 0.23; 95%CI: 0.11-0.52; $P=.0004$) and with shorter OS in POSIBA (adjusted HR: 1.67; 95%CI: 0.96-2.90; $P=.07$). **CONCLUSION:** A differential effect of anti-EGFRs on survival by DP phenotype was observed. Panitumumab might be more beneficial for *RAS*-WT mCRC patients with DP phenotype, whereas cetuximab might improve OS in non-DP.

Neoplasia (2018) 20, 678–686

Introduction

The doublets of FOLFIRI or FOLFOX plus cetuximab or panitumumab are effective as first-line therapies for patients with *RAS* wild-type (WT) metastatic colorectal cancer (mCRC) [1–3]. However, certain patients do not fully benefit from these EGFR-targeted antibodies, requiring additional biomarkers to tailor their use.

The type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-1R) is a transmembrane glycoprotein composed of two extracellular and two cytoplasmic subunits acting as a receptor-tyrosine kinase [4–7]. IGF-1R is activated in colorectal cancer, mediating key processes such as cell proliferation, apoptosis resistance, and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [8]. The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is also constitutively activated in colorectal cancer [9] by growth factor receptors (EGFR and IGF-1R) through AKT/mTORC/RAC1 [10], or induced by cancer-associated fibroblasts (CAFs) through IL-6-JAK1/2 [11,12]. Regardless of this intrinsic or extrinsic activation, STAT3 signaling enforces matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression [13].

Recently, IGF-II was shown to activate IGF-1R and STAT3 more effectively than IGF-I and to induce SLUG transcriptional activity and EMT in CRC [14]. Feedback activation has been also demonstrated between MMP-7 and IGF-1R. MMP-7 plays a crucial role in IGF-I and IGF-II bioavailability through the insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3) degradation [15–17], which in turn mediates IGF-1R-dependent [18] but also IGF-1R-independent NF- κ B activation [19]. The blockade of IGF-1R is also involved in the suppression of cancer cell invasion through downregulation of MMP-7 [20]. Therefore, IGF-1R and MMP-7 contribute by multiple pathways to activate the two more critical transcription factors: STAT3 and NF- κ B.

Our group has previously shown that coexpression of p-IGF-1R and MMP-7 (double positivity phenotype, DP) correlates with poor prognosis in *KRAS* WT (exon 2) patients treated with irinotecan plus cetuximab as second-/third-line therapy [21]. To validate these findings, we designed two prospective, translational trials in *K-RAS* (exon-2) WT mCRC patients treated with panitumumab plus FOLFOX6 (PULSE trial) or cetuximab plus either FOLFOX6 or FOLFIRI (POSIBA trial) as a first line of therapy, with the shared objective of evaluating the prognostic role of DP in this patient population.

Methods

Trials Design

Patients were eligible in both studies if they were ≥ 18 years old; had histologically confirmed *KRAS* WT (exon 2) mCRC with ≥ 1 radiologically measurable lesion; an Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) of 0-1; and adequate hepatic, renal, and bone marrow functions. Patients were ineligible if they were pregnant, had a history of treatment with anti-EGFR or chemotherapy (with the exception of adjuvant therapy), or had undergone surgery of metastatic disease.

The PULSE (GEMCAD 09-03, clinicaltrials.gov id: NCT01288339) and POSIBA (GEMCAD 10-02, clinicaltrials.gov id: NCT01276379) were both single-arm prospective biomarker design trials. Patients were recruited into the PULSE trial from November 2010 to April 2013 in 24 Spanish centers and treated with FOLFOX6 plus panitumumab (6 mg/kg). Patients were recruited into the POSIBA trial from July 2011 to May 2015 in 28 Spanish centers and treated with FOLFOX6 or FOLFIRI (at investigator's choice) plus biweekly cetuximab (500 mg/m²). In both trials, cytotoxic drugs were administered for 6 months, followed by anti-EGFR monotherapy until progressive disease or unacceptable toxicity.

Patients were classified as DP if their tumor presented moderate or strong intensity (++/+++), and >70% expression for both MMP-7 and pIGF-1R by immunohistochemistry staining (see below). The primary endpoint for both studies was progression-free survival (PFS), defined as time from enrollment to disease progression, death, or end of follow-up, whichever came first. Secondary objectives included response rate, toxicity profile, and overall survival (OS), defined as time from enrollment to death or end of follow-up. Disease status was evaluated with abdominopelvic CT scan every 2 months in the PULSE trial and every 3 months in the POSIBA trial until progressive disease. Patients without a second CT evaluation were not assessable for response rate. Patients who underwent liver resection were not censored at the time of surgical resection and were followed until progressive disease.

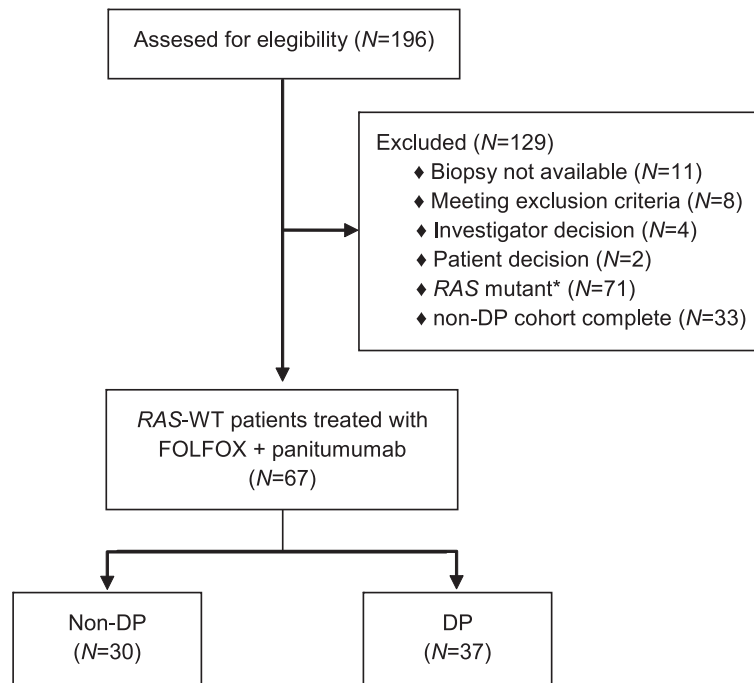
The safety population comprised all patients who received at least one dose of study treatment. Adverse events (AEs) were recorded according to the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria version 2.0. The PULSE and POSIBA trials

were approved by local institutional review boards and ethics committees in accordance with national and international guidelines; all patients signed a written informed consent before study entry.

RAS and BRAF Mutational Analysis

Mutational analysis of genomic DNA of *KRAS* (exon 2) was performed by direct sequencing. In the PULSE trial, it was evaluated centrally at the Hospital Clínic (Barcelona, Spain), although analysis

A) PULSE study



B) POSIBA study

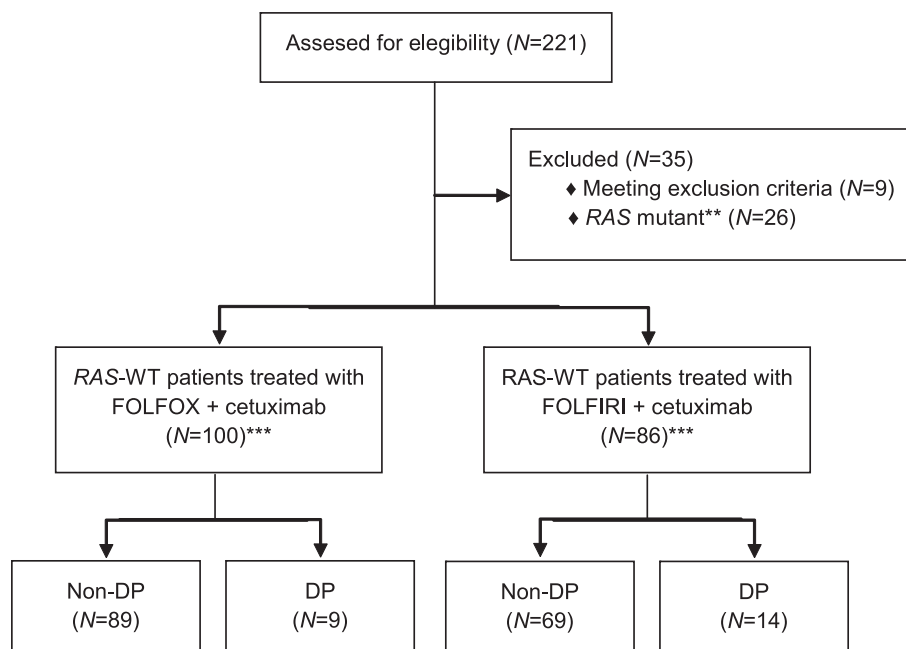


Figure 1. Patients' disposition in the (A) PULSE and (B) POSIBA trials. *RAS mutant includes mutations in *KRAS* (exon 2) (N=60), and *KRAS* mutations (exons 3 and 4) and *NRAS* mutations (exons 2, 3, and 4) (N=11). **RAS mutant includes mutations in *KRAS* (exons 3 and 4) and *NRAS* mutations (exons 2, 3, and 4). ***The expression of p-IGF-1R and MMP-7 was not evaluable in five patients: two treated with FOLFOX + cetuximab and three with FOLFIRI + cetuximab

at the referring Center was also allowed. In the POSIBA trial, it was evaluated at the referring center. Extended *RAS* mutational analysis (including *KRAS/NRAS* exons 2, 3 and 4) started on 10/2013 in the PULSE trial and on 10/2015 in the POSIBA trial after protocol amendments. The *BRAF* V600E mutation (exon 15) was genotyped by allelic discrimination in genomic DNA using TaqMan technology (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Immunohistochemistry

We used hematoxylin and eosin staining to evaluate the presence and classification of the tumor specimens. Consecutive 2- to 3- μ m-thick sections were used for IHC. Removal of paraffin and heat incubation in citrate (pH=6.0) were performed to achieve antigen retrieval. The primary p-IGF-1R antibody (anti-pY1316, provided by Dr. Rubini) was used at 1:100 dilution. MMP-7 (R&D System, Minneapolis, MN) was used at 1:1500 dilution. The expression was cytoplasmatic. Detection was performed using the Dako EnVision K4011 (Agilent, Santa Clara, CA). In the PULSE trial, IHC evaluation was done centrally in Hospital Clínic (Barcelona, Spain), and results were given before patient inclusion to balance the number

of patients in both arms. In the POSIBA trial, IHC evaluation was performed after patients' inclusion. Thus, DP distribution represents that of the source population.

Statistical Analysis

In the PULSE trial, a recruitment of 78 patients was planned to have an 80% power to detect a difference in median PFS of 6 months between DP and non-DP patients (assuming a bilateral α error of 0.05 and the occurrence of 56 events). A screening of 270 patients was planned because only 25% of patients were expected to be DP and 40% to be *KRAS* mutant. Recruitment continued until both exposure groups (DP and non-DP) were filled in a 1:1 ratio. In the POSIBA trial, a recruitment of 170 *RAS* WT patients (after amendment of all *RAS* WT analysis) was planned to detect, with a 80% of power and a bilateral alpha of 5%, a 20% difference in 12-month PFS. We assumed that the 12-month PFS of the non-DP patients would be of 60%, and a 25% of DP patients in the source population.

Kaplan-Meier estimates were used to plot unadjusted survival curves. Cox proportional hazards regression was used to perform

Table 1. Baseline Characteristics by Trial and Double Positivity

	POSIBA		P Value	PULSE		P Value
	Non-DP (N=158)	DP (N=23)		Non-DP (N=30)	DP (N=37)	
<i>BRAF</i> mutated, N (%)	16 (10)	4 (17)	.29	2 (7)	5 (14)	.45
Female, N (%)	46 (29)	7 (30)	.99	12 (40)	10 (27)	.30
Age, mean (SD)	62 (11)	67 (7)	.031	63 (8)	64 (8)	.61
Primary tumor location, N (%)			.98			.47
Ascending colon	28 (18)	4 (17)		2 (7)	3 (8)	
Transverse colon	13 (8)	1 (4)		1 (3)	5 (14)	
Descending colon	12 (8)	2 (9)		3 (10)	3 (8)	
Sigma	65 (41)	11 (48)		15 (50)	12 (32)	
Rectum	40 (25)	5 (22)		9 (30)	14 (38)	
Stage (at diagnosis), N (%)			.77			.88
I	1 (1)	0		0	0	
II	12 (8)	1 (4)		1 (3)	2 (5)	
III	32 (20)	3 (13)		5 (17)	4 (11)	
IV	113 (72)	19 (83)		24 (80)	31 (84)	
Surgery of primary tumor, N (%)	89 (56)	12 (52)	.82	20 (67)	24 (65)	.99
ECOG-PS, N (%)			.012			.61
0	110 (70)	9 (39)		16 (53)	22 (59)	
1	45 (28)	14 (61)		13 (43)	15 (41)	
2	3 (2)	0		1 (3)	0	
Number of metastatic organs, N (%)			.30			.33
0	0	0		0	2 (5)	
1	79 (50)	15 (65)		13 (43)	16 (43)	
>2	79 (50)	8 (35)		17 (57)	19 (51)	
Liver metastasis, N (%)			.87			.93
No liver metastasis	35 (22)	5 (22)		7 (23)	10 (27)	
<=3, <=5 cm	28 (18)	5 (22)		3 (10)	4 (11)	
>3 or >5 cm	95 (60)	13 (57)		20 (67)	23 (62)	
Node metastasis, N (%)	50 (32)	7 (30)	.99	9 (30)	12 (32)	.99
Lung metastasis, N (%)	48 (30)	2 (9)	.043	11 (37)	14 (38)	.99
Peritoneal metastasis, N (%)	23 (15)	4 (17)	.75	9 (30.0)	8 (22)	.57
Administered therapy, N (%)			.18			
FOLFOX+cetuximab	89 (56)	9 (39)		NA	NA	
FOLFIRI+cetuximab	69 (44)	14 (61)		NA	NA	
FOLFOX+panitumumab	NA	NA		30 (100)	37 (100)	
Leucocytes, mean (SD)	8.3 (3.3)	8.9 (3.7)	.39	9.8 (7.1)	8.2 (2.5)	.23
Hemoglobin, mean (SD)	13.8 (9.2)	11.9 (1.6)	.023	12.9 (1.7)	12.4 (1.5)	.15
Platelets, mean (SD)	282 (104)	298 (140)	.60	298 (144)	296 (120)	.96
ALP, mean (SD)	148 (122)	179 (177)	.44	166 (208)	219 (237)	.34
LDH, mean (SD)	465 (457)	632 (1246)	.56	683 (814)	446 (415)	.16
CEA, mean (SD)	267 (732)	708 (1772)	.26	502 (1212)	838 (3609)	.61

ALP, alkaline phosphatase; CEA, carcinoembryonic antigen; DP, double positivity; ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; LDH, lactate dehydrogenase; SD, standard deviation.

Fisher's exact test

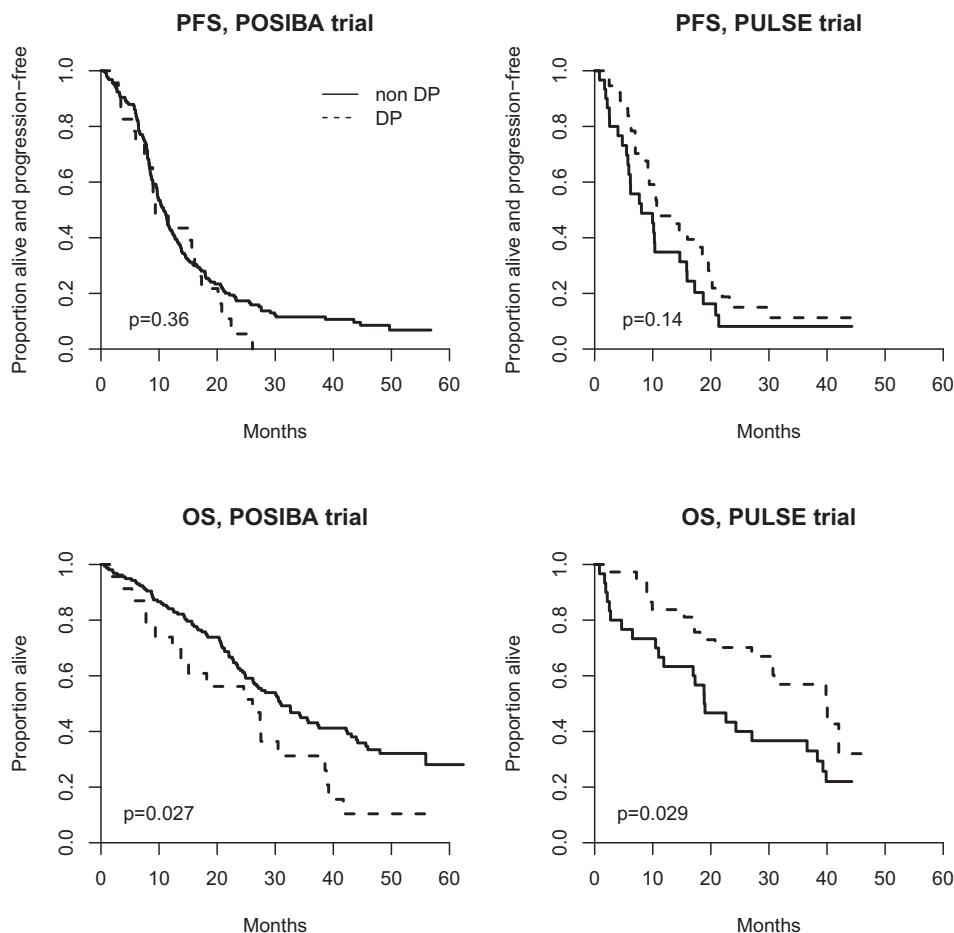


Figure 2. Kaplan-Meier estimates of progression-free survival and overall survival according to DP status in the (A) PULSE and (B) POSIBA trial.

adjusted analyses for PFS and OS. Multivariate analysis was built deciding *a priori* the variables to adjust for: age, sex, p-IGF-1R/MMP-7 expression, primary tumor location, stage at diagnosis, surgery of primary tumor, number of involved organs, type of involved organ, liver-only extension, ECOG-PS, *BRAF* mutational status, administered therapy, and baseline levels of: leucocytes,

hemoglobin, platelets, lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (ALP), and carcinoembryonic antigen (CEA). Additionally, we performed sensitivity analyses with automated stepwise selection of variables (*P* value for variable entry into the model=.2, *P* value to stay in the model=.1) and by entering in the model those variables with a *P*<.1 in the univariate analysis. All the *P* values are

Table 2. Progression-Free Survival; Cox Regression Analysis

	POSIBA				PULSE			
	Univariate		Multivariate		Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	<i>P</i> Value	HR (95% CI)	<i>P</i> Value	HR (95% CI)	<i>P</i> Value	HR (95% CI)	<i>P</i> Value
DP	1.24 (0.79-1.94)	.36	1.39 (0.84-2.31)	.20	0.68 (0.40-1.14)	.14	0.33 (0.17-0.66)	.0017
ECOG-PS >0	2.02 (1.46-2.79)	<.0001	1.77 (1.24-2.54)	.0017	1.19 (0.70-2.02)	.52	1.33 (0.71-2.509)	.37
Age >65 years	1.18 (0.87-1.61)	.30	0.99 (0.69-1.42)	.97	1.43 (1.85-2.41)	.18	1.65 (0.79-3.43)	.18
<i>BRAF</i> mutated	2.33 (1.44-3.79)	.0006	2.09 (1.16-3.77)	.014	1.77 (0.75-4.17)	.19	1.77 (0.34-9.03)	.49
Surgery of primary tumor	1.62 (1.19-2.22)	.0024	1.60 (1.12-2.28)	.0099	0.56 (0.32-0.98)	.041	0.45 (0.22-0.94)	.034
Left-sided primary tumor	1.02 (0.74-1.39)	.92	0.92 (0.63-1.32)	.64	0.65 (0.33-1.30)	.22	0.41 (0.14-1.18)	.10
CEA (logarithmic term)	0.55 (0.39-0.78)	.0008	0.55 (0.37-0.81)	.0029	1.10 (0.97-1.25)	.13	1.04 (0.88-1.23)	.65
LDH (logarithmic term)	1.03 (0.96-1.10)	.40	1.03 (0.94-1.14)	.49	1.14 (0.78-1.67)	.49	1.65 (0.98-2.77)	.058
Liver metastasis	1.04 (0.82-1.31)	.74	1.02 (0.78-1.33)	.88				
0					Ref.			
<=3, <=5 cm	Ref.				0.99 (0.38-2.63)	.99	0.83 (0.24-2.84)	.76
>3 or >5 cm	0.63 (0.38-1.03)	.065	0.95 (0.54-1.69)	.87	1.11 (0.59-2.09)	.74	0.86 (0.35-2.01)	.74

CEA, carcinoembryonic antigen; CI, confidence interval; DP, double positivity; ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; HR, hazard ratio; LDH, lactate dehydrogenase; WT, wild-type.

Table 3. Sensitivity Analyses for Progression-Free Survival; Cox Regression Analysis

	POSIBA				PULSE			
	Multivariate S1		Multivariate S2		Multivariate S1		Multivariate S2	
	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value
DP	1.13 (0.71-1.81)	.61	1.13 (0.71-1.81)	.61	0.59 (0.35-1.02)	.058	0.35 (0.18-0.67)	.0015
ECOG-PS >0	1.75 (1.25-2.45)	.0011	1.75 (1.25-2.45)	.0011				
Age >65 years								
<i>BRAF</i> mutated	2.04 (1.24-3.34)	.0048	2.04 (1.24-3.34)	.0048				
Surgery of primary tumor	1.43 (1.04-1.97)	.029	1.43 (1.04-1.97)	.029	0.50 (0.28-0.88)	.017	0.45 (0.22-0.90)	.023
Left-sided primary tumor							0.35 (0.15-0.83)	.0165
CEA (logarithmic term)	0.58 (0.41-0.84)	.0032	0.58 (0.41-0.84)	.0032				
LDH (logarithmic term)							1.12 (0.99-2.33)	.057
Liver metastasis								
0								
<=3, <=5 cm								
>3 or >5 cm								

CEA, carcinoembryonic antigen; CI, confidence interval; DP, double positivity; ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; HR, hazard ratio; LDH, lactate dehydrogenase; WT, wild-type.

S1: multivariate model including only the variables with a P value <.1 in the univariate analysis.

S2: multivariate model adjusted via automated stepwise selection of variables (see text for details).

Table 4. Overall Survival; Cox Regression Analysis

	POSIBA				PULSE			
	Univariate		Multivariate		Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value
DP	1.73 (1.06-2.85)	.029	1.67 (0.96-2.90)	.070	0.54 (0.29-0.99)	.048	0.23 (0.11-0.52)	.0004
ECOG-PS >0	2.95 (2.03-4.29)	<.0001	2.48 (1.63-3.77)	<.0001	2.20 (1.18-4.08)	.013	2.93 (1.30-6.62)	.0097
Age >65 years	1.24 (0.85-1.79)	.26	1.00 (0.65-1.53)	.99	1.37 (0.74-2.53)	.32	1.48 (0.64-3.47)	.36
<i>BRAF</i> mutated	3.38 (2.00-5.72)	<.0001	2.32 (1.23-4.36)	.0092	4.23 (1.17-10.48)	.0018	10.3 (1.08-58.3)	.0086
Surgery of primary tumor	1.60 (1.10-2.32)	.013	1.36 (0.90-2.07)	.15	0.35 (0.19-0.66)	.0010	0.20 (0.08-0.48)	.0003
Left-sided primary tumor	1.06 (0.73-1.53)	.78	0.82 (0.51-1.31)	.40	0.60 (0.28-1.31)	.20	0.47 (0.15-1.48)	.20
CEA (logarithmic term)	0.42 (0.28-0.62)	<.0001	0.47 (0.30-0.74)	.0012	1.09 (0.94-1.25)	.25	0.91 (0.75-1.10)	.32
LDH (logarithmic term)	0.99 (0.91-1.08)	.80	1.00 (0.89-1.12)	.97	1.30 (0.85-2.01)	.23	1.40 (0.79-2.43)	.25
Liver metastasis	0.95 (0.72-1.26)	.73	0.92 (0.66-1.27)	.61				
0	Ref.				Ref.			
<=3, <=5 cm	0.68 (0.39-1.21)	.19	1.08 (0.57-2.06)	.81	1.72 (0.54-5.46)	.35	2.49 (0.56-11.09)	.23
>3 or >5 cm	0.70 (0.45-1.10)	.12	0.95 (0.51-1.79)	.88	1.73 (0.75-3.95)	.20	1.64 (0.49-5.50)	.42

CEA, carcinoembryonic antigen; CI, confidence interval; DP, double positivity; ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; HR, hazard ratio; LDH, lactate dehydrogenase; WT, wild-type.

Table 5. Sensitivity Analysis for Overall Survival; Cox Regression Analysis

	POSIBA				PULSE			
	Multivariate S1		Multivariate S2		Multivariate S1		Multivariate S2	
	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value	HR (95% CI)	P Value
DP	1.60 (0.96-2.67)	.072	1.72 (1.01-2.94)	.048	0.36 (0.19-0.69)	.0019	0.36 (0.19-0.69)	.0019
ECOG-PS >0	2.31 (1.56-3.43)	<.0001	2.49 (1.65-3.76)	<.0001	2.16 (1.10-4.25)	.026	2.16 (1.10-4.25)	.026
Age >65 years								
<i>BRAF</i> mutated	2.40 (1.38-4.17)	.0019	2.57 (1.47-4.49)	.0010	3.52 (1.32-9.35)	.012	3.52 (1.32-9.35)	.012
Surgery of primary tumor	1.29 (0.88-1.90)	.19			0.33 (0.17-0.64)	.0013	0.33 (0.17-0.64)	.0013
Left-sided primary tumor								
CEA (logarithmic term)	0.50 (0.33-0.75)	.0008	0.50 (0.32-0.76)	.0014				
LDH (logarithmic term)								
Liver metastasis								
0								
<=3, <=5 cm								
>3 or >5 cm								

CEA, carcinoembryonic antigen; CI, confidence interval; DP, double positivity; ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; HR, hazard ratio; LDH, lactate dehydrogenase; WT, wild-type.

S1: multivariate model including only the variables with a P value <.1 in the univariate analysis.

S2: multivariate model adjusted via automated stepwise selection of variables (see text for details).

Table 6. Response Rates by Trial and Double Positivity

	POSIBA			PULSE		
	Non-DP	DP	<i>P</i> Value	Non-DP	DP	<i>P</i> Value
Complete response	13 (8.2)	4 (17.4)	.17	3 (10.0)	2 (5.4)	.28
Partial response	101 (63.9)	11 (47.8)		19 (63.3)	25 (67.6)	
Stable disease	27 (17.1)	4 (17.4)		1 (3.3)	7 (18.9)	
Progressive disease	9 (5.7)	3 (13.0)		1 (3.3)	3 (8.1)	
Not evaluable	8 (5.1)	1 (4.4)		6 (20.0)	0	

DP, double positivity.
Fisher's exact test.

two-sided. Analyses were implemented using SAS V9.3 (SAS Institute, Cary, NC).

Results

A total of 67 (PULSE) and 181 (POSIBA) *RAS*-WT mCRC patients were included in the analysis (Figure 1). In the PULSE trial, 30 patients were non-DP and 37 patients were DP, whereas in the POSIBA trial, 158 patients were non-DP and 23 patients were DP. Patients were followed for a median of 27 months in the PULSE trial and for a median of 26 months in the POSIBA trial. DP patients in the POSIBA trial were less likely to have PS 0 and lung metastasis and also have lower levels of hemoglobin than non-DP patients. There were no relevant differences in the baseline characteristics of both groups in the PULSE trial (Table 1).

Efficacy According to DP Status

Median PFS (95% CI) was 11.2 months (9.2-18.5) for DP patients and 8.0 months (5.5-14.7) for non-DP patients in the PULSE trial ($P=.14$). Median PFS (95% CI) was 9.4 months (7.5-16.1) for DP patients and 10.8 months (9.5-12.2) for non-DP patients in the POSIBA trial ($P=.36$, Figure 2). Adjusted HR for PFS was 0.33 (0.17-0.66) in the PULSE trial and 1.39 (0.84-2.31) in the POSIBA trial (Table 2). Sensitivity analysis did not change results substantially (Table 3).

Median OS (95% CI) was 39.8 months (27.0-not estimable) for DP patients and 18.9 months (11.0-36.6) for non-DP patients in the PULSE trial ($P=.029$). Median OS (95% CI) was 26.1 months (12.3-38.6) for DP patients and 31.0 months (26.2-37.5) for non-DP patients in the POSIBA trial ($P=.027$, Figure 2). DP was associated with prolonged OS in the PULSE trial (adjusted HR: 0.23; 95% CI:

Table 7. Summary of Adverse Events in the PULSE Trial

	Any Grade No. of Patients (%)	Grade 3	Grade 4
Any event	78 (100)	55 (70.5)	10 (12.8)
Skin toxicity	71 (91.0)	24 (30.8)	0 (0)
Fatigue	55 (70.5)	12 (15.4)	1 (1.3)
Mucositis	52 (66.7)	6 (7.7)	0 (0.0)
Diarrhea	48 (61.5)	11 (14.1)	1 (1.3)
Neutropenia	44 (56.4)	26 (33.3)	2 (2.6)
Nauseas/vomiting	30 (38.5)	1 (1.3)	0 (0)
Thrombocytopenia	28 (35.9)	3 (3.9)	0 (0)
Hypomagnesemia	23 (29.5)	1 (1.3)	2 (2.6)
Neurologic toxicity	16 (20.5)	1 (1.3)	0 (0)
Anaemia	10 (12.8)	1 (1.3)	0 (0)
Paronychia	8 (10.3)	1 (1.3)	0 (0)
Infusion-related reaction	7 (9.0)	0 (0)	0 (0)
Hypokalemia	6 (7.7)	2 (2.6)	1 (1.3)
Febrile neutropenia	3 (3.9)	1 (1.3)	2 (2.6)

0.11-0.52; $P=.0004$) and with shorter OS in the POSIBA trial (adjusted HR: 1.67; 95% CI: 0.96-2.90; $P=.07$) (Table 4). Sensitivity analysis did not change results substantially (Table 5).

Response rates were similar according to DP in both the PULSE and POSIBA studies (Table 6). There were no major differences in terms of secondary resection of metastases and second-line therapies between PULSE and POSIBA trials and between DP and non-DP groups (data not shown).

Safety

The most common AEs (any grade) in the PULSE trial were skin toxicity (91%), fatigue (70%), and mucositis (67%) (Table 7). The most common AE (any grade) in the POSIBA trial were skin toxicity (76%), fatigue (55%), and diarrhea (50%) (Suppl. Table 1). Three patients died within 30 days of receiving protocol therapy: one patient in PULSE and two patients in POSIBA trial.

Discussion

We present data from two prospective, multicenter, translational, first-line trials in WT *RAS* mCRC patients. Our findings suggests that there is a survival benefit in the subset of DP patients treated with upfront FOLFOX plus panitumumab schedule and in non-DP patients treated upfront with FOLFOX/FOLFIRI plus cetuximab therapy. This benefit was observed after adjustment for baseline characteristics, secondary surgery of metastases, and second-line therapies.

Recent evidence shows that *RAS* WT patients with right-side primary tumors have shorter overall survival than those with left-sided tumors and that left-sided tumors obtain greater benefit when treated with chemotherapy and anti-EGFR combinations [22], although the biological reasons remain obscure. Consensus molecular subtype classification (CMS) associates the stromal-enriched mesenchymal phenotype (CMS4) [23] with poor prognosis [24,25] and cetuximab resistance [26]. Despite data from Medema group suggesting that *BRAF* mutant CRC patients are enriched with CDX2-/ZEB1+ CMS4 phenotype [27], *BRAF* mutant mCRC patients are equally distributed between right- and left-sided, and 75% of right-sided patients treated with anti-EGFR present double WT genotype. Therefore, other CMS4 markers besides CDX2-/ZEB1+ and DP, such as CCL2 or CXCL12 (for both *BRAF* mutant and double WT genotypes), might be probably overrepresented in right-sided tumors. We could not rule out that, for currently unknown reasons, CMS4 phenotype might be induced by chemotherapy and anti-EGFR treatment [28] differently in both sides, influencing acquired resistance [29,30].

We designed the PULSE trial based on retrospective data [21] hypothesizing that DP patients treated with panitumumab-based therapy could have also poor prognosis. It's important to emphasize that the PULSE was designed in a different population (naïve) and with a different anti-EGFR exposure (panitumumab instead of cetuximab). Despite confirming our previous findings with FOLFIRI/FOLFOX plus cetuximab in the POSIBA trial, we could not confirm these results in the PULSE trial with panitumumab. In addition to inhibition of EGFR mitogenic pathways (MAPK, PI3K/AKT, and JAK/STAT), monoclonal antibodies (cetuximab and panitumumab) possess the potential advantage of recruiting immune effector mechanisms such as antibody-dependent cell mediated-cytotoxicity (ADCC) [31], although cetuximab was shown to be more effective in this mechanism than panitumumab. Although potentially cetuximab can activate ADCC also through NK cells,

these cells are almost absent in colorectal cancer, and cetuximab in M2 macrophages activates anti-inflammatory IL-10 cytokines and proangiogenic factors (IL-8 and VEGF) [24]. Taking into account that: a) DP status could increase over time after chemotherapy treatment [29] and b) IGF-1R and STAT3 activation induces T-cell tolerance through TGF- β , IL-10 and VEGF [32] and also increases chemokines and cytokines such as IL-6 and CCL2 towards macrophage M2 polarization [33], we speculate that cetuximab but not panitumumab could be influenced by DP-CMS4 acquired resistance through immune evasion.

Our study has several limitations. Firstly, PFS was evaluated differentially (every 2 months in the PULSE trial and every 3 months in the POSIBA trial). Secondly, the percentage of DP positivity widely differs in both studies (33% in PULSE and 13% in POSIBA). Thirdly, the explanation on a potential biological reason for the contradictory results of our biomarker should be clarified.

We believe that our findings would have potential clinical importance and definitively justify a prospectively enriched-biomarker design in *RAS* WT patients with an experimental arm based on the biomarker (DP-treated with panitumumab and non-DP-treated with cetuximab) and a control arm (without this information) treated at investigator criteria (cetuximab or panitumumab).

Conclusions

Our study suggest that panitumumab is more beneficial for those *RAS* WT mCRC patients with a DP phenotype and cetuximab for those without it in terms of overall survival after adjusting for all clinical and biological confounder variables in the multivariate analysis.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.05.004>.

Declaration of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Authorship

J. M. and X. G.-A. conceived and designed the study; J. M., X. G.-A., and V. A. analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript; X. G.-A. performed the statistical analysis. All authors acquired the study data, revised the manuscript, and approved its final version.

Acknowledgements

Study collaborators:

PULSE trial: Carlos Pericay, Jorge Aparicio, Alberto Carmona-Bayonas, Enrique Casado, Maria Jose Safont, Ruth Vera, Monica Jorge, Pedro Salinas, Antonio Arrivi, Javier Rodriguez

POSIBA trial: Uriel Bohn, Veronica Calderero, Ana Isabel Ferrer, Joaquin Perez de Oleguer, Rosa Dueñas, Ana Leon, Pilar Vicente, Angeles Rodriguez-Jaraiz, Isabel Antón, Olvia Serra, Isabel Busquier, Adelaida Lacasta, Carlos Garcia-Girón

The authors would like to thank Juan Martin (TFS Develop) for providing editing support (funded by Amgen S.A. [Spain]).

Funding / Role of the Funding Source

Amgen supported the PULSE trial and Merck supported the POSIBA trial. Neither Amgen nor Merck had any role in the present analysis design, analysis and interpretation of data, writing the report, and the decision to submit the report for publication.

References

- [1] Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, et al (2013). Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* **369**, 1023–1034.
- [2] Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, Beier F, Stroh C, Rougier P, and van Krieken JH, et al (2015). Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol* **33**, 692–700.
- [3] Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, Schrag D, Greene C, O'Neil BH, and Atkins JN, et al (2017). Effect of first-line chemotherapy combined with cetuximab or bevacizumab on overall survival in patients with KRAS wild-type advanced or metastatic colorectal cancer: a randomized clinical trial. *JAMA* **317**, 2392–2401.
- [4] Baserga R (2009). Customizing the targeting of IGF-1 receptor. *Future Oncol* **5**, 43–50.
- [5] Pollak M (2008). Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* **8**, 915–928.
- [6] Girmita L, Girmita A, Brodin B, Xie Y, Nilsson G, Dricu A, Lundeberg J, Wejde J, Bartolazzi A, and Wiman KG, et al (2000). Increased expression of insulin-like growth factor I receptor in malignant cells expressing aberrant p53: functional impact. *Cancer Res* **60**, 5278–5283.
- [7] Werner H and LeRoith D (1996). The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res* **68**, 183–223.
- [8] Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G II, Samuel S, Kim MP, Lim SJ, and Ellis LM (2009). Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res* **69**, 1951–1957.
- [9] Lin L, Liu A, Peng Z, Lin HJ, Li PK, Li C, and Lin J (2011). STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer-initiating cells. *Cancer Res* **71**, 7226–7237.
- [10] Simon AR, Vikis HG, Stewart S, Fanburg BL, Cochran BH, and Guan KL (2000). Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. *Science* **290**, 144–147.
- [11] Rokavec M, Öner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, Kaller M, Horst D, Ziegler PK, and Schwitalla S, et al (2014). IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest* **124**, 1853–1867.
- [12] Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Klöppel G, Yoshimura A, Reindl W, Sipos B, and Akira S, et al (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* **19**, 456–469.
- [13] Fukuda A, Wang SC, Morris JP IV, Foliás AE, Liou A, Kim GE, Akira S, Boucher KM, Firpo MA, and Mulvihill SJ, et al (2011). Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer Cell* **19**, 441–455.
- [14] Yao C, Su L, Shan J, Zhu C, Liu L, Liu C, Xu Y, Yang Z, Bian X, and Shao J, et al (2016). IGF/STAT3/NANOG/Slug signaling axis simultaneously controls epithelial-mesenchymal transition and stemness maintenance in colorectal cancer. *Stem Cells* **34**, 820–831.
- [15] Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Kodama K, Goya M, Chiba T, and Ochiai A (2004). Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res* **64**, 665–671.
- [16] Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, Ishii G, Hasebe T, Chiba T, Asaka M, and Ochiai A (2005). Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 1011–1016.
- [17] Hemers E, Duval C, McCaig C, Handley M, Dockray GJ, and Varro A (2005). Insulin-like growth factor binding protein-5 is a target of matrix metalloproteinase-7: implications for epithelial-mesenchymal signaling. *Cancer Res* **65**, 7363–7369.
- [18] Miyamoto S, Nakamura M, Yano K, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Sangai T, Maeda H, Shi-Chuang Z, and Chiba T, et al (2007). Matrix metalloproteinase-7 triggers the matricrine action of insulin-like growth factor-II via proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 2 in the extracellular matrix. *Cancer Sci* **98**, 685–691.
- [19] Williams AC, Smartt H, H-Zadeh AM, Macfarlane M, Paraskeva C, and Collard TJ (2007). Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates

- TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF-kappaB. *Cell Death Differ* **14**, 137–145.
- [20] Adachi Y, Li R, Yamamoto H, Min Y, Piao W, Wang Y, Imsumran A, Li H, Arimura Y, and Lee CT, et al (2009). Insulin-like growth factor-I receptor blockade reduces the invasiveness of gastrointestinal cancers via blocking production of matrilysin. *Carcinogenesis* **30**, 1305–1313.
- [21] Hörndler C, Gallego R, García-Albeniz X, Alonso-Espinaco V, Alonso V, Escudero P, Jimeno M, Ortego J, Codony-Servat J, and Fernández-Martos C, et al (2011). Co-expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and phosphorylated insulin growth factor receptor I (pIGF-1R) correlates with poor prognosis in patients with wild-type KRAS treated with cetuximab or panitumumab: a GEMCAD study. *Cancer Biol Ther* **11**, 177–183.
- [22] Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, Heinemann V, Van Cutsem E, Pignon JP, and Tabernero J, et al (2017). Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol* **28**, 1713–1729. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx175>.
- [23] Becht E, de Reyniès A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, Selves J, Sautès-Fridman C, Laurent-Puig P, and Fridman WH (2016). Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin Cancer Res* **22**, 4057–4066.
- [24] Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, and Angelino P, et al (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* **21**, 1350–1356.
- [25] De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, de Rooij LP, de Jong JH, de Boer OJ, van Leersum R, and Bijlsma MF, et al (2013). Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med* **19**, 614–618.
- [26] Trinh A, Trumpi K, De Sousa E Melo F, Wang X, de Jong JH, Fessler E, Kuppen PJ, Reimers MS, Swets M, and Koopman M, et al (2017). Practical and robust identification of molecular subtypes in colorectal cancer by immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* **23**, 387–398.
- [27] Fessler E, Drost J, van Hooff SR, Linnekamp JF, Wang X, Jansen M, De Sousa E Melo F, Prasetyanti PR, IJspeert JE, and Franitza M, et al (2016). TGFβ signaling directs serrated adenomas to the mesenchymal colorectal cancer subtype. *EMBO Mol Med* **8**, 745–760.
- [28] Trumpi K, Ubink I, Trinh A, Djafarihamedani M, Jongen JM, Govaert KM, Elias SG, van Hooff SR, Medema JP, and Lacle MM, et al (2017). Neoadjuvant chemotherapy affects molecular classification of colorectal tumors. *Oncogenesis* **6**e357.
- [29] Gallego R, Codony-Servat J, García-Albéniz X, Carcereny E, Longarón R, Oliveras A, Tosca M, Augé JM, Gascón P, and Maurel J (2009). Serum IGF-I, IGFBP-3, and matrix metalloproteinase-7 levels and acquired chemo-resistance in advanced colorectal cancer. *Endocr Relat Cancer* **16**, 311–317.
- [30] Nadal C, Maurel J, Gallego R, Castells A, Longarón R, Marmol M, Sanz S, Molina R, Martin-Richard M, and Gascón P (2005). FAS/FAS ligand ratio: a marker of oxaliplatin-based intrinsic and acquired resistance in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res* **11**, 4770–4774.
- [31] Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PH, Derer S, Beyer T, Lohse S, Bleeker WK, and Peipp M, et al (2010). Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol* **184**, 512–520.
- [32] Trivedi S, Concha-Benavente F, Srivastava RM, Jie HB, Gibson SP, Schmitt NC, and Ferris RL (2015). Immune biomarkers of anti-EGFR monoclonal antibody therapy. *Ann Oncol* **26**, 40–47.
- [33] Sanchez-Lopez E, Flashner-Abramson E, Shalapour S, Zhong Z, Taniguchi K, Levitzki A, and Karin M (2016). Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling. *Oncogene* **35**, 2634–2644.

4. DISCUSSIÓ

El tractament de quimioteràpia associada a fàrmacs anti-EGFR representa un estàndard de tractament oncològic per a un subgrup de pacients amb CCRm. Malgrat això, no tots els pacients que reben aquesta combinació se'n beneficien plenament. És per tant del nostre interès optimitzar l'ús d'aquest recurs terapèutic.

Convencionalment, el tractament amb cetuximab associat a quimioteràpia en primera línia per càncer colorectal metastàtic s'ha administrat en règim setmanal.

La nostra primera estratègia per optimitzar l'ús dels agents anti-EGFRs va ser intentar millorar la pauta d'administració setmanal de cetuximab en substituir-la per una bisetmanal. Buscàvem disminuir la freqüentació hospitalària i mantenir la eficàcia.

En aquest primer estudi, l'estudi OPTIMIX, vam analitzar els paràmetres d'eficàcia terapèutica d'un règim de cetuximab en pauta bisetmanal, associat a quimioteràpia, en primera línia de tractament de CCRm KRAS-WT.

El principal objectiu de l'estudi OPTIMIX era demostrar que la taxa de resposta d'un règim de cetuximab bisetmanal associat a quimioteràpia tipus FOLFOX és similar a la pauta setmanal convencional.

L'estudi OPTIMIX va objectivar una taxa de resposta del 60.6% i una taxa de control de malaltia del 90% (4 respostes completes, 56 resposta parcials i 30 estabilitzacions de malaltia). Malgrat les limitacions de les comparacions entre estudis, cal remarcar que aquesta taxa de resposta i de control de la malaltia són similars a les reportades en els estudis desenvolupats amb cetuximab setmanal en primera línia per població KRAS-WT, com per exemple l'estudi OPUS amb cetuximab setmanal + FOLFOX, i l'estudi pivotal fase III randomitzat CRYSTAL amb cetuximab setmanal + FOLFIRI.

Com a objectius secundaris vam avaluar la supervivència lliure de progressió, la supervivència global i el perfil de toxicitat de FOLFOX més cetuximab bisetmanal. Vam reportar una SLP de 10.1 mesos, que és similar a la publicada en els estudis pivotals de cetuximab administrat setmanalment en primera línia. Vam reportar una mitjana SG de 20.8 mesos, amb aproximadament un 25% de supervivents a 3 anys.

El perfil de toxicitat reportat pel règim d'administració de cetuximab bisetmanal va ser similar al perfil de seguretat reportat per la pauta de cetuximab setmanal en estudis previs. Així doncs, dosis més altes de cetuximab administrades en règim bisetmanal no condicionen un augment en la incidència d'efectes secundaris derivats de cetuximab. Per tant, es pot considerar una pauta d'administració tant segura com la setmanal.

Altres estudis també han avaluat l'eficàcia de cetuximab en règim bisetmanal i per tant són complementaris als nostres treballs. En un estudi del grup centre europeu de recerca (CECOG), portat a terme en paral·lel al nostre estudi, també es va avaluar l'eficàcia d'un règim de quimioteràpia amb cetuximab bisetmanal en població KRAS-WT. Es va objectivar una taxa de resposta similar a la del nostre estudi, concretament es va objectivar una taxa de resposta del 62% per un règim de FOLFOX-cetuximab bisetmanal en primera línia per població afecta de CCRm KRAS-WT.

Com s'ha comentat prèviament en la introducció, l'estudi del grup CECOG és un fase II randomitzat que compara, en primera línia, FOLFOX més cetuximab en règim setmanal amb FOLFOX més cetuximab bisetmanal. Malgrat ser un estudi de dos branques, l'estudi no té potència estadística per avaluar la no inferioritat entre les dues pautes d'administració de cetuximab. Així doncs, els resultats de l'estudi OPTIMIX i l'estudi del grup CECOG són complementaris.

La SLP de 9.2 mesos i SG de 23 mesos reportades en l'estudi CECOG per FOLFOX cetuximab bisetmanal, també són consistents amb els del nostre estudi i amb els resultats previs publicats per esquemes amb FOLFOX i cetuximab setmanal. Com en l'estudi OPTIMIX, en l'estudi del grup CECOG s'objectivava aproximadament un 25% de supervivents a 3 anys.

Així doncs tenim 2 estudis, l'estudi del grup CECOG i l'estudi OPTIMIX que en ser publicats, demostraven resultats similars entre cetuximab setmanal i bisetmanal pel que fa als principals valors d'eficàcia com són taxa de resposta, SLP i SG .

A la llum dels resultats discutits, considerem la pauta bisetmanal d'administració de cetuximab la més eficient per als nostres malalts. En l'actualitat la pauta d'administració bisetmanal de cetuximab és l'estàndard en el nostre entorn sanitari.

Malgrat aquests resultats, val a dir que no tots els pacients RAS-WT es beneficien plenament d'un tractament amb quimioteràpia associada a un tractament anti-EGFR, i per tant, ens calen més biomarcadors que permetin escollir millor als pacients que es beneficien dels tractaments amb fàrmacs anti-EGFR.

El nostre nou repte va ser avaluar un biomarcador prometedori, que ens permetés optimitzar més el tractament oncològic dels pacients afectes de CCRm RAS-WT.

El biomarcador que ens vam proposar estudiar va ser la coexpressió de p-IGF-1R i de MMP-7. També l'hem anomenat fenotip doble positiu (DP).

Com ja s'ha comentat prèviament, la coexpressió de p-IGF-1R i de MMP-7 es correlaciona amb mal pronòstic en pacients amb CCRm KRAS-WT tractats amb irinotecan més cetuximab en segona/tercera línia (99).

Per validar aquests resultats i avaluar l'ús de la coexpressió de p-IGF-1R i de MMP-7 com a biomarcador en primera línia de tractament, vam dissenyar 2 estudis prospectius translacionals on població diagnosticada de CCRm KRAS-WT prèviament no tractada, rebés tractament amb FOLFOX6m més panitumumab bisetmanal (estudi PULSE) o bé amb FOLFOX6m/FOLFIRI més cetuximab bisetmanal (estudi POSIBA). D'aquesta forma, incorporàvem al disseny dels nostres nous estudis, el coneixement adquirit en l'estudi OPTIMIX, entre d'altres, en relació a la pauta bisetmanal d'administració de cetuximab.

Finalment, vam avaluar la coexpressió de p-IGF-1R i de MMP-7 portant a terme un anàlisi conjunt dels resultats dels estudis PULSE i POSIBA (segona publicació d'aquesta tesi).

En el decurs d'ambdós estudis PULSE i POSIBA, es va validar i incorporar a guies de pràctica clínica l'anàlisi complet de RAS com a nou biomarcador predictiu de resposta negativa per a agents anti-EGFR. Per aquest motiu, vam redactar esmenes als protocols d'ambdós estudis (PULSE i POSIBA), amb la finalitat d'incloure un anàlisi mutacional extensiu de RAS que permetés avaluar els resultats segons fenotip DP en una població RAS-WT(28).

Com a resultat de l'anàlisi multivariat d'ambdós estudis (PULSE i POSIBA) per factors de mal pronòstic de SLP, vam objectivar que l'ECOG >0 i la mutació a BRAFV600E (en l'estudi POSIBA) i elevació de LDH per sobre dels valors de la normalitat (en l'estudi PULSE), es comportaven com a factors de mal pronòstic per SLP.

Com a resultat de l'anàlisi multivariat en ambdós estudis per factors de mal pronòstic de SG, vam objectivar que l'ECOG >0 i la mutació a BRAFV600E es comportaven com a importants factors de mal pronòstic per SG. Així doncs, l'ECOG >0 i la mutació a BRAFV600E que han estat reportats repetidament en la literatura com a factors de mal pronòstic, també s'hi van reportar en el nostre treball de recerca. També vam objectivar que els pacients amb un tumor de colon esquerra presentaven una millor SG.

Cal destacar que la doble positivitats per p-IGF-1R i de MMP-7 es va associar a una disminució de SLP i SG en l'estudi POSIBA de quimioteràpia associada a cetuximab bisetmanal (HR: 1.39; 0.84-2.31, $p=.20$); mentre que es va associar a un augment de SLP i SG en l'estudi PULSE de FOLFOX més panitumumab (HR: 0.33; 0.17-0.66, $p=.0017$). La taxa de resposta segons la coexpressió de p-IGF-1R i MMP-7 va ser similar en ambdós estudis.

Posant els resultats en perspectiva, els resultats de SLP presentats en la segona publicació d'aquesta tesi, amb SLP entre 9.4 i 10.8 mesos pel pacients tractats amb cetuximab bisetmanal (avaluats segons coexpressió de p-IGF-1R i MMP-7), estan en consonància amb els resultats de l'estudi OPTIMIX. De nou, la pauta bisetmanal de cetuximab és igualment efectiva a la pauta setmanal. Per altra banda, cal destacar que la doble positivitats per p-IGF-1R i de MMP-7 s'associa a una disminució de SG quan els pacients reben quimioteràpia més cetuximab bisetmanal. Es confirmen així els resultats d'un estudi previ (99), on s'havia ja reportat que els pacients DP presentaven mal pronòstic en ser tractats amb irinotecan més cetuximab en segona/tercera línia de tractament.

A més, els nostres resultats suggereixen que hi ha un benefici en supervivència global pel subgrup que no coexpressa p-IGF-1R i de MMP-7 (No-DP) quan són tractats amb FOLFOX més cetuximab bisetmanal (31 mesos/no-DP vs 26 mesos/DP), així com en el subgrup que sí coexpressa p-IGF-1R i de MMP-7 (DP) quan són tractats amb

FOLFOX més panitumumab (39mesos/DP vs 18 mesos/no-DP). Aquest benefici es manté després d'ajustar els resultats per les característiques basals, la cirurgia de metàstasi i les segones línies de tractaments.

Cal fer diverses consideracions davant la disparitat de resultats en supervivència obtinguts quan es tracta terapèuticament amb panitumumab o bé amb cetuximab, i analitzem els resultats segons la coexpressió de p-IGF-1R i de MMP-7.

Per començar, val a dir que vam dissenyar el estudi PULSE de panitumumab, basant-nos en els resultats d'una mostra significativament menor a la utilitzada per generar la hipòtesi que relacionava DP i pitjor SG, en població tractada amb cetuximab. Ho vam fer així, amb la hipòtesi que els pacients amb fenotip DP tractats amb un esquema de tractament que inclogués panitumumab tindrien també un pitjor pronòstic. Malgrat que hem confirmat la hipòtesis amb l'estudi POSIBA, no vam objectivar els mateixos resultats per una població tractada amb panitumumab.

La disparitat de resultats probablement té una explicació biològica.

Com ja s'ha comentat en la introducció, cetuximab (IgG1) i panitumumab (IgG2) tenen una efectivitat diferent alhora de desencadenar la citotoxicitat cel·lular lligada a anticòs. Cetuximab s'ha objectivat més efectiu que panitumumab alhora de desencadenar la citotoxicitat cel·lular pel fet de ser una IgG1(104) . Malgrat cetuximab pot activar ADCC a través de cèl·lules *natural killers* (NK), aquestes cèl·lules són quasi absents en el càncer colorectal. La estimulació de macròfags M2 per part del cetuximab estimularia una activitat anti-inflamatòria mitjançant citocines com la IL-10 i una activitat proangiogènica, mitjançant factors com IL-8 i VEGF.

L'activació de IGF1-R i STAT3/MMP-7 indueix la immunotolerància de les cèl·lules T mitjançant TGF- β , IL-10 i VEGF. L'activació de IGF1-R i STAT3, a més, incrementa citocines com IL-6 i CCL2 que polaritzen els macròfags inactius cap a macròfags M2 amb un perfil proangiogènic e immunotolerant (105)

En un tumor amb doble positivitats per p-IGF-1R i de MMP-7 i per tant un perfil proangiogènic, cetuximab i no panitumumab, estimula fortament els macròfags M2,

estimulant encara més la activitat proangiogènica i immunotolerant en la microambient tumoral.

Els resultats dels nostres treballs suggereixen que a mesura que el tumor rep pressió terapèutica amb quimioteràpia més cetuximab, i no així amb panitumumab, incrementa el seu estatus fenotípic DP, mimetitzant la evolució temporal de les resistències adquirides als tractaments anti-EGFR, descrites en la introducció. Un estudi prospectiu va avaluar si el tractament del CCRm amb quimioteràpia modulava els nivells de IGF-1, IGFBP-3 i MMP-7 i va objectivar que els nivells de IGFBP-3 i MMP-7 variaven de manera significativa durant el tractament. Més concretament, MMP-7 augmentava amb la progressió de la malaltia i IGFBP-3 disminuïa, donant suport a la hipòtesi de que aquesta proteasa pot jugar un rol destacat en la resistència adquirida al tractament oncològic (106). Tenint present aquestes dades, la nostra hipòtesi és que l'estat fenotípic DP augmenta amb l'ús de quimioteràpia més cetuximab bisetmanal, empitjorant així el pronòstic dels pacients DP tractats amb cetuximab.

Els resultats de l'activació de l'activitat ADCC, que varia entre cetuximab i panitumumab, s'ha demostrat que també succeeixen en altres escenaris. L'optimització en l'ús d'uns altres agents terapèutics, els anticossos anti-PD1/ PD-L1, fa necessària una especial atenció en els requeriments Fc γ Rs. L'activació de Fc γ Rs per un anticòs anti-PD-L1 augmenta la activitat del agent Anti-PD-L1 mitjançant la resposta ADCC. L'activitat dels anticossos anti-PD-1 és Fc γ R independent, però contràriament al que succeeix amb el Anti-PD-L1, l'activació ADCC compromet l'activitat dels anti-PD1 (107). L'activitat ADCC interfereix d'una manera destacada en els resultats terapèutics dels agents Anti-PD1/PD-L1. La nostra hipòtesi és que l'activitat ADCC també interfereix en els resultats terapèutics de cetuximab i panitumumab que s'avaluen en el nostre segon treball tesi quan s'avaluen d'acord a la coexpressió de p-IGF-1R i MMP-7.

Com s'ha comentat en la introducció, el CCRm es pot classificar d'acord a criteris molecular en 4 subtipus, sent el subtipus mesenquimal el de pitjor pronòstic. El CCRm es pot classificar també immunològicament en 3 categories, sent el subtipus inflammat aquell que presenta una marcada sobreexpressió de factors immunosupressors com

ho són TGF- β i una alta expressió de gens que codifiquen quimiocines per atreure cèl·lules mieloides, incloent-hi *C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)*, *IL-23* i *IL-17*. Aquest subtipus inflammat està lligat al EMT i a CMS4. El subtipus molecular de CCR primari poden canviar amb la progressió de la malaltia i la pressió terapèutica, predominantment cap a un tipus mesenquimal de mal pronòstic. Així doncs, i d'acord amb els nostres resultats, especulem que els tumors DP positius tractats amb cetuximab poden evolucionar cap a tumors de subtipus mesenquimal de mal pronòstic, explicant així, des d'un punt de vista molecular, els pobres resultats en termes de SG d'aquest subgrup de pacient, DP positius, tractats amb quimioteràpia i cetuximab bisetmanal.

La segona part del nostre treball de recerca té diverses limitacions. En primer lloc, la SLP va ser avaluada de forma diferent en pacient inclosos en l'assaig clínic PULSE i l'assaig clínic POSIBA. En el PULSE, la SLP s'avaluava cada 2 mesos i el POSIBA, cada 3 mesos. En segon lloc, el percentatge de pacients DP positius es sensiblement diferent entre assajos (33% en l'estudi PULSE i 13 % en l'estudi POSIBA). En tercer lloc, la explicació biològica dels resultats dispars del nostre biomarcador caldria ser clarificada.

En definitiva, creiem que els nostres resultats tenen importància en el maneig terapèutic dels pacients amb CCRm RAS-WT. A la llum dels resultats de les dos publicacions d'aquesta tesi i en consonància amb altres treballs publicats, considerem que la pauta d'administració bisetmanal de cetuximab és el nou estàndard per l'administració d'aquest agent anti-EGFR. D'acord a aquesta consideració, els nostres estudis de biomarcadors clínics posteriors a l'estudi OPTIMIX on s'hi va utilitzar cetuximab (POSIBA-cetuximab), es van dissenyar amb cetuximab en règim bisetmanal. Amb intenció de continuar optimitzant l'ús dels agents anti-EGFR, vam dissenyar estudis on s'avaluaven biomarcadors pronòstics i predictors de resposta per anti-EGFRs administrats de forma bisetmanal. Vàrem analitzar conjuntament aquests estudis (POSIBA/cetuximab i PULSE/panitumumab). Fruit del nostre treball de recerca, considerem la coexpressió de p-IGF-1R i MMP-7 com un biomarcador pronòstic i predictiu per tractaments anti-EGFRs que ens permet optimitzar l'ús dels agents anti-EGFRs avaluats. Finalment, i amb l'objectiu de poder implementar el nostre biomarcador en la pràctica clínica habitual, creiem justificat conduir prèviament

un nou assaig clínic prospectiu, randomitzat, amb una branca experimental basada en el nostre biomarcador (pacients fenotip DP tractats amb panitumumab i no-DP tractats amb cetuximab) i una branca control (sense aquesta informació) tractada amb cetuximab o panitumumab a criteri de l'investigador. Considerem que els pacients afectes de CCRm del costat esquerre serien els més adients a incloure en aquest estudi, donat que la lateralitat tumoral esquerra ha demostrat ser també un factor pronòstic i predictiu de resposta a tractament anti-EGFR.

5. CONCLUSIONS

La combinació de cetuximab bisetmanal associat a FOLFOX presenta els mateixos resultats que la combinació de FOLFOX i cetuximab setmanal, en termes de Taxa de resposta, SLP i SG.

L'administració de cetuximab bisetmanal associat a FOLFOX és igualment segura a l'administració setmanal i no condiciona un augment dels efectes secundaris.

La sincronització de l'administració de cetuximab i quimioteràpia amb una pauta bisetmanal redueix el nombre de visites per tractament i aporta qualitat de vida al pacient.

La coexpressió de p-IGF-1R i de MMP-7 és un biomarcador de mal pronòstic per pacients amb CCRm RAS-WT tractats quimioteràpia més cetuximab en primera i posteriors línies de tractament.

Els pacients diagnosticats de CCRm RAS-WT que coexpressen una doble positivitats per p-IGF-1R i de MMP-7 es beneficien d'una combinació de FOLFOX més panitumumab.

Els pacients diagnosticats de CCRm RAS-WT que NO coexpressen p-IGF-1R i de MMP-7 es beneficien d'una combinació de quimioteràpia més cetuximab bisetmanal.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(7):799–825.
3. Michl M, Stintzing S, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, et al. CEA response is associated with tumor response and survival in patients with KRAS exon 2 wild-type and extended RAS wild-type metastatic colorectal cancer receiving first-line FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab (FIRE-3 trial). *Ann Oncol*. 2016;27(8):1565–72.
4. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2479–516.
5. Tournigand C, André T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004;22(2):229–37.
6. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 ;23(3):2335–77.
7. Kabbinavar F, Irl C, Zurlo A, Hurwitz H. Bevacizumab improves the overall and progression-free survival of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil-based regimens irrespective of baseline risk. *Oncology*. 2008;75(3–4):215–23.
8. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol*. 2015;16(13):1306–15.
9. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res*. 1995;1(11):1311–8.
10. Foon KA, Yang XD, Weiner LM, Belldegrin AS, Figlin RA, Crawford J, et al. Preclinical and clinical evaluations of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(3):984–90.
11. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch J V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6(4):443–6.
12. Lacouture ME, Anadkat M, Jatoi A, Garawin T, Bohac C, Mitchell E. Dermatologic toxicity occurring during Anti-EGFR monoclonal inhibitor therapy in patients with metastatic colorectal cancer: a systematic review. *Clin Colorectal Cancer* 2018;17(2):85–96.

13. Jatoi A, Rowland K, Sloan JA, Gross HM, Fishkin PA, Kahanic SP, et al. Tetracycline to prevent epidermal growth factor receptor inhibitor-induced skin rashes: results of a placebo-controlled trial from the North Central Cancer Treatment Group (N03CB). *Cancer*. 2008;113(4):847–53.
14. Scope A, Agero ALC, Dusza SW, Myskowski PL, Lieb JA, Saltz L, et al. Randomized double-blind trial of prophylactic oral minocycline and topical tazarotene for cetuximab-associated acne-like eruption. *J Clin Oncol*. 2007;25(34):5390–6.
15. Lacouture ME, Mitchell EP, Piperdi B, Pillai M V., Shearer H, Iannotti N, et al. Skin Toxicity Evaluation Protocol With Panitumumab (STEPP), a phase II, open-label, randomized trial evaluating the impact of a pre-emptive skin treatment regimen on skin toxicities and quality of life in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(8):1351–7.
16. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* . 2009;45(2):228–47.
17. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(4):337–45.
18. Van Cutsem E , Köhne C-H, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C-R, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360 (14): 1408-17.
19. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* . 2009 ; 27(5):663–71.
20. Tabernero J, Cervantes A, Rivera F, Martinelli E, Rojo F, Von Heydebreck A, et al. Pharmacogenomic and pharmacoproteomic studies of cetuximab in metastatic colorectal cancer: biomarker analysis of a phase I dose-escalation study. *J Clin Oncol*. 2010 ;28(7):1181–9.
21. Roca J-M, Alonso V, Pericay C, Escudero P, Salud A, Losa F, et al. Cetuximab given every 2 weeks plus irinotecan is an active and safe option for previously treated patients with metastatic colorectal cancer. *Chemotherapy* . 2010;56(2):142–6.
22. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol* .2011;29(15):2011–9.
23. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, de Braud F, Schuch G, Zube A, et al. Efficacy according to biomarker status of cetuximab plus FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the OPUS study. *Ann Oncol*. 2011;22(7):1535–46.
24. Bokemeyer C, Cutsem E Van, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. 2012 ;48(10):1466–75.

25. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(10):1626–34.
26. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, Phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4697–705.
27. Carrato A, Abad A, Massuti B, Grávalos C, Escudero P, Longo-Muñoz F, et al. First-line panitumumab plus FOLFOX4 or FOLFIRI in colorectal cancer with multiple or unresectable liver metastases: a randomised, phase II trial (PLANET-TTD). *Eur J Cancer*. 2017;81:191–202.
28. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab–FOLFOX4 treatment and *RAS* mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(11):1023–34.
29. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal. *J Clin Oncol*. 2014;32(21):2240–7.
30. Rivera F, Karthaus M, Hecht JR, Sevilla I, Forget F, Fasola G, et al. Final analysis of the randomised PEAK trial: overall survival and tumour responses during first-line treatment with mFOLFOX6 plus either panitumumab or bevacizumab in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis*. 2017;32(8):1179–90.
31. Stintzing S, Modest DP, Rossius L, Lerch MM, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(10):1426–1434.
32. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz H-J, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, et al. Effect of first-line chemotherapy combined with cetuximab or bevacizumab on overall survival in patients With *KRAS* wild-type advanced or metastatic colorectal cancer. *JAMA*. 2017;317(23):2392.
33. Brodowicz T, Ciuleanu TE, Radosavljevic D, Shacham-Shmueli E, Vrbanec D, Plate S, et al. FOLFOX4 plus cetuximab administered weekly or every second week in the first-line treatment of patients with *KRAS* wild-type metastatic colorectal cancer: a randomized phase II CECOG study. *Ann Oncol* . 2013;24(7):1769–77.
34. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang ZQ, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117(20):4623–32.
35. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer* . 2015;51(5):587–94.

36. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, Kichenadasse G, McKinnon RA, Karapetis CS, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;112(12):1888–94.
37. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY, et al. Non-V600 *BRAF* mutations define a clinically distinct molecular subtype of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35(23):JCO.2016.71.439.
38. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2016;27(8):1386–422.
39. Sanz-Garcia E, Argiles G, Elez E, Tabernero J. BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives. *Ann Oncol*. 2017;28(11):2648–57.
40. Kopetz S, McDonough SL, Lenz HJ, Martin Magliocco A, Atreya CE. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG S1406). *J Clin Oncol*. 2017;35(15 Suppl.):3505.
41. Lee GH, Malietzis G, Askari A, Bernardo D, Al-Hassi HO, Clark SK. Is right-sided colon cancer different to left-sided colorectal cancer?. A systematic review. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(3):300–8.
42. Benedix F, Schmidt U, Mroczkowski P, Gastinger I, Lippert H, Kube R. Colon carcinoma .Classification into right and left sided cancer or according to colonic subsite? . Analysis of 29 568 patients. *Eur J Surg Oncol*. .2011;37(2):134–9.
43. Missiaglia E, Jacobs B, D'Ario G, Di Narzo AF, Sonesson C, Budinska E, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol*. 2014;25(10):1995–2001.
44. Tejpar S, Stintzing S CF. Prognostic and predictive relevance of primary tumor location in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer: retrospective analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 trials. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):194.
45. Boeckx N, Koukakis R, de Beeck KO, Rolfo C, Van Camp G, Siena S, et al. Primary tumor sidedness has an impact on prognosis and treatment outcome in metastatic colorectal cancer: results from two randomized first-line panitumumab studies. *Ann Oncol*. 2017;28(8):1862–8.
46. Arnold D, Lueza B, Douillard J-Y, Peeters M, Lenz H-J, Venook A, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials†. *Ann Oncol* .2017 ;28(8):1713–29.
47. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer*. 2017;70:87–98.
48. Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, Ghidini M, Turati L, Dallera P, et al. Prognostic survival associated with left-sided vs right-sided colon cancer a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017;3(2):211–9.
49. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu V. S1D_Cancer Genome Landscapes. *Science* . 2013; 339 (6127):1546-58.

50. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350–6.
51. Song N, Pogue-Geile KL, Gavin PG, Yothers G, Kim R, Johnson NL, et al. Clinical Outcome From Oxaliplatin Treatment in Stage II/III Colon Cancer According to Intrinsic Subtypes: Secondary Analysis of NSABP C-07/NRG Oncology Randomized Clinical Trial. *Jama Oncol.* 2017;2(9):1162–9.
52. De Sousa E Melo F, Wang X, Jansen M, Fessler E, Trinh A, De Rooij LPMH, et al. Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions. *Nat Med.* 2013;19(5):614–8.
53. Stintzing S, Wirapati P, Lenz HJ. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *J Clin Oncol.* 2017;35(15_suppl):3510.
54. Lenz HJ OF. Impact of consensus molecular subtyping (CMS) on overall survival (OS) and progression free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2017;35(15 Suppl.):Abstract 3511.
55. Trinh A, Trumpi K, De Sousa E Melo F, Wang X, de Jong JH, Fessler E, et al. Practical and robust identification of molecular subtypes in colorectal cancer by immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2017;23(2):387–98.
56. Becht E, De Reyniès A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, et al. Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2016;22(16):4057–66.
57. Magbanua MJM, Wolf DM, Yau C, Davis SE, Crothers J, Au A, et al. Serial expression analysis of breast tumors during neoadjuvant chemotherapy reveals changes in cell cycle and immune pathways associated with recurrence and response. *Breast Cancer Res.* 2015;17(1):1–13.
58. Klintman M, Buus R, Cheang MCU, Sheri A, Smith IE, Dowsett M. Changes in expression of genes representing key biologic processes after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer, and prognostic implications in residual disease. *Clin Cancer Res.* 2016;22(10):2405–16.
59. Valent A, Penault-Llorca F, Cayre A, Kroemer G. Change in HER2 (ERBB2) gene status after taxane-based chemotherapy for breast cancer: polyploidization can lead to diagnostic pitfalls with potential impact for clinical management. *Cancer Genet.* 2013;206(1–2):37–41.
60. Trumpi K, Ubink I, Trinh A, Djafarihamedani M, Jongen JM, Govaert KM, et al. Neoadjuvant chemotherapy affects molecular classification of colorectal tumors. *Oncogenesis.* 2017 ;6(7):e357.
61. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity.* 2013;39(4):782–95.
62. Angelova M, Charoentong P, Hackl H, Fischer ML, Snajder R, Krogsdam AM, et al. Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for

- immunotherapy. *Genome Biol.* 2015;16(1):1–17.
63. Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, Angell HK, Obenauf AC, Tosolini M, et al. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med.* 2016;8(327).
 64. Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology.* 2015;144(4):541–8.
 65. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1670–90.
 66. Riabov V, Gudima A, Wang N, Mickley A, Orekhov A, Kzhyshkowska J. Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Front Physiol.* 2014;5 :1–13.
 67. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593–604.
 68. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549–55.
 69. Mancino A, Lawrence T. Nuclear factor-kappaB and tumor-associated macrophages. *Clin Cancer Res.* 2010;16(3):784–9.
 70. Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res.* 2002;62(23):7042–9.
 71. Bertani FR, Mozetic P, Fioramonti M, Iuliani M, Ribelli G, Pantano F, et al. Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–9.
 72. Brannon AR, Vakiani E, Sylvester BE, Scott SN, McDermott G, Shah RH, et al. Comparative sequencing analysis reveals high genomic concordance between matched primary and metastatic colorectal cancer lesions. *Genome Biol.* 2014;15(8):1–10.
 73. Mao C, Wu XY, Yang ZY, Threapleton DE, Yuan JQ, Yu YY, et al. Concordant analysis of KRAS, BRAF, PIK3CA mutations, and PTEN expression between primary colorectal cancer and matched metastases. *Sci Rep.* 2015;5:8065.
 74. Han C-B, Li F, Ma J-T, Zou H-W. Concordant KRAS mutations in primary and metastatic colorectal cancer tissue specimens:a meta-analysis and systematic review. *Cancer Invest .* 2012;30(10):741–7.
 75. Grasselli J, Elez E, Caratù G, Matito J, Santos C, Macarulla T, et al. Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2017;28(6):1294–301.
 76. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nat Med.* 2012;18(2):221–3.

77. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* .2012;486(7404):532–6.
78. Misale S, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Siena S, Bardelli A. Resistance to Anti-EGFR therapy in colorectal cancer: from heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discov*. 2014;4(11):1269–80.
79. Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezínek I, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(7):692–700.
80. Girnita L, Girnita A, Brodin B, Xie Y, Nilsson G, Dricu A, et al. Increased Expression of Insulin-like Growth Factor I Receptor in Malignant Cells Expressing Aberrant p53: functional Impact 1. *Cancer Res*.2000;60:5278–83.
81. Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer*.2008 ;8(12):915–28.
82. Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, Van Buren G, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res*. 2009;69(5):1951–7.
83. Werner H, Sarfstein R, Le Roith D, Bruchim I. Insulin-like growth factor 1 signaling axis meets p53 genome protection pathways. *Front Oncol*. 2016;6(June):1–13.
84. Lin L, Liu A, Peng Z, Lin H-J, Li P-K, Li C, et al. Tumor and stem cell biology STAT3 is necessary for proliferation and survival in colon cancer–initiating cells. *Cancer Res*. 2011;71(23):7226-37
85. Simon AR, Vikis HG, Stewart S, Fanburg BL, Cochran BH, Guan KL. Regulation of STAT3 by direct binding to the Rac1 GTPase. *Science*. 2000 ;290(5489):144–7.
86. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Klöppel G, et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* .2011;19(4):456–69.
87. Rokavec M, Öner MG, Li H, Jackstadt R, Jiang L, Lodygin D, et al. IL-6R/STAT3/miR-34a feedback loop promotes EMT-mediated colorectal cancer invasion and metastasis. *J Clin Invest*. 2014 ;124(4):1853–67.
88. Wilson CL, Heppner KJ, Labosky PA, Hogan BLM, Matrisian LM. Intestinal tumorigenesis is suppressed in mice lacking the metalloproteinase matrilysin. *Proc Natl Acad Sci* .1997;94(4):1402–7.
89. Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT. Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. *Clin Cancer Res*.2004;10(8):2832–45.
90. Fukuda A, Wang SC, Morris JP, Folias AE, Liou A, Kim GE, et al. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer Cell*. 2011;19(4):441–55.

91. Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein3. *Cancer Res.* 2004;64:665–71.
92. Nakamura M, Miyamoto S, Maeda H, Ishii G, Hasebe T, Chiba T, et al. Matrix metalloproteinase-7 degrades all insulin-like growth factor binding proteins and facilitates insulin-like growth factor bioavailability. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 ;333(3):1011–6.
93. Hemers E, Duval C, Mccaig C, Handley M, Dockray GJ, Varro A. Insulin-like growth factor binding protein-5 is a target of matrix metalloproteinase-7: implications for epithelial-mesenchymal signaling. *Cancer Res.* 2005; ;65(16):7363–9.
94. Miyamoto S, Nakamura M, Yano K, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, et al. Matrix metalloproteinase-7 triggers the matricrine action of insulin-like growth factor-II via proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 2 in the extracellular matrix. *Cancer Sci.* 2007;98(5):685–91.
95. Williams AC, Smartt H, H-Zadeh AM, MacFarlane M, Paraskeva C, Collard TJ. Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) potentiates TRAIL-induced apoptosis of human colorectal carcinoma cells through inhibition of NF- κ B. *Cell Death Differ.* 2007;14(1):137–45.
96. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W. Nf-Kb in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):301–10.
97. Adachi Y, Li R, Yamamoto H, Min Y, Piao W, Wang Y, et al. Insulin-like growth factor-I receptor blockade reduces the invasiveness of gastrointestinal cancers via blocking production of matrilysin. *Carcinogenesis.* 2009; 30(8):1305–13.
98. Yao C, Su L, Shan J, Zhu C, Liu L, Liu C, et al. IGF/STAT3/NANOG/Slug signaling axis simultaneously controls epithelial-mesenchymal transition and stemness maintenance in colorectal cancer. *Stem Cells.* 2016;34(4):820–31.
99. Hörndler C, Gallego R, García-Albeniz X, Alonso-Espinaco V, Alonso V, Escudero P, et al. Co-expression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) and phosphorylated insulin growth factor receptor I (pIGF-1R) correlates with poor prognosis in patients with wild-type KRAS treated with cetuximab or panitumumab: a GEMCAD study. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(2):177–83.
100. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):738–46.
101. Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, Buc E, Bachet J-B, Lecomte T, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):5924–30.
102. Pietrantonio F, Nicolantonio F Di, Schrock AB, Lee J, Tejpar S, Sartore-Bianchi A, et al. ALK, ROS1, and NTRK rearrangements in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(12)
103. Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, Lee J, Morano F, Fucà G, et al.

- RET fusions in a small subset of advanced colorectal cancers at risk of being
104. Schneider-Merck T, Lammerts van Bueren JJ, Berger S, Rossen K, van Berkel PHC, Derer S, et al. Human IgG2 antibodies against epidermal growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *J Immunol*. 2010 ; 184(1):512–20.
 105. Sanchez-Lopez E, Flashner-Abramson E, Shalapour S, Zhong Z, Taniguchi K, Levitzki A, et al. Targeting colorectal cancer via its microenvironment by inhibiting IGF-1 receptor-insulin receptor substrate and STAT3 signaling. *Oncogene*. 2016;35(20):2634–44.
 106. Gallego R, Codony-Servat J, García-Albéniz X, Carcereny E, Longarón R, Oliveras A, et al. Serum IGF-I, IGFBP-3, and matrix metalloproteinase-7 levels and acquired chemo-resistance in advanced colorectal cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(1):311–7.
 107. Dahan R, Segal E, Engelhardt J, Selby M, Korman AJ, Ravetch J V. FcγRs Modulate the anti-tumor activity of antibodies targeting the PD-1/PD-L1 Axis. *Cancer Cell*. 2015;28(3):285–95.
 108. Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, Kopetz S, Tejpar S, Tabernero J Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2017 Feb;17(2):79-92