



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Utilitat clínica de l'ADN circulant tumoral en pacients amb càncer colorectal

Joana Vidal Barrull

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.

TESI DOCTORAL

**UTILITAT CLÍNICA DE L'ADN
CIRCULANT TUMORAL
EN PACIENTS AMB CÀNCER COLORECTAL**



Joana Vidal Barrull
Programa de doctorat
de Medicina i Recerca Translacional
Universitat de Barcelona, 2023



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



UTILITAT CLÍNICA DE L'ADN CIRCULANT TUMORAL EN PACIENTS AMB CÀNCER COLORECTAL

• • • • •

Memòria de tesi doctoral presentada per
Joana Vidal Barrull
per optar al grau de doctora per la Universitat de Barcelona

• • • • •

Dirigida per:
Dra. Clara Montagut Viladot
Professora Associada Assistencial Universitat Pompeu Fabra
Cap de Secció d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona
Investigadora Institut Investigacions Hospital del Mar (IMIM), Barcelona

Dr. Joan Albanell Mestres
Catedràtic de la Universitat Pompeu Fabra
Cap de Servei d'Oncologia Mèdica, Hospital del Mar, Barcelona
Director del Programa de Teràpia molecular del càncer de l'Institut
Hospital del Mar d'Investigacions (IMIM), Barcelona

Tutora:
Dra. Begoña Mellado González
Professora Associada de la Universitat de Barcelona
Consultora Sènior. Hospital Clínic, Barcelona

• • • • •

Programa de Doctorat Medicina i Recerca Translacional
Facultat de Medicina i Ciències de la Salut
Universitat de Barcelona • Abril 2023



A L'Elna





• AGRAIMENTS





Aquesta tesi va començar a germinar l'últim any de residència, poc a poc i quasi sense adonar-me'n al principi, com un projecte dintre de les anomenades mentories. Amb el temps la biòpsia líquida anava agafant rellevància. Com més en sabíem, més creixien els estudis i les col·laboracions i, el millor de tot, anàvem construint un equip. Qui havia de dir que arribaríem fins aquí! Per mi la tesi no significa la culminació d'un treball sinó un pas més en el camí, però arribats en aquest punt sí que m'agradaria agafar una mica d'aire i agrair a tots els que n'heu format part.

A la Clara, principi i final d'aquesta tesi. Gràcies per veure'm com una peça del teu equip, per acollir-me i fer-me créixer científica i personalment. Gràcies per portar-me a llocs als que mai hauria pensat que podria accedir. I sobretot, gràcies per ser sempre crítica acadèmicament però infinitament comprensiva en el terreny personal.

Al Joan Albanell, perquè l'exigència per ser millors metges i la recerca inexorable de l'excel·lència m'ha fet millorar cada dia. Gràcies per la confiança progressiva, mai regalada però sempre sincera.

Als pacients i a les seves famílies, perquè no és la nostra petjada sinó la seva la que ens fa avançar, fer-nos les preguntes necessàries i buscar-ne les respostes. L'optimisme oncològic és també saber que podem fer-ho millor.

A tots els companys del Servei d'Oncologia de l'Hospital del Mar, especialment a la secció de Digestiu, a la Marta, la Laura i la Maria. Estar rodejada d'un equip així només fa que sumar. Porto aprenent de vosaltres des de la residència i espero continuar fent-ho per molt temps.

A la Bea, per haver format un laboratori de biologia molecular de primer nivell, però sobretot per remar sempre a favor en tots els projectes. A l'Alba per ensenyar-me els principis tècnics i biològics de la biòpsia líquida, a paper i boli, com les bones professores. A la Conchi, per revisar cada mostra i cada resultat com si fos únic.



Als residents que vam ser (i que encara creiem que som). A La Iria i l'Eli per ensenyar-me quin tipus de metge volia ser. Al David (casi co-R), pels riures a ple pulmó i les reflexions més profundes. Per fer-me costat sempre i per salvar la meva època de pandèmia. Em fa molta il·lusió que també siguis en aquesta tesi. A la millor generació de residents d'oncologia: la Noe, la Tamara, La Maria, el Pedro, la Mayra, la Laura i l'Àlex. Perquè treballar entre amics és el millor que et pot passar.

A l'Álvaro i l'Àlex, probablement els que més han sentit els meus arguments de procrastinació. Una ma a l'espatlla en el moment correcte és impagable.

A la Isa, per la feina constant, l'ajuda en el que faci falta i sobretot per les converses de cine, llibres, viatges i vida.

A infermeria i administratives de la planta d'oncologia i d'Hospital de Dia. A la Loli, per recordar-me cada dia que estem aquí pels pacients. A la Gemma i la Roser, sense elles no hi hauria plasmes ni tesi. Gràcies per ajudar-me tant al principi quan no era més que una resident pesada amb llistes de pacients per punxar.

Al Dr. Luis Diaz per acollir-me al seu laboratori al MSKCC i fer-me sentir una més d'un equip increïble d'investigadors i persones. A la Michelle, el Mitesh, la Erika, la Caitlin, la Prachi, l'Andrea i els qui van venir després. Però sobretot, al Benoit, gràcies per ser la meva família a NY.

A la Laia i la Marta, les millors co-R que mai podria haver tingut. Des de les guàrdies d'Urgències fins a dia d'avui. I el que ens queda per viure juntes.

Als meus amics de Ribes, perquè no en saben res de la biòpsia líquida i ni falta que fa. Per créixer junts i compartir les idees i pensaments més essencials. A la Marta i la Mercè, per ser com germanes. Sempre.

Als meus pares, per fer-me ser qui soc, per seguir-me ajudant i donant suport cada dia. Aquests dies recordo una frase que sempre em diu el meu pare: "Joana, rodeja't sempre de gent millor que tu". És seguir el vostre exemple el que ha fet que avui pugui estar llegint aquesta tesi.



A tota la meva família, però sobretot al meu avi. Mai ningú estarà tan orgullós de mi com ho estava ell.

A l'Elna, motor i raó de tot. Potser aquesta tesi no s'ha escrit abans perquè havies de ser aquí per compartir-la amb mi.



ÍNDEX

ABREVIATURES PRINCIPALS	21
RELACIÓ D'ARTICLES PUBLICATS	25
RESUM	29
INTRODUCCIÓ	35
1. Càncer Colorectal	37
1.1. Epidemiologia	37
1.2. Estadiatge	37
1.3. Generalitats del tractament del càncer colorectal	38
1.3.1. Tractament de la malaltia localitzada (estadis I-III)	38
1.3.2. Tractament de la malaltia metastàtica (estadi IV)	41
1.4. Diagnòstic molecular per a la selecció de tractament anti-EGFR en CCRm	42
1.5. Mecanismes de resistència adquirida a anti-EGFR	47
1.6. Estratègia clínica per al diagnòstic molecular en el CCRm	50
2. ADN circulant tumoral	51
2.1. Característiques generals de l'ADN circulant tumoral	52
2.2. Mètodes per a la detecció de l'ADN circulant tumoral	53
2.2.1. PCR digital	53
2.2.2. Seqüenciació de Nova Generació (Next Generation Sequencing, NGS)	55
2.2.3. Estratègies per la detecció de l'ADNtc: informat per tumor versus tumor-agnòstic	58
2.2.4. Quantificació de les mutacions en ADNtc	59
2.3. Aplicacions clíniques de l'ADN circulant tumoral en el càncer colorectal	60
2.3.1. Diagnòstic molecular en càncer colorectal metastàtic	61
2.3.2. Avaluació de resposta al tractament en càncer colorectal metastàtic	62
2.3.3. Monitoratge de l'evolució clonal i resistència al tractament	64



2.3.4. Detecció de malaltia mínima residual (MMR) en càncer colorectal localitzat	65
HIPÒTESI	67
OBJECTIUS GENERALS	71
OBJECTIUS ESPECÍFICS	75
ARTICLES ORIGINALS	79
ARTICLE 1: Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients	81
ARTICLE 2: Liquid biopsy detects early molecular response and predicts benefit to first-line chemotherapy plus cetuximab in metastatic colorectal cancer: PLATFORM-B study	105
ARTICLE 3: Clinical impact of pre-surgery circulating tumor DNA after total neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer: a biomarker study from the GEMCAD1402 Trial	133
DISCUSSIÓ	157
CONCLUSIONS	171
BIBLIOGRAFIA	175



5-FU	5-fluorouracil
ADNc	ADN circulant
ADNct	ADN circulant tumoral
BEAMing	de l'anglès "beads, emulsion, amplification and magnetics"
CCR	Càncer Colorectal
CCRm	Càncer Colorectal metastàtic
CEA	Antigen Carcinomaembrionari
CRLA	Càncer de Recte Localment Avançat
EGFR	Receptor del Factor de Creixement Epidèrmic
EGFR-ECD	de l'anglès "EGFR extracellular domain"
HR	Hazard Ratio
MAF	de l'anglès "Mutant Allele Fraction"
MAFr	MAF relativa
MAPK	de l'anglès "Mitogen-Activated Protein Kinases"
MMM	Malaltia Mínima Metastàtica
MMR	Malaltia Mínima Residual
NAR	de l'anglès "Neoadjuvant recurrence score"
NGS	de l'anglès "Next Generation Sequencing"
PCRd	PCR digital
QRT	químio-radioteràpia
QT	quimioteràpia
RCp	Resposta Completa Patològica
SG	Supervivència Global
SLM	Supervivència Lliure de Malaltia
SLP	Supervivència Lliure de Progressió
SLR	Supervivència Lliure de Recidiva
TNT	Tractament Neoadjuvant Total
VEGFR	Receptor del Factor de Creixement Endotelial Vascular
wt	de l'anglès "wilde type"





Tesi en format de compendi de publicacions. La tesi consta de tres objectius i tres articles.

ARTICLE 1:

J Vidal, L Muinelo, A Dalmases, F Jones, D Edelstein, M Iglesias, M. Orrillo, A Abalo, C Rodríguez, E Brozos, Y Vidal, S Candamio, F Vázquez, J Ruiz, M Martín, M Guix, L Visa, V Sikri, J Albanell, B Bellosillo, R López, C Montagut. "Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients" *Annals of Oncology*, 2017; 28 (6), 1325-1332

Factor d'impacte: 13.926 Quartil 1

ARTICLE 2:

J Vidal, M.C. Fernández-Rodríguez, D. Casadevall, P. García-Alfonso, D. Páez, M. Guix, V. Alonso, M.T. Cano, C. Santos, G. Durán, E. Elez, J.L. Manzano, R. García-Carbonero, R. Ferreiro, F. Losa, E. Pineda, J. Sastre, F. Rivera, B. Bellosillo, J. Tabernero, E. Aranda, R. Salazar, C. Montagut. "Liquid biopsy detects early molecular response and predicts benefit to first-line chemotherapy plus cetuximab in metastatic colorectal cancer: PLATFORM-B study" *Clinical Cancer Research* 2023; 29 (2), 379-388

Factor d'impacte: 13.801 Quartil 1

ARTICLE 3:

J Vidal, D. Casadevall B. Bellosillo, C. Pericay, R. García-Carbonero, F. Losa, L. Layos, V. Alonso, J. Capdevila, J. Gallego, R. Vera, A. Salud, M. Martín-Richard, M. Nogué, E. Cillán, J. Maurel, I. Faull, V. Raymond, C. Fernández-Martos, C. Montagut. "Clinical impact of pre-surgery circulating tumor DNA after total neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer: a biomarker study from the GEMCAD1402 Trial" *Clinical Cancer Research*; 2021 27 (10), 2890-2898

Factor d'impacte: 12.531 Quartil 1

Factor d'impacte total: 40.258





L'abordatge terapèutic dels pacients amb càncer colorectal (CCR) està definit principalment per la localització tumoral, l'extensió de la malaltia (estadiatge TNM) i el diagnòstic patològic i molecular. Així, en el CCR metastàtic (CCRM) amb estabilitat de microsatèl·lits s'indica en tractament de primera línia quimioteràpia amb anti-EGFR o antiangiogènics segons les característiques clíniques i la determinació de mutacions en *RAS* i *BRAF*. En el càncer de còlon localitzat la primera estratègia terapèutica és la cirurgia, mentre que en el càncer de recte localment avançat (CRLA) es realitza tractament neoadjuvant amb químio-radioteràpia (QRT) previ a la intervenció quirúrgica. En els darrers anys s'ha proposat intensificar el tractament neoadjuvant del CRLA mitjançant l'administració de quimioteràpia + QRT (anomenat tractament neoadjuvant total o TNT). Tot i els esforços en refinar la selecció dels pacients per rebre la millor teràpia sistèmica, ens manquen biomarcadors que permetin predir la resposta al tractament i així poder individualitzar el tractament.

La biòpsia líquida mitjançant l'estudi de l'ADN circulant tumoral (ADNct) en sang perifèrica permet la caracterització molecular tumoral d'una forma mínimament invasiva i en temps real. En els darrers anys la sensibilitat i especificitat de la tecnologia per seqüenciar l'ADNct ha millorat obrint la possibilitat d'utilitzar la biòpsia líquida per al diagnòstic i la personalització del tractament dels pacients amb càncer.

La hipòtesis d'aquesta tesi és que la biòpsia líquida mitjançant el genotipat i la quantificació de l'ADNct pot ser d'utilitat clínica en el diagnòstic i tractament dels pacients amb CCR. L'objectiu global és avaluar l'aplicabilitat clínica de l'estudi de l'ADNct en pacients amb CCR en tres escenaris clínics diferents: subobjectiu 1) la detecció de mutacions puntuals en pacients amb CCRM; subobjectiu 2) la valoració de resposta precoç a tractament amb quimioteràpia + antiEGFR en pacients amb CCRM tractats en primera línia; i subobjectiu 3) la detecció de malaltia mínima residual després de TNT en pacients amb CRLA. Aquests tres estudis s'han plasmat en 3 publicacions que componen la present tesi doctoral.

El primer treball tenia com a objectiu principal demostrar la concordança entre les mutacions de *RAS* detectades en teixit i la determinació de *RAS* en biòpsia líquida. Aquest estudi va incloure una cohort de més de 100 pacients amb CCRM. L'estudi d'ADNct es va realitzar mitjançant una tècnica de PCR digital (PCRd) que estudiava





les 34 mutacions puntuals patogèniques en *KRAS* i *NRAS* i va demostrar una concordança entre plasma i teixit superior al 90%. A més a més vam determinar que les principals limitacions per a la detecció d'ADNct era la localització metastàtica única a nivell peritoneal o pulmonar i l'administració de quimioteràpia previ a l'extracció de la mostra de sang. Aquestes troballes s'han validat en estudis posteriors del nostre grup i d'altres i ha dut a la recomanació en les guies clíniques europees i americanes de l'ús de la biòpsia líquida com alternativa vàlida per determinar mutacions en *RAS* en CCRm. En una cohort exploratòria de pacients es va observar la capacitat del monitoratge de les mutacions de *RAS* en ADNct per a predir resposta o resistència al tractament. A partir de les dades preliminars de monitoratge vam dissenyar el segon estudi.

En el segon treball vam estudiar la utilitat clínica de la biòpsia líquida per a la detecció precoç de resposta en pacients amb CCRm *RAS* wt en teixit tractats en primera línia amb quimioteràpia + anti-EGFR. Per fer-ho vam dissenyar un estudi prospectiu i multicèntric que va incloure 100 pacients de 15 hospitals espanyols. Es va recollir plasma previ a l'inici de tractament i després de cada dos cicles fins a progressió. L'ADNct es va estudiar mitjançant PCRd i un panell de NGS (de les sigles en anglès "next generation sequencing") que incloïa l'anàlisi de mutacions en regions puntuals dels 14 gens més comunament alterats en CCR. La mutació més freqüent en cada mostra s'establia com a mutació troncal i marcador subrogat del volum tumoral total. En aquest estudi vam descriure que l'anàlisi combinada de mutacions troncal i mutacions de resistència a anti-EGFR després de dos cicles és el millor predictor primerenc de resposta al tractament. Així, els pacients amb "resposta molecular primerenca" (disminució de la mutació troncal i disminució de les mutacions de resistència al cicle 2) van obtenir una millor taxa de resposta (77,5% vs. 25%; $p=0.008$) i una supervivència lliure de progressió (SLP) més llarga ($HR=0.18$; $p<0.001$) en comparació amb els pacients amb "progressió molecular primerenca" (augment de la mutació troncal i/o augment de mutacions de resistència). A més vam ratificar que les úniques mutacions de resistència a fàrmacs anti-EGFR que es detectaven de forma precoç en ADNct eren a *RAS* o *BRAF* i que un augment de la fracció relativa de les mateixes després de dos cicles de tractament desencadenava una expansió clonal fins a la progressió i s'associava amb una SLP més curta ($HR = 10.5$; $p < 0.001$).





El tercer i últim treball el vam centrar en l'estudi de l'ADNct per a la valoració de resposta i detecció de malaltia mínima residual en pacients amb CRLA tractats amb TNT. En aquest estudi vam incloure pacients tractats amb mFOLFOX6 +/- Aflibercept seguit de QRT i cirurgia de l'assaig clínic GEMCAD 1402. Les mostres de plasma es van recollir previ inici de tractament i 48 hores abans de la cirurgia. Per a l'anàlisi d'ADNct es va utilitzar un assaig de NGS ultrasensible que integra signatures genòmiques i epigenòmiques. Es van incloure 144 mostres de plasma aparellades de 72 pacients. La detecció d'ADNct abans de la cirurgia es va associar significativament amb un elevat risc de recurrència sistèmica, una supervivència lliure de malaltia més curta (HR=4; p=0.033) i una pitjor supervivència global (HR=23; p<0.0001) en comparació amb aquells pacients ADNct indetectable post neoadjuvència. No es va trobar cap associació entre l'estat de l'ADNct previ a la cirurgia i la resposta patològica al tractament neoadjuvant, remarcant que l'ADNct no detecta la resposta local sinó la presència de malaltia mínima metastàtica.

En conjunt, les troballes dels tres treballs que es presenten en aquesta tesi confirmen que l'estudi de l'ADNct és una eina sensible i mínimament invasiva per al diagnòstic molecular en CCRm, la detecció precoç de resposta al tractament i la detecció de recurrència a distància i mort en pacients amb CRLA tractats amb TNT. Actualment l'ADNct ja s'ha implementat com una alternativa al teixit en el diagnòstic molecular del CCRm. L'aplicabilitat de la biòpsia líquida en lavaluació precoç de resposta i el monitoratge del càncer s'haurà de validar en assajos clínics que utilitzin l'ADNct per a personalitzar la modulació del tractament.





• INTRODUCCIÓ





1. Càncer Colorectal

1.1. Epidemiologia

El càncer colorectal (CCR) és el tercer tumor en incidència nivell mundial i representa un important problema de Salut Pública. Al 2020, l'Organització Mundial de la Salut va estimar prop de dos milions de casos nous de CCR a tot el món i més de 800.000 defuncions relacionades amb la malaltia (1,2). A Espanya aquesta estimació és de 227 casos nous per cada 100.000 habitants amb una mortalitat estimada de més de 16.000 pacients/any (3).

La supervivència a 5 anys relacionada amb el CCR oscil·la entre el 90% en pacients diagnosticats en fases inicials i el 15-20% en aquells diagnosticats de malaltia metastàtica. Dels casos nous diagnosticats, el 15-20% es diagnostiquen en estadi IV i fins al 50% de tots els pacients amb CCR presentaran finalment malaltia metastàtica durant la seva evolució (2,4).

El pronòstic dels pacients ha millorat en els darrers anys gràcies a l'impacte de l'abordatge integral de la malaltia, des de la implementació de programes de detecció precoç fins a la millora dels procediments quirúrgics i la introducció de noves teràpies sistèmiques oncològiques. Tot i així, el CCR segueix sent la tercera causa de mortalitat per càncer a nivell mundial(5).

1.2 Estadiatge

El diagnòstic, pronòstic i la decisió de tractament del CCR es basa en l'estadiatge clínic i patològic. Actualment, el sistema de classificació TNM de l'AJCC (American Joint Committee on Cancer) és el més utilitzat per al diagnòstic i el principal factor pronòstic en el CCR (6,7). El sistema TNM es basa en l'extensió del tumor primari (T), el grau de difusió als ganglis limfàtics loco-regionals (N) i la presència de metàstasi a distància (M). Amb això es determinen 4 estadis: estadi I on el tumor pot haver crescut fins a la submucosa o la muscularis pròpia però sense afectació limfàtica (T1-2 N0M0); estadi II on el tumor envaeix el teixit peri-colorectal o els òrgans contigus però sense afectació limfàtica (T3-4N0M0); estadi III on hi ha ganglis limfàtics loco-regionals afectes independentment de la





invasió tumoral (N1-2); i estadi IV en que ja es detecten metàstasi a distància al moment del diagnòstic (M1).

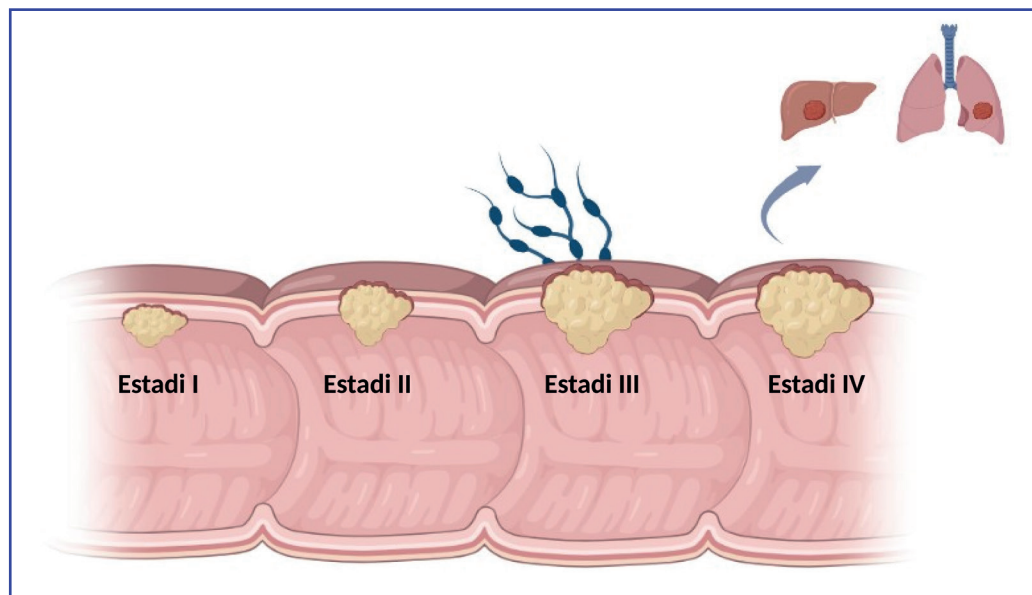


Figura 1: representació gràfica de l'estadiatge TNM en càncer colorectal

1.3. Generalitats del tractament del càncer colorectal

El maneig del CCR es basa en la localització del tumor (còlon vs. recte), la histologia i l'estadiatge clínic i patològic. En el procés diagnòstic i d'establiment de pla terapèutic hi intervé un equip multidisciplinari format per gastro-enteròlegs, radiòlegs, anatomopatòlegs, cirurgians, oncòlegs radioterapeutes i oncòlegs mèdics. En els darrers anys ha cobrat especial rellevància l'estudi molecular de biomarcadors tumors per a determinar l'abordatge de tractament.

1.3.1. Tractament de la malaltia localitzada (estadis I-III)

Tractament del càncer de colon localitzat

El maneig inicial del càncer de còlon localitzat és la cirurgia seguit de quimioteràpia adjuvant segons la valoració del risc de recurrència basada en l'estadiatge





ge histopatològic final (7). La supervivència estimada després de la cirurgia d'un càncer de còlon i la indicació clínica de tractament amb quimioteràpia adjuvant s'associa a l'estadiatge. Així la supervivència esperada als 5 anys és del 99% en pacients amb estadi I, del 68% al 83% en pacients amb estadi II i del 45% al 65% per pacients diagnosticats en estadi III (8). Els principals factors que determinen la indicació de quimioteràpia adjuvant son la invasió tumoral de la serosa (T4) o la presència de ganglis limfàtics regionals afectes (N1,2) (9). Altres factors que determinen la indicació de quimioteràpia adjuvant en els estadis II son la invasió tumoral perineural o limfo-vascular, el grau de diferenciació tumoral, el nombre de ganglis extrets en la cirurgia i l'elevació del marcador tumoral antígen carcino-maembrionari (CEA) (9–11).

Actualment, l'ús de tractaments estàndard basats en fluoropirimidines (5-fluoracil (5-FU) o capecitabina) i oxaliplatí adjuvant després de la cirurgia estimen un augment en supervivència global (SG) d'aproximadament un 20% en pacients amb càncer de còlon estadi III i un 5% en pacients amb tumors estadi II (12–15).

Tractament del càncer de recte localitzat

Entre els pacients diagnosticats de CCR, el 30% dels tumors primaris s'originen al recte (16). El recte és la part distal del tub digestiu i s'ubica entre el marge anal extern i fins a 15cm. Aquests tumors es classifiquen en "recte baix" aquells compresos entre el marge anal i fins a 5cm, "recte mig" de 5cm fins a 10cm i "recte alt" entre 10 i 15cm del marge anal extern. L'abordatge de tractament en el càncer de recte és lleugerament diferent al càncer de còlon. La localització del tumor primari, la invasió tumoral (T) i la presència de ganglis limfàtics patològics (N) avaluats per ressonància magnètica nuclear (RMN) són les principals variables per a definir el risc potencial i l'abordatge terapèutic inicial. Així, tumors de baix risc (estadi I) s'indicarà cirurgia mentre que aquells amb risc entremig o alt (estadis II recte mig o baix i estadis III) es realitzarà inicialment tractament neoadjuvant (preoperatori) amb radioteràpia o quimio-radioteràpia (QRT) seguit de cirurgia (17,18).

Els esquemes clàssics de tractament neoadjuvant inclouen (a) la QRT amb capecitabina o 5-FU en infusió continuada administrat conjuntament amb radioteràpia a





dosi de 45–50 Gy en 25–28 fraccions i (b) la radioteràpia de curta durada amb dosi total de 25Gy en 5 fraccions de 5 Gy. Ambdós esquemes han demostrat una milloria en el control locorregional de la malaltia respecte la cirurgia inicial disminuint les taxes de recaiguda local fins al 5-9% (19–21). Després de la cirurgia, l'administració de quimioteràpia adjuvant basada en fluoropirimidines en els pacients que han rebut neoadjuvència és controvertida i no existeixen dades de benefici en SG global (22–24). Afegir oxaliplatí a fluoropirimidines en el tractament adjuvant (XELOX; FOLFOX) només ha demostrat eficàcia en el subgrup de pacients amb estadi III patològic (ypN1-2) (25,26). Tot i així, l'estat del pacient després de la cirurgia i la potencial toxicitat de la quimioteràpia adjuvant fa que quasi un terç dels pacients no arribin a iniciar el tractament i que menys del 50% dels pacients completin l'esquema adjuvant previst (23). Tot i aquest abordatge multimodal, fins un 30% dels pacients tractats amb neoadjuvència seguit de cirurgia +/- quimioteràpia adjuvant presentaran recaiguda metastàtica durant el seguiment (23,27).

Tractament neoadjuvant total (TNT)

En els darrers anys hi ha hagut un interès creixent per tal de poder identificar aquells pacients amb major risc de recurrència. S'ha proposat un subgrup anomenat càncer de recte localment avançat (CRLA) definits per ser tumors amb estadiatge clínic (c)T3 d'alt risc, cT4 o cN2. En aquests pacients s'ha estudiat l'administració preoperatòria de quimioteràpia sistèmica d'inducció o consolidació ja sigui abans o després de la QRT o de la radioteràpia de curta durada. Aquesta estratègia es coneix com a tractament neoadjuvant total (TNT) i ha demostrat un millor perfil de toxicitat i major compliment del tractament sistèmic sense comprometre l'eficàcia local (28–31).

Més recentment, dos assaig clínics fase III han comparat l'esquema clàssic de QRT amb l'abordatge mitjançant TNT i han demostrat que el TNT està associat a taxes de resposta completa patològica (RCp) superiors, una supervivència lliure de malaltia (SLM) més llarga i menor taxa de fracàs del tractament (32,33). Tot i així, l'aparició de metàstasis a distància durant el seguiment, que potencialment sorgeixen d'una malaltia mínima residual (MMR) després de la cirurgia, continuen sent la causa principal del fracàs del tractament. En aquests estudis, fins un 20% dels pacients tractats amb TNT i cirurgia radical es diagnosticaran de metàstasi durant el seguiment limitant la SG als 5 anys al 80%.





Els marcadors pronòstics en càncer de recte localitzat són controvertits. Fins avui, el més utilitzat ha estat la RCp, és a dir, l'absència de tumor residual després del tractament neoadjuvant. Tot i haver estat l'objectiu primari de molts assajos clínics i tenir una bona correlació amb les taxes de control local de malaltia (27,34,35) la seva correlació amb la SG no ha estat demostrada (36). En els darrers anys s'ha desenvolupat un nomograma per a prevenir recurrència local, metàstasi a distància i SG en pacients amb CRLA que té en consideració tan l'estadiatge inicial com el patològic després de la neoadjuvència. Aquest nomograma s'anomena "Neoadjuvant recurrence score" o NAR i divideix els pacients en tertils (baix, mig i alt) segons el risc de recaiguda. El NAR i la seva correlació amb la supervivència lliure de recidiva (SLR) ha estat validat en diferents estudis (37–39). Tot i així, aquest índex no s'ha avaluat en tots els estudis de càncer de recte i la seva aplicació no s'ha introduït en pràctica clínica habitual. Tanmateix, tan la RCp com el NAR són indicadors que només poden aplicar-se després de la realització de la cirurgia rectal, i la identificació pre-quirúrgica de pacients amb malaltia mínima metastàtica (MMM) que provocarà la recaiguda a distància continua sent un repte.

Diversos estudis suggereixen que en aquells pacients que aconsegueixen una resposta completa clínica (RCc) després de l'administració de TNT es podria evitar la cirurgia i aplicar una estratègia de vigilància estreta. Tot i que els treballs que recolzen aquesta aproximació són recents i encara no és una pràctica estesa, és una alternativa acceptable a la cirurgia rectal amb els beneficis d'un abordatge que estalvia la proctectomia (29,40–42). Els biomarcadors per seleccionar pacients que són bons candidats per a una estratègia de preservació d'òrgan amb vigilància estreta encara no estan identificats.

1.3.2 Tractament de la malaltia metastàtica (estadi IV)

Fins als anys 2000 el pronòstic dels pacients amb càncer colorectal metastàtic (CCRm) era pobre i el tractament limitat a la quimioteràpia amb 5-fluorouracil amb una SG mitjana que oscil·lava entre els 8 i els 12 mesos (43). En els anys posteriors la introducció d'oxaliplatí i irinotecan en combinació amb fluoropirimidines van millorar la supervivència fins a una mitjana d'entre 17 i 20 mesos (44,45). La combinació de quimioteràpia amb anticossos monoclonals dirigits contra el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) i contra el receptor del factor de creixement





endotelial vascular (VEGFR) han aconseguit que actualment els pacients amb CCRm arribin a una supervivència mitjana de 30 mesos (4,46,47).

Així doncs, el tractament actual de primera línia pel CCRm inclou el doblet o triplet de quimioteràpia amb fluoropirimidines més oxaliplatí i/o irinotecan combinat amb tractaments dirigits contra EGFR (cetuximab i panitumumab) o contra VEGFR (bevacizumab) segons les característiques del tumor (principalment el perfil molecular del tumor i la lateralitat del tumor primari (dret vs esquerre)), les característiques del pacient (comorbiditats, simptomatologia, preferències) i l'objectiu terapèutic plantejat (47).

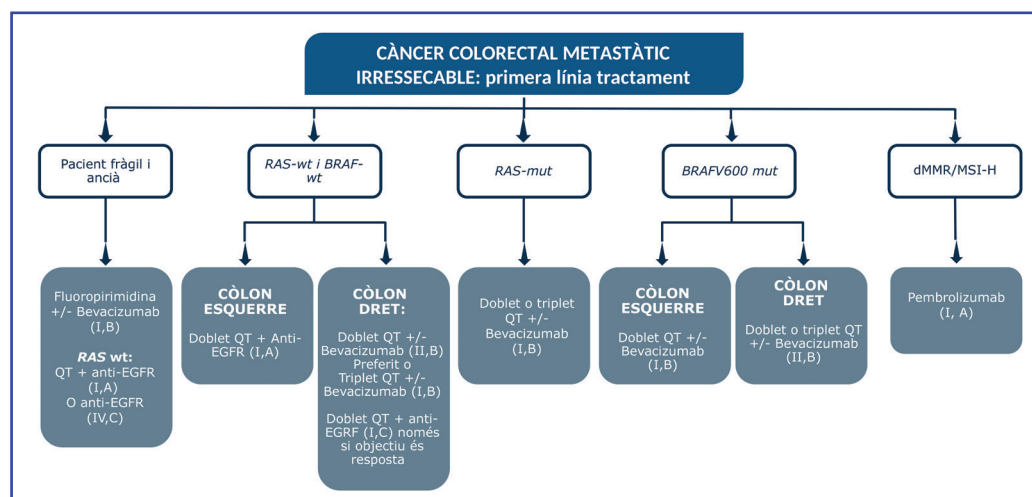


Figura 2: Esquema tractament de primera línia en pacients amb CCRm. Adaptació de l'algorisme de la Societat Europea d'Oncologia Mèdica (47)

Per tal de poder fer una correcta selecció dels pacients candidats a tractament amb anti-EGFR és imprescindible una comprensió i caracterització molecular del CCR, principalment del receptor EGFR i la via de les MAPK (de les signes en anglès “mitogen-activated protein kinases”).

1.4. Diagnòstic molecular per a la selecció de tractament anti-EGFR en CCRm

EGFR és una proteïna tirosina quinasa que es troba a la superfície cel·lular i s'activa mitjançant la unió dels seus lligands específics. La unió del lligand provoca la dimerit-





zació del receptor i la autofosforilació de diversos residus tirosina en el domini c-terminal. Aquesta auto-fosforilació permet l'activació de diverses vies de senyalització, principalment la via de les MAPK i la via PI3K-AKT que finalment envien senyals al nucli cel·lular per a estimular la síntesi d'ADN, la supervivència i la proliferació cel·lular.

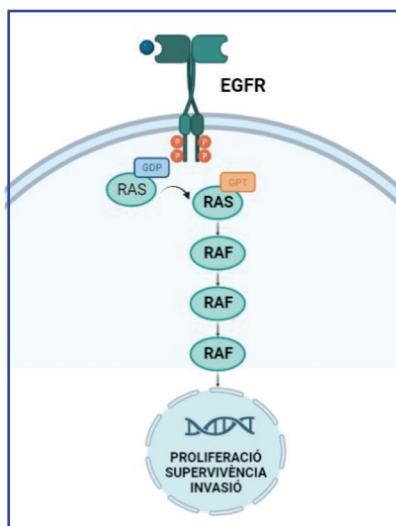


Figura 3: Via molecular MAP cinases

Cetuximab i panitumumab son anticossos monoclonals que s'uneixen al domini extracel·lular d'EGFR inhibint la interacció de lligands i provocant la interiorització i destrucció del receptor. Com a resultat, inhibeixen senyals de supervivència i proliferació mitjançant el bloqueig de la via de senyalització d'EGFR. Cetuximab és un anticòs quimèric de la subclasse IgG1 pel que a més del bloqueig de la via mitjançant la unió a EGFR pot activar el sistema immunitari de l'hoste (citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos i citotoxicitat mediada pel complement) que promouen la destrucció de la cèl·lula tumoral. Panitumumab és un anticòs IgG2 humanitzat pel que el seu paper com a estimulador de l'activació de la immunitat cel·lular dependent d'anticòs és dèbil (48–50). Tot i aquestes diferències, a la pràctica, cetuximab i panitumumab han demostrat la mateixa eficàcia i son fàrmacs clínicament equiparables en el tractament del CCRm (47,51).

Fins a dues terceres parts dels tumors colorectals tindran una alteració en la via de les MAPK convertint-se així en una de les vies de senyalització més rellevant per al pronòstic i predicció de resposta a tractament dels pacients amb CCRm.

RAS

RAS és una proteïna GTPasa que s'activa mitjançant la unió a la membrana citoplasmàtica i la fosforilació, activant així la cascada de senyalització de les MAPK. Quan hi ha una mutació en algun dels oncogens que codifiquen RAS (*KRAS*, *NRAS* o *HRAS*) es produeix un canvi conformacional que provoca que la proteïna RAS es mantingui unida a GTP i per tant provoqui una activació constant de la via de senyalització promovent una activació constitutiva de les senyals de diferenciació, proliferació i invasió cel·lular (52,53).

La família de gens *RAS* és una de les més freqüentment mutades en totes les neoplàsies (54). Els gens *KRAS*, *NRAS* i *HRAS* estan situades al braç curt del cromosoma 12 i presenten mutacions principalment en l'exó 2 (codó 12 i 13), exó 3 (codó 59 i 61) o exó 4 (codó 117 i 146). De fet, al voltant d'un 40-45% dels adenocarcinomes de còlon presenten una mutació en *KRAS*. La primera mutació en descriure's i la més freqüent en càncer de còlon és la de l'exó 2, concretament el canvi d'una guanina per una adenina en el codó 12 (*KRAS*G12D). Menys freqüents són les mutacions de *NRAS* (al voltant d'un 4% dels tumors colorectals) i anecdòtiques les de *HRAS* (menys d'un 1% dels casos) (54–56).

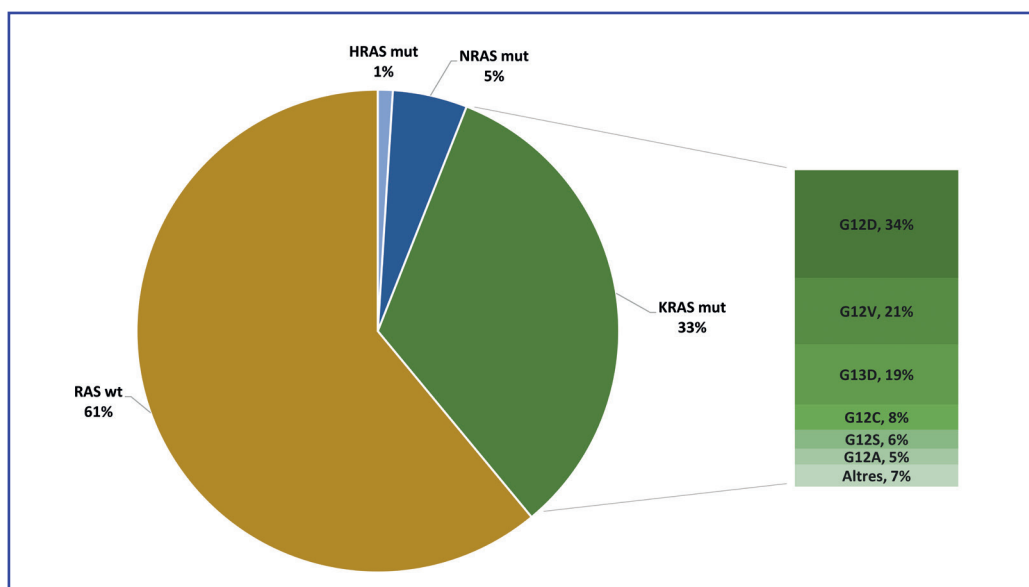


Figura 4: Distribució prevalença mutacions de *RAS* en CCR (Adaptació Patelli et. al (56))



Els primers assajos clínics amb inhibidors d'EGFR en pacients amb CCRm no seleccionats molecularment van demostrar un benefici potencial tot i que discret de cetuximab i panitumumab (57–59).

En els estudis pivotals de primera línia de quimioteràpia amb anti-EGFR ja es va observar que el benefici de cetuximab o panitumumab era superior en els pacients sense mutacions en l'exó 2 de *KRAS*. Així, a l'estudi CRYSTAL amb cetuximab + FOLFIRI en primera línia, afegir cetuximab a la quimioteràpia incrementava la SLP en 1.2 mesos de mediana comparat amb quimioteràpia sola (HR 0.68; $P=0.02$) però sense impacte en SG (60), mentre que a l'estudi PRIME amb panitumumab + FOLFOX afegir panitumumab augmentava la SLP en 2.2 mesos (HR 0.72; $p=0.004$) de mediana amb impacte en SG (61). Posteriorment, anàlisi retrospectius d'aquests assajos clínics han demostrat com l'eficàcia del tractament amb anti-EGFR es limita a aquells pacients amb tumors sense mutacions en els exons 2, 3 o 4 dels gens *KRAS* o *NRAS* (62,63). Els assajos clínics més recents i metanàlisi on s'ha seleccionat els pacients per aquestes mutacions han demostrat que la combinació de quimioteràpia més anti-EGFR en pacient *RAS* "wild type" (wt) obté una resposta de fins al 69% amb una supervivència lliure de progressió mediana d'entre 10 i 13 mesos (51,64–66).

Per tal d'avaluar la millor estratègia de tractament en primera línia en pacients amb CCRm *RAS* wt dos assajos clínics fase III van comparar el doblet de quimioteràpia amb anti-EGFR o amb bevacizumab. L'assaig FIRE-3 va comparar FOLFIRI-bevacizumab amb FOLFIRI-cetuximab en *KRAS* exó 2 wt (67). L'estudi no va observar diferències en l'objectiu primari de taxa de resposta però sí en SG a favor del braç de cetuximab que eren clarament significatives en el subgrup *RAS* wt (mediana SG de 31 vs. 26 mesos en el braç de bevacizumab. HR 0.76 $p=0.012$) (68). L'assaig fase III CALGB/SWOG 80405 també va comparar cetuximab amb bevacizumab en combinació amb doblet de quimioteràpia escollida per l'investigador (FOLFOX o FOLFIRI) en pacients amb CCRm *KRAS* exó 2 wt. Aquí l'objectiu primari era SG i no es van observar diferències entre ambdós braços de tractament (65). Tot i així en un anàlisi exploratori retrospectiu posterior es va observar com l'origen del tumor primari (còlon dret vs. esquerre) tenia un impacte en la resposta a anti-EGFR. Els tumors d'origen esquerre (còlon descendent, sigma i recte) es beneficiaven més de rebre cetuximab mentre que en els tumors d'origen dret (còlon ascendent i trasnvers) era millor el tractament amb bevacizumab (69). Metanàlisi posteriors d'aquests estudis i d'altres amb combi-





nació de quimioteràpia més anti-EGFR o bevacizumab han confirmat que el benefici d'afegir anti-EGFR a la quimioteràpia s'observa en els pacients amb tumors *RAS* wt i origen esquerre (51,70).

Així doncs, les mutacions en *RAS* són marcadors predictius negatius determinants per al tractament anti-EGFR pel que actualment la determinació de l'estatus mutacional de *RAS* previ inici de tractament anti-EGFR és obligatòria en totes les guies nacionals i internacionals de CCR (47,71).

BRAF

Les mutacions en el gen *BRAF* es produeixen en un 8-12% dels casos de CCRm i més del 95% són degudes a la substitució d'una valina per una molècula d'àcid glutàmic en el residu 600 resultant l'anomenada *BRAFV600E* (72,73). Les mutacions *BRAFV600E* representen un fenotip agressiu associat a un mal pronòstic i resistència als règims de quimioteràpia estàndard (74–77). Igual que les mutacions de *RAS*, les mutacions de *BRAFV600E* comporten una activació constitutiva de la via de les MAPK obviant l'efecte de la inhibició d'EGFR per part de cetuximab o panitumumab. Estudis retrospectius han observat com pacients amb tumors amb mutacions en *BRAFV600E* no es beneficien del tractament anti-EGFR (78–80).

Tot i que en alguns casos anecdòtics un mateix tumor pot compartir mutacions en *RAS* i *BRAF* en alguna subclona poc prevalent, a efectes pràctics les mutacions de *RAS* i *BRAF* son mútuament excloents en tumors no prèviament tractats amb anti-EGFR (80,81).

Donat la importància de *BRAF* com a biomarcador pronòstic i predictiu de resposta a anti-EGFR, la Societat Europea d'Oncologia Mèdica (ESMO), la Societat Americana d'Oncologia Mèdica (ASCO) i les directrius de la National Comprehensive Cancer Network recomanen l'avaluació de l'estat de *BRAF* juntament amb el *RAS* en el diagnòstic de la malaltia metastàtica per a la decisió de tractament (47,71,82).

Tot i una correcta selecció clínica i molecular, fins a un 15-20% dels pacients amb CCRm tractats en primera línia amb quimioteràpia + anti-EGFR no es beneficiaran de la teràpia iniciada i requeriran un canvi precoç en el estratègia del tractament (47,71). És per aquest motiu que la recerca de biomarcadors de resposta al tracta-





ment que ens permetin identificar aquells pacients que es beneficiaran de tractament anti-EGFR és de cabdal importància per a millorar la supervivència dels pacients amb CCRm i evitar la toxicitat afegida de mantenir un tractament potencialment fútil.

1.5. Mecanismes de resistència adquirida a anti-EGFR

La eficàcia dels fàrmacs anti-EGFR és limitada en el temps i tots aquells pacients que inicialment responen al tractament acabaran potencialment progressant degut al desenvolupament de mecanismes de resistència adquirida com a fenomen adaptatiu del tumor a la pressió pel tractament.

El bloqueig d'EGFR dona lloc a pressió evolutiva i al creixement de poblacions subclonals de cèl·lules amb mecanismes de resistència que impulsen la progressió del tumor (83–85). Els mecanismes més freqüents pels quals els tumors desenvolupen resistència adquirida a la teràpia anti-EGFR són l'activació de vies de senyalització de bypass (sigui per una mutació en la mateixa via de les MAPK o en altres gens relacionats amb EGFR) i les alteracions en el domini extracel·lular del receptor EGFR (EGFR-ECD de les sigles en anglès “EGFR extracellular domain”).

El mecanisme més comú de la resistència adquirida a inhibidors d'EGFR són les mutacions *RAS* que es detecten fins en un 50% dels pacients a la progressió (86). A diferència de les mutacions de resistència innata que són predominantment en l'exó 2 de *KRAS*, les mutacions de resistència adquirida solen produir-se en els exons 3-4 i fins en dues terceres parts dels casos a *NRAS*.

El genotipat de mostres de pacients i l'ús de models pre-clítics ha permès identificar en els darrers anys diversos mecanismes de resistència adquirida a fàrmacs anti-EGFR més enllà de les mutacions de *RAS*. Al 2012 el nostre grup va identificar per primera vegada una mutació en el domini extracel·lular d'EGFR. Concretament el canvi d'una serina per una arginina en l'aminoàcid 492 (EGFR S492R) que genera un canvi conformacional en el receptor EGFR implicant la unió de cetuximab i provocant la resistència al tractament (87). Aquesta mutació però és exclusiva de la pressió tumoral exercida per cetuximab, doncs el canvi conformacional del receptor afecta un epítip d'unió d'EGFR a cetuximab però no d'unió a panitumumab, de





manera que no impedeix la unió de panitumumab a EGFR ni la seva eficàcia. Posteriorment, i en col·laboració amb altres grups, es van identificar altres mutacions al domini extracel·lular d'EGFR com a causants de resistència a anti-EGFR (88–90).

Estudis amb cohorts de pacients a la progressió a anti-EGFR han establert que entre un 20 i un 40% dels pacients que inicialment responen a cetuximab o panitumumab acaben desenvolupant mutacions d'EGFR-ECD. Aquestes mutacions solen ser sub-clonals i coexisteixen amb altres mutacions de *RAS* (85,89,91,92), remarcant així com el CCR és una malaltia genètica governada per la selecció clonal on les cèl·lules tumorals modifiquen el seu genotip a pressions externes per tal d'obtenir un avantatge adaptatiu i continuar creixent tot i el tractament. En aquestes cohorts de pacients on es va analitzar un número major de pacients, s'ha establert que les mutacions que més freqüentment apareixen durant el tractament amb cetuximab/panitumumab són sis: S492R, S464L, G465R, G465E, V441D, V441G (91). Aquestes 6 mutacions d'EGFR-ECD detectades en biòpsia líquida són les que s'usen per seleccionar pacients en els assajos clínics de re-tractament amb anti-EGFR com el recent publicat assaig CHRONOS (93) o l'assaig clínic CITRIC actualment en reclutament (94).

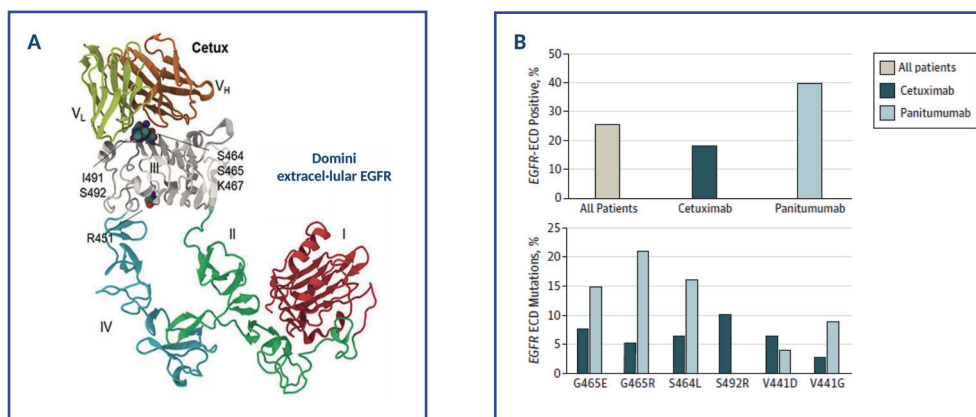


Figura 5 Localització i prevalença de les principals mutacions d'EGFR-ECD. (A) visió general del domini extracel·lular EGFR unit a cetuximab. Quatre subdominis comprenen el domini extracel·lular d'EGFR, el domini III conté les sis mutacions. La mutació R451C es produeix al interfície de contacte amb el domini IV i (B) prevalença de mutacions d'EGFR-ECD a la progressió a tractament amb cetuximab o panitumumab (adaptació de Arena S & Bellosillo B CCR 2015 i Montagut C JAMA 2018 (88,91))





En aquest aspecte de la dinàmica clonal és interessant també observar com les mutacions de *RAS* son les primeres en emergir en la resistència adquirida i les primeres en disminuir quan es retira el fàrmac mentre que les mutacions a EGFR-ECD apareixen de forma més tardana i més subclonal i predominantment en pacients amb major resposta a anti-EGFR (89,95).

L'ús de tècniques de seqüenciació d'alta sensibilitat ens ha permès demostrar que en molts casos les mutacions de *KRAS/NRAS/BRAF* detectades a la mostra tumoral a la progressió a cetuximab ja eren presents en molt baixa freqüència en la mostra tumoral previ inici de tractament (80,85,96,97). El nostre grup ha observat com algunes d'aquestes mutacions pre-existents ho són per sota del llindar de detecció de les tècniques estàndard i que la presència de subclones de *RAS* per sota d'un 5% en la mostra tumoral no son clínicament significatives ni eviten la resposta a anti-EGFR (80).

Tot i que les mutacions d'EGFR-ECD, a diferència de les mutacions *RAS*, només es detecten en pacients com a mecanisme de resistència adquirida (89,91), hi ha algun estudi que ha generat models matemàtics que apunten la hipòtesi que totes les mutacions que es detecten com a adquirides ja hi son de forma basal tot i que en subclones tan minoritàries que la tecnologia actual no pot detectar (90). Una teoria alternativa a la selecció clonal darwiniana que he discutit fins ara i que està establerta com a principal mecanisme de resistència adquirida, és l'anomenada mutabilitat adaptiva, en la que les mutacions de resistència no pre-existirien sinó que es seleccionarien en un estat de hipermutabilitat del tumor secundari a la pressió farmacològica (98).

En una minoria de casos (<5%), la resistència a fàrmacs anti-EGFR pot estar mediada per l'activació de receptors de membrana alternatius com Her2 o MET (81,99–101) o la mutació en segments inferiors de la via de les MAPK com ara mutacions en *BRAF* o en *MEK* tot i que l'evidència en aquestes darreres com a mecanisme de resistència adquirida és limitada i basada en models teòrics o pre-clínic (81,102,103).

D'altra banda, més enllà de la resistència clonal, altres mecanismes de resistència que involucrin el microambient tumoral (sistema immunitari i estroma) s'estan avaluant i segurament juguin un paper clau en la resistència a quimioteràpia i fàrmacs biològics. En aquest sentit, estudis transcriptòmics han demostrat un canvi a fenotip mesenquimal amb augment de transforming growth factor beta (TGF- β) en pacients tractats





amb cetuximab (104). Un altre punt important és que els fàrmacs anti-EGFR en la majoria de casos s'administren en combinació amb quimioteràpia. Caldrà veure el paper de la quimioteràpia en la resistència adquirida i la interacció entre fàrmacs anti-EGFR i quimioteràpia en l'adquisició de resistència adquirida (105).

1.6 Estratègia clínica per al diagnòstic molecular en el CCRm

L'abordatge clínic estàndard per al diagnòstic molecular és l'estudi en teixit tumoral parafinat de les mutacions escollides. Com he comentat, en el cas del CCRm les guies recomanen l'estudi de les mutacions en els gens de *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* a més de l'estudi immunohistoquímic o per PCR dels gens reparadors de l'ADN al diagnòstic, com a marcadors indispensables per poder prendre la millor decisió terapèutica.

La mostra de teixit tumoral per estudi molecular pot provenir des de la cirurgia del tumor primari fins a una biòpsia endoscòpica del tumor primari o d'una de les metàstasi. La majoria dels pacients amb CCR tindran material disponible per a l'estudi de biomarcadors ja bé sigui una mostra de teixit en el moment del diagnòstic de la malaltia metastàtica o de la mostra d'arxiu de la cirurgia del tumor primari en els casos que es tracti d'una recidiva metacrònica d'un tumor inicialment localitzat.

S'ha realitzat múltiples estudis de concordança de l'estat mutacional de *KRAS* entre el teixit primari i les metàstasi. Tot i que alguns estudis inicials apuntaven una discordança superior al 20% de les mutacions de *KRAS* entre diferents biòpsies d'un mateix pacient, anàlisi posteriors amb la inclusió de major número de pacients han demostrat la ampla concordança de les mutacions de *RAS* entre lesions en un mateix pacient (106,107).

Encara que generalment hi ha material disponible per a l'estudi d'alteracions moleculars necessàries per a la decisió de tractament, en algunes ocasions el teixit és escàs, de mala qualitat o prové de mostres d'arxiu d'anys enrere al diagnòstic de les metàstasi. En aquests casos s'ha de plantejar al pacient una nova biòpsia tumoral de la lesió més abordable si és possible amb les molèsties pel pacient i dificultats tècniques que pot comportar.





2. ADN circulant tumoral

L'ADN circulant tumoral (ADNct) són fragments d'ADN alliberats per les cèl·lules tumorals al torrent sanguini o a altres líquids corporals.

Com hem vist en el capítol anterior, la caracterització genòmica tumoral s'avalua mitjançant l'estudi d'ADN i/o ARN obtingut a partir de la biòpsia d'un fragment de teixit del tumor primari o d'una metastasi. Tanmateix, aquest procediment té unes limitacions biològiques i tècniques. En primer lloc, els tumors tenen gran capacitat per evolucionar en resposta a factors endògens i exògens. Així, la composició genètica de les diferents lesions metastàtiques en un mateix pacient pot ser divergent (heterogeneïtat espacial) i l'estrès terapèutic exercit sobre les cèl·lules tumorals pot modificar dinàmicament el paisatge genòmic del tumor (heterogeneïtat temporal) (84). En segon lloc, l'obtenció de teixit tumoral mitjançant biòpsia és un procés invasiu, molest per al pacient, no exempt de complicacions i que requereix de la implicació de diversos professionals mèdics (108). Finalment, i no menys important, en ocasions el material obtingut de la biòpsia és escàs i insuficient per a l'estudi molecular del tumor obligant al pacient i als clínics a repetir el procediment o a establir un pla terapèutic sense la informació completa.

És per aquests motius que la detecció de mutacions en l'ADNct en sang perifèrica s'ha postulat en els últims anys com una alternativa a la biòpsia tumoral clàssica tan en el diagnòstic com en el monitoratge del tractament. L'anomenada "biòpsia líquida" permet la caracterització molecular tumoral mitjançant l'extracció d'una mostra de sang, un procediment mínimament invasiu, senzill i que pot ser repetit al llarg de l'evolució del pacient permetent el genotipat del tumor en temps real.

És important matisar que el concepte "biòpsia líquida" és un terme molt ampli que engloba l'anàlisi molecular en qualsevol fluid biològic d'àcids nucleics (ADNct, ARN circulant tumoral i ARN provinent de plaquetes), estructures subcel·lulars (especialment exosomes) i cèl·lules tumorals circulants (109–111). Així, és també biòpsia líquida l'estudi molecular en qualsevol fluid del cos ja sigui la sang, el líquid cefaloraquídi, líquid pleural, líquid peritoneal, saliva o orina. Tot i així s'acostuma a utilitzar el concepte biòpsia líquida com a sinònim de detecció d'ADNct en sang perifèrica ja que és el camp on la biòpsia líquida ha estat més estudiada i on s'estan desen-





volupant els principals assajos clínics. En aquesta tesi, d'ara en endavant, quan ens referim a biòpsia líquida ho farem també com a sinònim d'ADNct en plasma.

2.1. Característiques generals de l'ADN circulant tumoral

La presència de fragments d'ADN circulant (ADNc) a la sang d'individus sans va ser descrita per primera vegada l'any 1948 per Mandel i Metais (112). Uns anys més tard, al 1965, Bendich et al. va plantejar la hipòtesi que la circulació per la sang d'ADN "tumorigènic" podia ser la causa de la disseminació metastàtica dels tumors (113). Dotze anys després, Leon et al. van demostrar que els nivells d'ADNc eren més alts en pacients amb càncer que en subjectes sans, especialment en aquells amb malaltia metastàtica (114), però no va ser fins al 1989 quan el desenvolupament tècnic va permetre la demostració experimental de la presència d'ADN tumoral en el plasma dels pacients amb càncer (115). Posteriorment, i ja als anys 90, es va poder descriure per primera vegada la presència de mutacions oncogèniques en ADNct mitjançant tècniques de PCR al·lel-específiques, concretament mutacions de *RAS* en pacients amb càncer de pàncrees i leucèmia mieloide aguda (116,117). En els pacients amb càncer de pàncrees es va demostrar que les mutacions de *KRAS* que es trobaven en sang perifèrica eren les mateixes que en teixit tumoral per a cada un dels pacients estudiats, verificant així que aquells fragments d'ADN provenien del tumor i que la detecció d'ADNct podia convertir-se en un nou biomarcador en càncer.

Des d'aleshores, els treballs per al diagnòstic d'ADNct i les seves potencials aplicacions clíniques s'han anat succeint permetent no només el diagnòstic de mutacions puntuals sinó també la detecció d'altres alteracions genòmiques com ara insercions o delecions en oncogens, fusions, alteracions del nombre de còpies o canvis epigenètics.

Tot i que el mecanisme pel qual les cèl·lules alliberen ADNc a la sang perifèrica no és conegut del tot, es considera que és majoritàriament per mecanisme d'apoptosi i necrosi cel·lular i possiblement també per secessió activa de les cèl·lules (118–120). La longitud de l'ADNc és d'uns 180 parells de bases (pb), amb un pic als 166pb que correspon a la longitud de l'ADN embolcallat al voltant d'un nucleosoma (147pb aproximadament) més l'ADN enllaçador associat a la histona H1. Aquesta característica fragmentació ha potenciat la teoria de l'apoptosi en



l'origen de l'ADNc (119–121). Estudis posteriors han demostrat que la longitud de l'ADNct és lleugerament inferior a la del ADNc que no prové d'origen tumoral (122). La diferenciació de l'ADNct respecte l'ADNc d'origen no tumoral mitjançant la longitud dels fragments d'ADN s'anomena fragmentòmica i també és una de les eines que es pot utilitzar en la detecció de l'ADNct.

La vida mitjana de l'ADNct en sang perifèrica és al voltant de dues hores motiu pel qual l'estudi del ADNct es considera un anàlisi molecular tumoral “en temps real” (123).

2.2 Mètodes per a la detecció de l'ADN circulant tumoral

Com ja he descrit, no tot l'ADN que detectem en sang perifèrica és d'origen tumoral. Al contrari, es calcula que menys de l'1% de l'ADN prové del tumor i que majoritàriament detectarem ADN alliberat per cèl·lules sanes (123–125). Tot i que aquest percentatge pot augmentar en funció de l'estadiatge tumoral i el tipus de tumor (126), és molt important disposar de tècniques amb suficient sensibilitat per poder detectar el petit percentatge de molècules d'ADN provinents del tumor. D'altra banda, l'augment d'alteracions genètiques clínicament accionables han fet que el panell molecular necessari per a l'estudi de biomarcadors en cada tipus tumoral sigui cada vegada més ampli i de major implicació en el pronòstic i tractament del pacient.

L'estudi d'ADNct pot variar des de l'anàlisi de mutacions diana en un gen concret fins a la seqüenciació de tot el genoma. En conjunt, les tècniques de detecció d'ADNct es poden dividir en dues categories: (a) mètodes basats en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) que es centren en la recerca de mutacions puntuals en una seqüència específica d'ADN i (b) mètodes que permeten detectar múltiples alteracions en diverses regions de l'ADN. Aquests darrers són els anomenats tècniques de seqüenciació de nova generació (NGS de les signes en anglès “next-generation sequencing”).

2.2.1 PCR digital

Les tècniques de PCR al·lel específiques es basen en la detecció de mutacions puntuals conegudes utilitzant encebadors (o “primers” en anglès) que són com-





plementaris a la seqüència mutada que es vol analitzar. Aquesta és la base de les tècniques clàssiques com el Sanger o la piroseqüenciació que estem acostumats a utilitzar en teixit per a la detecció, per exemple, de mutacions en els exons 2,3,4 de *RAS* o en *BRAFV600E*. Aquestes tècniques tenen una sensibilitat de detecció d'aproximadament el 5%, llindar completament insuficient per a l'estudi en biòpsia líquida.

Per tal de poder augmentar la sensibilitat, les tècniques de PCR digital (PCRd) fraccionen l'ADN per obtenir molècules individuals que s'analitzen de manera independent en diferents compartiments (pous, gotes o cambres segons la modalitat de PCRd utilitzada). Així, no és fins després d'aïllar cada molècula d'ADNc d'una mostra en un compartiment que no s'inicia l'amplificació per PCR. Posteriorment, s'afegeixen sondes fluorescents etiquetades específicament per a la seqüència "wild type" (wt) o per a la mutació puntual a estudi que s'hibridaran amb l'ADN amplificat en cada un dels compartiments. Finalment, es fa la lectura per citometria de flux que detecta les diferents fluorescències permetent quantificar així la quantitat d'ADN mutat en comparació al ADN wt de cada mostra.

Les dues tècniques de PCRd més utilitzades són la "droplet digital PCR (ddPCR)" (127,128) i el beads, emulsion, amplification and magnetics (BEAMing) (129,130).

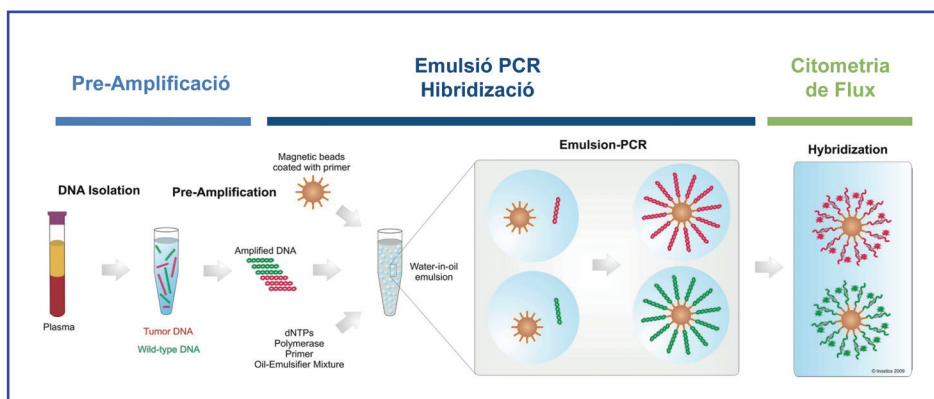


Figura 6: Esquema gràfic del funcionament de la tècnica de PCRd BEAMing: "beads, emulsion, amplification and magnetics"

Ambdues tècniques es caracteritzen per requerir poca quantitat d'ADN per a





l'anàlisi i obtenir una sensibilitat de detecció fins al 0.01% (és a dir la capacitat de detectar una molècula mutada entre 1000 seqüències wt) cosa que les converteix en tècniques òptimes per a la detecció de mutacions puntuals en ADNct. A més, la lectura de resultats és directa i relativament senzilla i no requereix d'anàlisi de dades previ. La principal limitació d'aquestes tècniques és que només poden detectar una única mutació o un nombre molt limitat de mutacions per mostra analitzada i que només podrem interrogar aquelles mutacions concretes i prèviament conegudes per les que haguem dissenyat el "primer".

2.2.2 Seqüenciació de Nova Generació (Next Generation Sequencing, NGS)

Les tècniques de seqüenciació de nova generació (NGS) es basen en l'anàlisi en paral·lel de milions de petites seqüències de molècules d'ADN i la seva comparació amb seqüències de referència permetent així la detecció de múltiples alteracions genètiques en una sola mostra. Aquest procediment es du a terme en quatre passos fonamentals: la preparació de llibreries, la amplificació (que pot ser basada en amplicons o en captura), la seqüenciació i l'anàlisi bioinformàtic de resultats (131–133). Les regions a estudi poden variar des de la seqüenciació de fragments d'exons determinats fins a l'estudi de tot l'exoma (134).

Una de les principals avantatges de les tècniques de NGS és el genotipat tumoral sense necessitat de disposar d'informació molecular sobre el tumor primari. Segons els objectius clínics i la inversió prevista, es poden triar panells dissenyats específicament per a cada subtipus tumoral amb la cobertura dels principals gens implicats o bé utilitzar plataformes més àmplies que interroguin la majoria d'oncogens independentment de l'origen del tumor a estudi.

En augmentar la cobertura genòmica a estudi disminueix la sensibilitat de la tècnica. Inicialment les plataformes de NGS tenien una taxa d'error de seqüenciació d'entre el 0,1 i l'1% (135) fet limitant per a la detecció de mutacions poc freqüents en l'ADNc. Aquesta potencial limitació s'ha revertit mitjançant (a) la extracció de major volum de plasma per pacient per a poder disposar de majors quantitats d'ADNc (entre 20-50ng segons les tècniques), (b) la introducció de codis de barres i identificadors moleculars únics en la preparació de les llibreries i (c) l'anàlisi bioinformàtic post-seqüenciació (136).





Els identificadors moleculars únics o UMI de les sigles en anglès són molècules inicials d'ADN amb 10-12 bases aleatòries que s'uneixen a cada seqüència a estudi permetent que cada codi de barres s'amplifiqui i seqüenciï juntament amb cada molècula d'ADN. Així, si trobem una alteració que està present en totes les seqüències d'una regió genòmica amb el mateix UMI es considerarà una alteració real, mentre que si només es troba en alguna de les seqüències amplificades es considerarà un error de seqüenciació (137,138). A més a més, en la preparació de les llibreries es poden afegir codis de barres d'identificació específics per a cada pacient per permetre analitzar de forma conjunta mostres de diferents pacients.

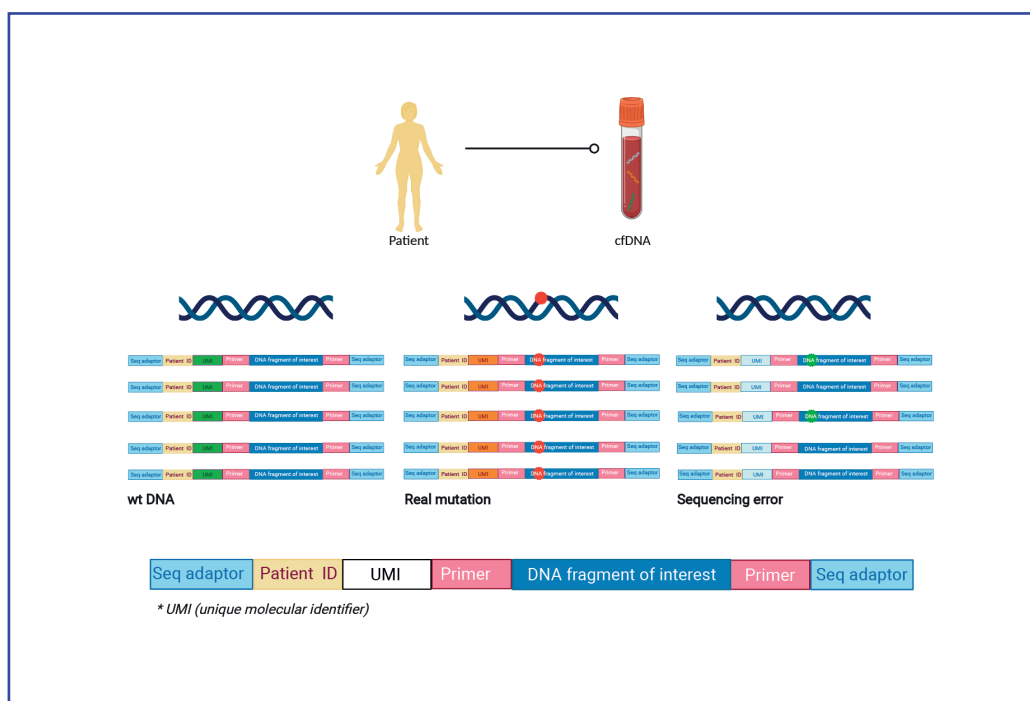


Figura 7: Preparació de llibreries de seqüenciació d'ADNc mitjançant codis de barres ID i identificadors moleculars únics (UMI) (139)

A banda de la sensibilitat, un altre repte per a les plataformes de NGS amb gran cobertura genòmica és el procés conegut com a hematopoiesi clonal (HC). Els individus sans, amb l'edat, adquireixen noves mutacions somàtiques a les cèl·lu-





les hematopoètiques que quan es lisen poden alliberar l'ADNc (140). Això es pot interpretar incorrectament com a mutacions que provenen del tumor obtenint així un fals resultat positiu. El millor abordatge per a diferenciar l'ADN provinent de cèl·lules tumorals del que s'origina en les cèl·lules hematopoietiques és seqüenciar la fracció de leucòcits per tal de discriminar l'origen de la mutació detectada en l'ADNc (141). Aquest aspecte és de màxima rellevància en la detecció de malaltia mínima residual (MMR) i en el cribratge del càncer, situacions clíniques en que la presència de ADNct és mínima i un resultat fals positiu pot tenir conseqüències determinants pel pacient (142).

Amb la progressiva milloria tecnològica s'estan implementant noves estratègies per augmentar la sensibilitat del diagnòstic d'ADNct, cosa imprescindible en els casos on el volum total de ADNct és particularment baix. Així algunes plataformes de NGS inclouen no només l'estudi genòmic sinó també el perfil de patrons de metilació i el perfil de fragmentació diferencial mitjançant el posicionament nucleosomal. Els patrons de metilació que inhibeixen l'expressió gènica estan relacionats amb el teixit al qual pertanyen originalment i, per tant, reflecteixen l'origen de l'ADNc (143,144). Quan un gen és metilat, ho fa en diverses posicions del promotor, augmentant així l'oportunitat de detectar aquestes regions i per tant la sensibilitat de la tècnica. Pel que fa a la fragmentació, com ja hem comentat, els punts de tall de fragmentació de l'ADNc no són aleatoris i són diferents per a l'ADNct en comparació amb l'ADNc de cèl·lules normals. Si bé encara s'estan investigant els mecanismes d'aquest patró de fragmentació diferent, ajuda a caracteritzar si l'ADNc és d'origen tumoral o no (122).

Tal com hem vist, la ràpida evolució de la tecnologia fa que en pocs anys haguem passat de detectar mutacions puntuals en gens determinats fins a la seqüenciació de fragments llargs del genoma, la detecció de metilacions i la fragmentòmica. Aquest canvi dramàtic ha permès millorar la sensibilitat de detecció de l'ADNct i fins i tot poder realitzar els estudis moleculars directament en la biòpsia líquida evitant l'anàlisi inicial del teixit. Això implica la necessitat d'un anàlisi bioinformàtic acurat post-seqüenciació per detectar falsos negatius cosa que n'augmenta la complexitat d'anàlisi, els costos i el temps a l'obtenció de resultats.



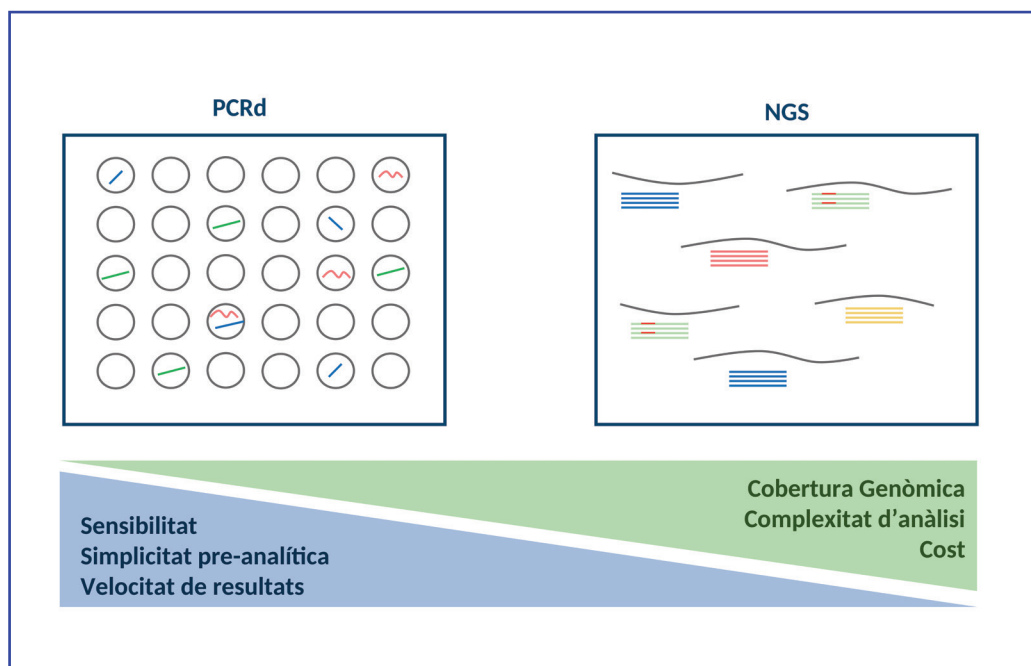


Figura 8: Anàlisi de l'ADNct mitjançant tècniques de PCRd o NGS: principals diferències i fortaleces de cada tècnica

2.2.3. Estratègies per la detecció de l'ADNct: informat per tumor versus tumor-agnòstic

Actualment podem abordar l'estudi de l'ADNct mitjançant dues perspectives diferents: la primera és l'anàlisi inicial de les principals mutacions en teixit i el posterior estudi de les mateixes en sang perifèrica (informat per tumor o en anglès tissue-informed). La segona estratègia emprada per la detecció de l'ADNct és l'estudi directe de l'ADNct sense necessitat d'interrogar prèviament el tumor. Aquest segon abordatge es coneix com a "tumor-agnòstic". La taula 1 revisa les característiques principals de cada un dels dos abordatges.





Característiques detecció ADNct	Informat per tumor	Tumor agnòstic
Precisa anàlisi de teixit	Sí	No
Anàlisi previ d'alteracions moleculars	Sí	No
Alteracions detectable	Genòmiques	Genòmiques i epigenòmiques
Alteracions moleculars a estudi en una única mostra	Limitades	Múltiples
Aproximació tècnica	PCRd	NGS
Llindar detecció mutacions	0.01%	0.1%
Temps a resultats	4-6 setmanes	7-10 dies
Sensibilitat en malaltia metastàtica	Molt elevada	Molt elevada
Sensibilitat en detecció MMR	Molt elevada	Elevada
Sensibilitat en monitoratge	Elevada	Elevada
Test comercial disponible	Sí	Sí
Acceptat per presa de decisions pràctica clínica	Estadi IV	Estadi IV

Taula 1: Principals característiques de la detecció d'ADNct segons si l'abordatge utilitzat és informat per tumor (tumor informed) o sense utilitzar teixit tumoral (tumor agnostic)

2.2.4 Quantificació de les mutacions en ADNtc

L'anàlisi d'ADNct no ens informa només de la presència o no de mutacions detectades en sang perifèrica sinó que ens permet també una descripció quantitativa de les mateixes. Així podem saber el percentatge de molècules d'ADN detectades amb una mutació respecte al nombre de molècules wt per la mateixa. Això es coneix com a freqüència al·lèlica mutada o MAF de les sigles en anglès.

En els darrers anys s'ha adoptat el concepte de mutació troncal per definir aquella mutació somàtica amb la MAF més elevada present de cada mostra estudiada i de MAF relativa (MAFr) com la freqüència d'una mutació somàtica determinada en relació a la mutació troncal(145).

Com que la quantitat d'ADNct que es troba en cada pacient pot ser variable dependent de l'estadiatge, la localització de les metàstasi o els tractaments sistèmics rebuts, els conceptes de mutació troncal o MAFr ens permeten definir millor la





proporció de mutacions existents en cada pacient i la seva variació durant l'evolució de la malaltia.

2.3 Aplicacions clíniques de l'ADN circulant tumoral en el càncer colorectal

En els darrers 15 anys la possibilitat d'estudiar el genotip tumoral mitjançant una extracció de sang ha generat un interès creixent en la comunitat científica donat el potencial impacte en el pronòstic i tractament dels pacients amb càncer. Així, s'han anat succeint estudis que demostren la utilitat de la biòpsia líquida per al diagnòstic molecular, el monitoratge de resposta a tractament, l'aparició de resistència a les teràpies dirigides i la detecció de malaltia mínima residual (MMR).

En el decurs del desenvolupament d'aquesta tesi hem viscut una revolució en l'estudi de l'ADNct. Des de treballs preliminars de detecció de mutacions puntuals en plasma de pacients amb càncer metastàtic, fins al desenvolupament i publicació dels primers assajos clínics d'elecció de quimioteràpia adjuvant basat en la detecció de MMR. Això ha anat de la mà d'una constant evolució de les tècniques de detecció d'ADNct, cada vegada més complexes i amb major sensibilitat.

A la figura 9 exposo les principals aplicacions de l'estudi de l'ADNct en el CCR.



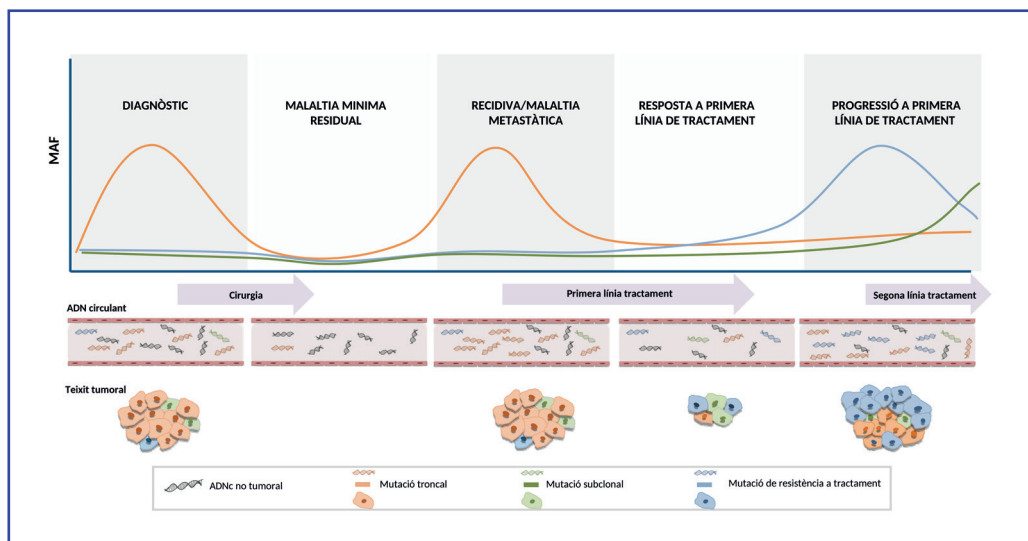


Figura 9: Principals aplicacions clíniques de la biòpsia líquida (adaptació Vidal J Cancer & Chemotherapy Reviews 2017 (146))

2.3.1. Diagnòstic molecular en càncer colorectal metastàtic

El “gold standard” per a l’estudi de biomarcadors moleculars en càncer és l’estudi de mutacions en teixit tumoral. Un dels primers passos necessaris per a la implementació de la biòpsia líquida com a eina diagnòstica era demostrar la capacitat de l’ADNct en la caracterització molecular del tumor en pacients amb càncer metastàtic.

Així, els primers estudis es van centrar en la concordança de detecció de mutacions somàtiques entre el teixit tumoral i l’ADNc plasmàtic. Un dels treballs seminals va ser el publicat a 2014 per Bettegowda i col·laboradors on es va estudiar la viabilitat de la biòpsia líquida mitjançant la correlació entre les mutacions detectades en teixit tumoral i plasma (126). Els autors van utilitzar tècniques de PCRd per a detectar en plasma la mutació principal en teixit de cada un dels tumors analitzats. Així van descriure com la taxa de concordança d’ADNct i teixit depenia del tipus de tumor (superior en càncer colorectal i gastro-esofàgic per exemple i inferior en tiroides i gliomes) i de l’estadiatge tumoral (superior en tumors metastàtics comparat amb estadis inicials).



En CCRm els primers estudis de genotipat en biòpsia líquida van ser també utilitzant assajos basats en PCR per detectar mutacions puntuals en *KRAS* i *BRAF* per a seleccionar pacients tributaris a rebre tractament amb fàrmacs anti-EGFR (147). Després d'aquests primers treballs de prova de concepte, els estudis per a validar la utilització de la biòpsia líquida per a la caracterització de l'estat mutacional de *RAS* i *BRAF* en pacients amb CCRm s'han anat succeint.

Des d'aquest abordatge inicial, es van desenvolupar tests basats en PCRd que recollien un panell limitat per a la detecció de les mutacions més prevalents. Així en CCRm es va comercialitzar el test OncoBEAM™ RAS CRC (Sysmex Innostics) que permetia la detecció de 34 mutacions puntuals en els exons 2, 3, i 4 en els gens de *KRAS* i *NRAS*. Paral·lelament es va comercialitzar Idylla (Biocartis) per la detecció de mutacions puntuals de *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* mitjançant PCRd. En els darrers anys, el diagnòstic molecular ha evolucionat cap a proves comercials basades en panells de NGS que estudien regions més àmplies dels gens d'interès permetent així ampliar el genotipat tumoral. Tot i així, el concepte clau de la biòpsia líquida en aquest escenari clínic és el mateix: obtenir un diagnòstic ràpid, fiable i no invasiu de les principals mutacions que determinen el pronòstic i tractament dels pacients amb CCRm i que ens permetin prendre decisions clíniques amb la mateixa fiabilitat que quan utilitzem l'estudi del teixit tumoral.

2.3.2. Avaluació de resposta al tractament en càncer colorectal metastàtic

Actualment l'avaluació de la resposta al tractament sistèmic en pacients amb CCRm es realitza mitjançant tècniques d'imatge com el TC i l'aplicació dels criteris RECIST 1.1. Aquesta informació es complementa amb marcadors serològics com el CEA o el CA19.9. Ambdues tècniques tenen les seves limitacions. La primera és que la primera avaluació radiològica generalment no es fa fins a dos o tres mesos després d'haver iniciat tractament. La segona és que la interpretació de les proves d'imatge és dependent de l'avaluador i que el sistema RECIST 1.1 només té en compte canvis en els diàmetres tumorals de les lesions diana (148). La tercera és que els biomarcadors serològics com el CEA són inespecífics i que a més no són avaluables entre un 20 i un 40% dels pacients amb CCRm (149,150).





Així doncs, una utilitat clínica potencial de la biòpsia líquida és l'avaluació tumoral de la resposta al tractament mitjançant el monitoratge de l'ADNct. En aquest sentit, el grup australià liderat per Tie i col·laboradors van publicar un dels primers estudis en una petita cohort de pacients amb CCRm on van observar que la reducció en la concentració d'ADNct es correlacionava amb resposta radiològica al tractament amb quimioteràpia (151). Aquest estudi analitzava inicialment les mutacions somàtiques en teixit i després monitorava la concentració en plasma de la mutació més prevalent mitjançant tècniques de PCRD. Tot i obtenir bona relació en la previsió de la resposta, no es van observar correlació entre els canvis en ADNct i la SLP.

En els darrers anys s'han publicat diversos estudis que suggereixen que la variació dels nivells d'ADNc dins d'un pacient individual es correlaciona amb la càrrega tumoral al llarg del temps (152,153). Aquests treballs utilitzen tècniques de PCRD per a monitorar la resposta a quimioteràpia de pacients amb CCRm. Tot i dades prometedores, aquests estudis utilitzen cohorts de pacients que reben tractaments poc homogenis i proposen diferents moments i punts de tall de disminució de l'ADNct per a predir resposta.

Un grup d'experts mundial en biòpsia líquida i CCR ha determinat que l'assaig d'ADNct ideal per a la detecció de resposta al tractament hauria de tenir un alt nivell de sensibilitat, un temps de resposta ràpid i uns resultats fiables (154). A més, l'assaig d'ADNc ideal hauria d'incloure un panell de múltiples gens que permeti una seqüenciació d'alta profunditat per tal de poder detectar l'ADNc en la majoria dels pacients amb CCRm i l'aparició de mecanismes de resistència adquirida a teràpies dirigides. L'assaig s'hauria de realitzar abans de l'inici del tractament sistèmic i poc després de començar el tractament per tal de guiar la determinació precoç de la resposta clínica.

Així, tot i els estudis publicats, encara hi ha molts aspectes a determinar en la utilització de la biòpsia líquida com a eina de valoració de resposta al tractament de primera línia en pacients amb CCRm. Qüestions com quins criteris s'han de seguir per determinar resposta, quin és el millor moment clínic per a la valoració precoç de resposta i quina és la metodologia òptima per a la quantificació de





l'ADNct, encara no estan resoltes. Anant un pas més enllà, també s'ha de demostrar la utilitat de la valoració molecular de resposta mitjançant ADNct. Per a poder implementar a la pràctica clínica la biòpsia líquida per l'avaluació precoç de resposta, serà imprescindible demostrar la utilitat clínica mitjançant estudis que demostrin si canviar el tractament quan s'observi una progressió molecular genera un impacte en supervivència comparat en fer-ho a la progressió radiològica o viceversa, si la resposta precoç per biòpsia líquida ens permetrà desescalar el tractament sistèmic sense impactar la supervivència.

2.3.3. Monitoratge de l'evolució clonal i resistència al tractament

Com he revisat prèviament, una de les principals limitacions de l'eficàcia del tractament sistèmic en pacients amb CCRm és el desenvolupament de mecanismes de resistència adquirida. Això ha estat àmpliament estudiat en el cas dels pacients que reben tractament amb anti-EGFR i l'emergència de mutacions a la via de les MAP quinases (predominantment mutacions de *RAS*) i en EGFR-ECD (85–88). A més a més, tot i la selecció inicial de pacients candidats a tractament anti-EGFR per biomarcadors de *RAS/BRAF*, la resposta individual serà diversa, i mentre alguns pacients amb CCRm experimenten gran benefici clínic del tractament amb cetuximab o panitumab altres progressaran en pocs mesos.

Estudis previs de petites cohorts de pacients realitzats pel nostre grup i altres han demostrat com l'ADNct pot estudiar la dinàmica clonal tumoral en temps real en pacients tractats amb fàrmacs anti-EGFR i identificar l'emergència de mecanismes de resistència adquirida (88,89,155,156). Anàlisi seriats de plasma de pacients han observat com les mutacions de *RAS* emergeixen de forma més precoç durant el bloqueig d'EGFR mentre que les mutacions en el domini extracel·lular d'EGFR no apareixen fins més endavant en el decurs del tractament (89,95).

Així doncs el potencial teòric de la biòpsia líquida és el de poder detectar la resistència adquirida al tractament anti-EGFR abans que la progressió tumoral pugui ser evidenciada per les proves clàssiques d'imatge i així mantenir el tractament només en aquell subgrup de pacients en que sigui eficaç. Aquests estudis permeten conèixer l'evolució clonal i poder dissenyar millors estratègies de tractament, però cal encara demostrar la utilitat clínica de la monitorització clonal de resistència al tractament dirigit.





2.3.4. Detecció de malaltia mínima residual (MMR) en càncer colorectal localitzat

La MMR es defineix com la presència d'ADNct després d'un tractament amb intenció curativa (clàssicament cirurgia) en pacients amb malaltia localitzada. La detecció de MMR s'ha associat amb un elevat risc de recurrència en diferents tipus tumors (157–159). En càncer de còlon diversos estudis observacionals han demostrat de forma unànime que la determinació d'ADNct a la sang dels pacients després de la cirurgia en estadis I-III s'associa amb elevat risc de recurrència. En aquest sentit, la presència d'ADNct es detecta en 10-25% de pacients estadi I-III després de la cirurgia i és el factor pronòstic independent més potent de recaiguda amb HR que oscil·len entre 3 i 18 segons l'estudi. A més, la persistència d'ADNct després de rebre quimioteràpia adjuvant augmenta encara més el risc de desenvolupar metàstasi durant el seguiment (160–164).

L'any 2022 es va publicar l'estudi DYNAMIC-II, el primer assaig clínic en pacients amb càncer de còlon estadi II i decisió de tractament adjuvant basat en biòpsia líquida (165). Els pacients es van randomitzar 2:1 a rebre tractament adjuvant segons paràmetres histopatològics o segons resultat de la biòpsia líquida. En el grup de tractament informat per biòpsia líquida els pacients amb ADNct post-quirúrgic positiu rebien tractament amb quimioteràpia i els que tenien ADNct negatiu iniciaven seguiment. L'objectiu primari era de SLR a 2 anys i es va assolir la no inferioritat en la presa de decisions per biòpsia líquida comparat amb el grup estàndard on l'oncòleg prenia la decisió segons criteris clínic-patològics. A més es va demostrar que els pacients del grup basat en ADNct rebien menys tractament amb quimioteràpia comparat amb el grup estàndard (15% vs. 28% respectivament). Així doncs, en el cas del càncer de còlon estadi II es podria evitar l'ús de quimioteràpia adjuvant en quasi la meitat dels pacients si utilitzem la biòpsia líquida per a la detecció de MMR.

En càncer de recte, tres estudis retrospectius de prova de concepte han explorat la detecció de MMR en pacients tractats amb QRT neoadjuvant seguit de cirurgia i la seva associació amb RCp i risc de recurrència (166–168). En ells s'extreien mostres de sang previ a l'inici de tractament, després de la QRT i després de la cirurgia i analitzaven l'ADNct mitjançant detecció amb PCRd de mutacions troncal detectades a teixit. Es va observar un major risc de recaiguda en aquells pacients amb ADNct després de la QRT però no es va trobar cap correlació entre l'ADNct preoperatori i





la taxa de RCp. Així doncs, en aquests dos estudis es confirma el paper pronòstic de la detecció de MMR en biòpsia líquida però no la seva associació amb la resposta al tractament neoadjuvant.

Estudi	N	Tractament neoadjuvant	Assaig ADNct	ADNct basal (%)	ADNct post QRT (%)	ADNct post-cirurgia (%)	ADNct + vs. ADNct - post QRT	ADNct + vs. ADNct - post-cirurgia
Tie et al.	159	QRT x 5 setmanes	Safe-SeqS™ (1 variant;15 gens)	77%	8.3%	12%	SLR: HR 6.6 (95% CI, 2.6-17) P <0.001	SLR: HR 13 (95% CI, 5.5-31) P <0.001
Khakoo et al.	47	QRT x 5 setmanes	PCRD customitzada (fins a 3 variants; 6 gens)	74%	21%	13%	SLM: 7.1 (95% CI, 2.4-21.5) P<0.001	SLM: 39.9 (95% CI, 4.0-399.5) P= 0.002
Zhou et al.	104	QRT x 5 setmanes	HiSeq 3000 illumina™ (1021 gens)	75%	10.5%	6.7%	SLM:19.82 (95% CI, 2.03-193.7) P<0.001	SLM: 25.30 (95% CI, 1.475-434) P<0.001
Murahashi et al.	85	QRT x 5 setmanes	Oncomine™ colon cfDNA (14 gens)	57.6%	22.3%	NA	SLR: 17.1 (95% CI, 1.0-282) P<0.001	NA

Taula 2: Principals assajos clínics de detecció de malaltia mínima residual en càncer de recte (166–169)

Com he mencionat prèviament, l'abordatge dels pacients amb càncer de recte està canviant i el tractament neoadjuvant total (TNT) és un nou estàndard en els pacients amb CRLA. A més a més, s'està començant a explorar l'estratègia de preservació d'òrgan entre aquells pacients amb resposta completa al tractament neoadjuvant. L'aplicació de la biòpsia líquida com a biomarcador de resposta al TNT i el seu paper en la selecció de pacients per a un abordatge no quirúrgic del tumor després de la neoadjuvència no han estat explorats fins a dia d'avui.







La biòpsia líquida mitjançant la quantificació i genotipat de l'ADN circulant tumoral pot ser d'utilitat clínica en el diagnòstic i tractament dels pacients amb càncer colorectal.





• OBJECTIUS GENERALS





- 1.** Caracteritzar la utilitat clínica de l'ADNct en el diagnòstic molecular i monitoratge de resistència al tractament en pacients amb càncer colorectal metastàtic
- 2.** Caracteritzar la utilitat clínica de l'ADNct per l'avaluació de resposta precoç a la primera línia de quimioteràpia més anti-EGFR en pacients amb càncer colorectal metastàtic
- 3.** Caracteritzar la utilitat clínica de l'ADNct per la detecció de malaltia mínima residual en pacients amb càncer de recte localment avançat tractats amb tractament neoadjuvant total





• OBJECTIUS ESPECÍFICS





1. Caracteritzar la utilitat clínica de l'ADNct en el diagnòstic molecular i monitoratge de resistència al tractament en pacients amb càncer colorectal metastàtic mitjançant:

- 1.1.** l' anàlisi de la concordança de la detecció de mutacions de *RAS* en teixit i de *RAS* en ADNct per a la selecció de tractament amb fàrmacs anti-EGFR
- 1.2.** el monitoratge de les mutacions de *RAS* en ADNct per avaluar la resposta al tractament sistèmic amb quimioteràpia +/- tractament antiangiogènic
- 1.3.** la detecció de mutacions de *RAS* en ADNct com a mecanisme de resistència adquirida a tractament amb fàrmacs anti-EGFR

2. Caracteritzar la utilitat clínica de l'ADNct per l'avaluació de resposta precoç a la primera línia de quimioteràpia més anti-EGFR en pacients amb càncer colorectal metastàtic mitjançant:

- 2.1.** la quantificació i genotipat per NGS i PCRd de mostres de plasma previ a l'inici de tractament i després de dos cicles de tractament amb quimioteràpia + fàrmac anti-EGFR
- 2.2.** la correlació entre la dinàmica de les mutacions troncal en ADNct i la resposta al tractament
- 2.3.** la correlació entre la dinàmica de les mutacions de resistència a anti-EGFR i la resposta al tractament

3. Caracteritzar la utilitat clínica de l'ADNct per la detecció de malaltia mínima residual en pacients amb càncer de recte localment avançat tractats amb tractament neoadjuvant total mitjançant:

- 3.1.** la correlació de l'ADNct basal i post tractament neoadjuvant en la predicció de la resposta completa patològica
- 3.2.** la correlació de l'ADNct basal i post tractament neoadjuvant en la predicció de la supervivència lliure de progressió i la supervivència global
- 3.3.** la correlació de l'ADNct amb la localització metastàtica a la recidiva





• ARTICLES ORIGINALS





ARTICLE 1: Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients

Autors: J Vidal, L Muínelo, A Dalmases, F Jones, D Edelstein, M Iglesias, M. Orri-
llo, A Abalo , C Rodríguez, E Brozos, Y Vidal, S Candamio, F Vázquez, J Ruiz, M
Martin, M Guix, L Visa, V Sikri, J Albanell, B Bellosillo, R López, C Montagut

Annals of Oncology, 2017; 28 (6), 1325-1332





RESUM

Antecedents: en pacients amb CCRm l'avaluació de l'estat mutacional de *RAS* és necessària per a establir el tractament sistèmic. En pràctica clínica es realitza l'anàlisi de *RAS* en teixit tumoral, però el genotipat de l'ADNct ofereix un mètode mínimament invasiu que representa l'heterogeneïtat tumoral. Aquest estudi té com a objectiu avaluar l'ús del genotipat de *RAS* en ADNct en pràctica clínica i determinar el paper del monitoratge mitjançant biòpsia líquida durant el tractament sistèmic.

Pacients i mètodes: el genotipat de *RAS* en plasma es va avaluar en una cohort de pacients amb CCRm mitjançant la plataforma de PCRd OncoBEAM™ *RAS* CRC. La concordança dels resultats en plasma i teixit es van avaluar retrospectivament. Es va realitzar un monitoratge prospectiu de les mutacions de *RAS* en mostres de plasma longitudinal de pacients seleccionats.

Resultats: l'anàlisi de *RAS* en mostres de teixit i plasma de 115 pacients amb CCRm va mostrar una concordança global del 93%. L'anàlisi de les característiques clínico-patològiques va mostrar que l'afectació peritoneal o pulmonar única, els tumors d'histologia mucinosa i l'administració del tractament previ a la recollida de sang van afectar negativament la detecció de *RAS* a l'ADNct. En pacients amb tumors *RAS* mutat basal tractats amb quimioteràpia més antiangiogènica, l'anàlisi longitudinal de *RAS* la resposta al tractament, sent un predictor precoç de la resposta. En pacients amb *RAS* wt, el seguiment longitudinal de l'ADNct de *RAS* va revelar que OncoBEAM és una plataforma útil per detectar l'aparició de mutacions de *RAS* durant el tractament anti-EGFR.

Conclusió: l'elevada concordança global en l'avaluació mutacional de *RAS* entre plasma i teixit dona suport a la utilització de l'ADNct com a alternativa viable per al genotipat de *RAS* en pacients amb CCRm tractats en pràctica clínica. El nostre estudi descriu les principals característiques clínico-patològiques per optimitzar la determinació d'ADNct. A més, lavaluació de variacions en *RAS* mitjançant biòpsia líquida durant el tractament sistèmic reflecteix l'eficàcia de tractament i és útil per a la detecció de resistència adquirida.



ORIGINAL ARTICLE

Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients

J. Vidal^{1,2†}, L. Muinelo^{3†}, A. Dalmases⁴, F. Jones⁵, D. Edelstein⁵, M. Iglesias^{1,4}, M. Orrillo², A. Abalo³, C. Rodríguez³, E. Brozos³, Y. Vidal³, S. Candamio³, F. Vázquez³, J. Ruiz³, M. Guix², L. Visa², V. Sikri⁵, J. Albanell^{1,2,6}, B. Bellosillo^{2,3}, R. López³ & C. Montagut^{1,2*}

¹Cancer Research Program, FIMM Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ²Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Barcelona Spain; ³Translational Medical Oncology Group (Oncomet)/Liquid Biopsy Analysis Unit, Health Research Institute of Santiago (IDIS), Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (SERGAS) CIBERONC, Santiago de Compostela Spain; ⁴Pathology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain; ⁵Sysmex Inostics Inc., Mundelein, USA; ⁶Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

*Correspondence to: Dr Clara Montagut, Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Passeig Marítim 25-29, 08003 Barcelona, Spain. Tel: +34-932483137; E-mail: cmontagut@parcdesalutmar.cat

[†]Both authors contributed equally.

Background: *RAS* assessment is mandatory for therapy decision in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. This determination is based on tumor tissue, however, genotyping of circulating tumor (ct)DNA offers clear advantages as a minimally invasive method that represents tumor heterogeneity. Our study aims to evaluate the use of ctDNA as an alternative determining baseline *RAS* status and subsequent monitoring of *RAS* mutations during therapy as a component of routine clinical practice.

Patients and methods: *RAS* mutational status in plasma was evaluated in mCRC patients by OncoBEAM™ *RAS* CRC assay. Concordance of results in plasma and tissue was retrospectively evaluated. *RAS* mutations were also prospectively monitored in longitudinal plasma samples from selected patients.

Results: Analysis of *RAS* in tissue and plasma samples from 115 mCRC patients showed a 93% overall agreement. Plasma/tissue *RAS* discrepancies were mainly explained by spatial and temporal tumor heterogeneity. Analysis of clinico-pathological features showed that the site of metastasis (i.e. peritoneal, lung), the histology of the tumor (i.e. mucinous) and administration of treatment previous to blood collection negatively impacted the detection of *RAS* in ctDNA. In patients with baseline mutant *RAS* tumors treated with chemotherapy/antiangiogenic, longitudinal analysis of *RAS* ctDNA mirrored response to treatment, being an early predictor of response. In patients *RAS* wt, longitudinal monitoring of *RAS* ctDNA revealed that OncoBEAM was useful to detect emergence of *RAS* mutations during anti-EGFR treatment.

Conclusion: The high overall agreement in *RAS* mutational assessment between plasma and tissue supports blood-based testing with OncoBEAM™ as a viable alternative for genotyping *RAS* of mCRC patients in routine clinical practice. Our study describes practical clinico-pathological specifications to optimize *RAS* ctDNA determination. Moreover, OncoBEAM™ is useful to monitor *RAS* in patients undergoing systemic therapy to detect resistance and evaluate the efficacy of particular treatments.

Key words: ctDNA, *RAS* mutations, colorectal cancer, liquid biopsy, tumor dynamics, heterogeneity

Introduction

Monoclonal antibodies (moAb) directed against EGFR—cetuximab and panitumumab—are standard components of treatment

regimens for metastatic colorectal cancer (mCRC) patients, either alone or in combination with chemotherapy. The current standard of care is to determine mutations in *RAS* in all mCRC tumors before initiating treatment, as critical biomarkers of

innate resistance to anti-EGFR [1]. Moreover, all mCRC patients that initially respond to anti-EGFR therapy eventually develop resistance, which in ~50% of cases is due to the emergence of RAS mutations [2–5]. Currently, RAS mutation determination is carried out in formalin fixed paraffin-embedded samples from tumor tissue.

Circulating DNA fragments carrying tumor specific sequence alterations (circulating tumor DNA, ctDNA) are found in the cell-free fraction of blood, representing a variable and generally small fraction of the total circulating cell-free DNA (cfDNA). Tumor genotyping using ctDNA offers potential advantages particularly in the metastatic setting as a safe minimally invasive alternative to tissue [3].

Prior studies have demonstrated a high degree of concordance between somatic mutations detected in tumor tissue and those determined in ctDNA of patients with advanced tumors [6, 7]. The use of ctDNA has also demonstrated utility to predict treatment response to chemotherapy. Previous ctDNA studies utilized massively parallel (direct) sequencing of tumor tissue in order to identify somatic alterations specific to individual patients, which were subsequently incorporated into the development of a personalized gene panel to detect these mutations in blood samples. Although useful in a research setting, a personalized NGS panel approach is currently not amenable to routine clinical practice in that it requires significant dedicated resources in highly qualified research laboratories. Alternatively, blood-based tests that encompass a panel of the most frequently occurring mutations for a given tumor type and which can be used to interrogate the plasma of patients with high sensitivity present a practical approach for routine clinical care. The first and only test thus far for the determination of RAS mutations in ctDNA with European Conformity (CE-marked) *in vitro* diagnostic (CE-IVD) is the OncoBEAM RAS CRC assay, which detects 34 mutations in exons 2, 3, and 4 in the KRAS and NRAS genes as recommended by current clinical practice treatment guidelines (NCCN, ESMO, EMA).

The aim of the present study was to evaluate the clinical applications of the OncoBEAM RAS CRC assay in routine clinical practice for the diagnosis, assessment of response to chemotherapy/antiangiogenic treatment and monitoring of acquired resistance to anti-EGFR therapy in mCRC patients.

Materials and methods

Study design and sample collection

A retrospective-prospective study was carried out in two Spanish Institutions. Patients with histologically confirmed metastatic colorectal cancer and anti-EGFR treatment naïve were eligible for the study. Blood samples were collected in all patients before the administration of anti-EGFR treatment. For those patients undergoing monitoring, serial blood samples were collected every 4 weeks coinciding with the treatment visit and at the moment of progressive disease. See full inclusion criteria and regulatory aspects in supplementary material, available at *Annals of Oncology* online.

OncoBEAM™ RAS CRC assay was used to detect RAS mutations in plasma, and RAS mutation detection in tissue samples were carried out according to standard-of-care (SoC) procedures validated by each hospital (details in supplementary material and Table S4, available at *Annals of Oncology* online).

Statistical analysis

Variables were described using median and interquartile range (IQR) when continuous, and percentage when categorical. For mutant allele fraction (MAF) levels comparisons between different groups regarding clinical variables, we carried out Mann–Whitney *U* test for dichotomic variables and Kruskal–Wallis test for polychotomic variables. Tests were carried out under SPSS v.22 with a significance level of $P < 0.05$. Graphics were built using R 3.3.1.

Results

Patient characteristics and concordance of extended RAS determination in plasma versus tissue

From June 2009 to August 2016, 115 patients with mCRC were included, all of them had at least one baseline blood draw. Study flowchart is presented in Figure 1. Clinico-pathological characteristics of the patients are described in supplementary Table S1, available at *Annals of Oncology* online. At the time of basal ctDNA collection, all patients were naïve to anti-EGFR treatment and 82 patients (71%) had not received any therapy in the metastatic setting. The median time from tumor tissue specimen collection to ctDNA collection was 47.5 days (range 0–1783 days) in therapy-naïve patients.

Of the 115 patients included in the study, 55 (47.8%) and 59 (51.3%) were shown to have RAS mutations in their tumor samples as detected by SoC RAS tissue testing and as detected in ctDNA by RAS OncoBEAM, respectively (supplementary Figure S1, available at *Annals of Oncology* online). The overall concordance of RAS results between ctDNA RAS OncoBEAM assay and standard techniques for tissue analysis was 93% (107/115 patients), kappa index 0.844 (95% CI 0.746–0.941) (Figure 2).

Characterization of RAS tissue versus RAS plasma discordant cases

Among 55 patients in whom a RAS mutation was detected in tissue, 53 also had a RAS mutation in plasma (positive percentage agreement, PPA of 96.4%) (Figure 2). There were only two cases with RAS mutated tissue in whom no RAS mutation was detected in ctDNA. Both had localized tumors at the time of diagnosis that were initially removed. At relapse, when ctDNA extraction was carried out, both patients had minimal tumor burden: one with only peritoneum metastasis and the other had one infra-centimetric lung metastasis and one single implant in the peritoneum.

Among 60 patients determined to be RAS wt in tissue, no RAS mutations were observed in ctDNA in 54 cases (negative percentage agreement, NPA of 90%). In the remaining 6 patients, plasma RAS BEAMing detected a RAS mutation that SoC tissue testing had not revealed. In all of these cases, the primary tumor served as the source for RAS mutational analysis and had been removed before ctDNA sampling. Notably, all six patients had, at least, liver metastasis when blood was drawn for ctDNA analysis.

Interestingly, in five out of the six RAS tissue-/plasma+ discordant cases, the RAS MAF detected in ctDNA was under 1%. We compared the MAF of concordant and discordant cases.

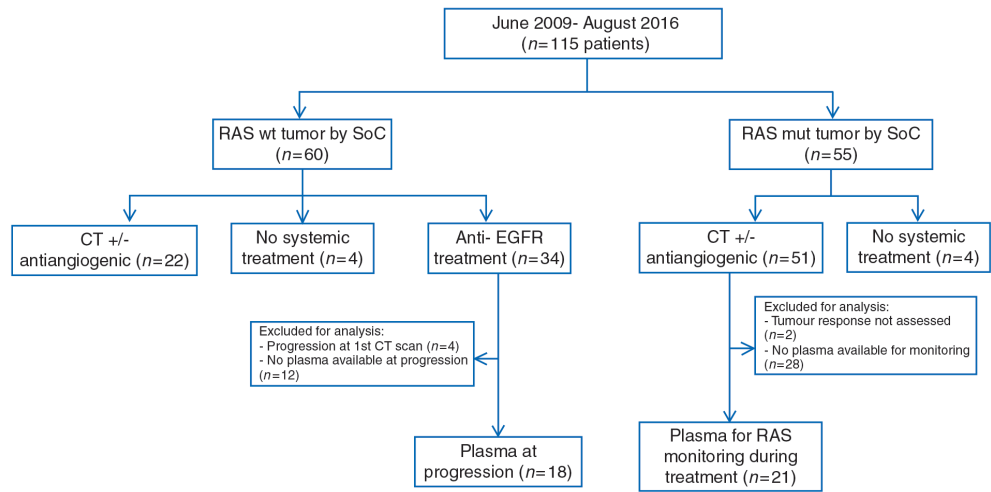


Figure 1. Study flowchart. Number of patients included in each of the analysis endpoints and reasons for exclusion are depicted.

RAS PLASMA MUT/ TISSUE WT									
Pt n.	Codon	MAF	Site tumor biopsy	Primary tumor resected	Site of metastasis	Days between tissue – plasma collection	Systemic treatment before ctDNA	Treatment	Best response
1	KRAS 13	0,2458%	primary	yes	liver, lung	71	Yes	FOLFOX Panitumumab	PD
2	KRAS 12	0,128%	primary	yes	liver	138	No	FOLFOX Cetuximab	PR
3	KRAS 61	31,73%	primary	yes	liver, lung	122	No	XELOX	PD
4	KRAS 12	0,896%	primary	yes	liver	60	No	FOLFOX Cetuximab	PR
5	KRAS 61	0,316%	primary	no	liver	32	No	FOLFOX Cetuximab	PR
6	KRAS 13	0,05%	primary	no	liver, lung	21	No	FOLFOXIRI Bevacizumab	PR

RAS PLASMA WT/ TISSUE MUT									
Pt n.	Codon	MAF	Site tumor biopsy	Primary tumor resected	Site of metastasis	Days between tissue – plasma collection	Systemic treatment before ctDNA	Treatment	Best response
7	KRAS 12		primary	no	Peritoneum, lung	1195	No	no	
8	KRAS 12		primary	yes	Peritoneum	39	No	FOLFOX Bevacizumab	PR

Tissue RAS result			
Plasma RAS result	Mutated	No mutated	Total
	53	6	59
	2	54	56
Total	55	60	115
Positive agreement: 53/55: 96,4%			
Negative agreement: 54/60: 90%			
Overall agreement: 107/115: 93%			

Figure 2. Comparison of RAS mutations detected in tissue versus plasma and analysis of discrepancies. Overall concordance analysis between RAS mutations detected in tumor by SoC and BEAMing plasma. Positive agreement (patients RAS mutated in plasma and tissue analysis) and negative agreement (patients wild-type in tissue and plasma). Clinico-pathological and treatment characteristics from eight discordant cases.

As shown in Figure 3A, there was a trend towards lower RAS plasma MAF in discordant cases compared with patients with concordant RAS in tissue and plasma (median RAS MAF 0.281% and 2.317%, respectively; $P=0.193$).

Differences in RAS ctDNA MAF according to clinico-pathological characteristics

The global median RAS plasma MAF was 1.84% (IQR: 0.284–11.290) (supplementary Table S1, available at *Annals of Oncology* online). No differences in MAFs were observed in relation to age, gender, initial stage at diagnosis or primary site of disease (right versus left).

While no differences in RAS MAF were seen in relation to the number of metastatic sites, differences were observed depending on the site of metastasis location (Figure 3B and C). Patients with liver involvement had higher RAS ctDNA compared with those without liver metastases (4.806% versus 0.203%; $P=0.001$). In contrast, MAF from patients having only peritoneum metastases was lower (0.1%) than patients without peritoneum involvement (4.026%), than patients with peritoneum metastasis in addition to at least one other metastatic site (1.109%; $P=0.056$). MAF was lower in patients with only lung metastatic involvement (0.033%). Of note, in two patients that presented with tumors having mucinous histology MAF was below the median (0.451% and 0.161%, respectively; $P < 0.05$).

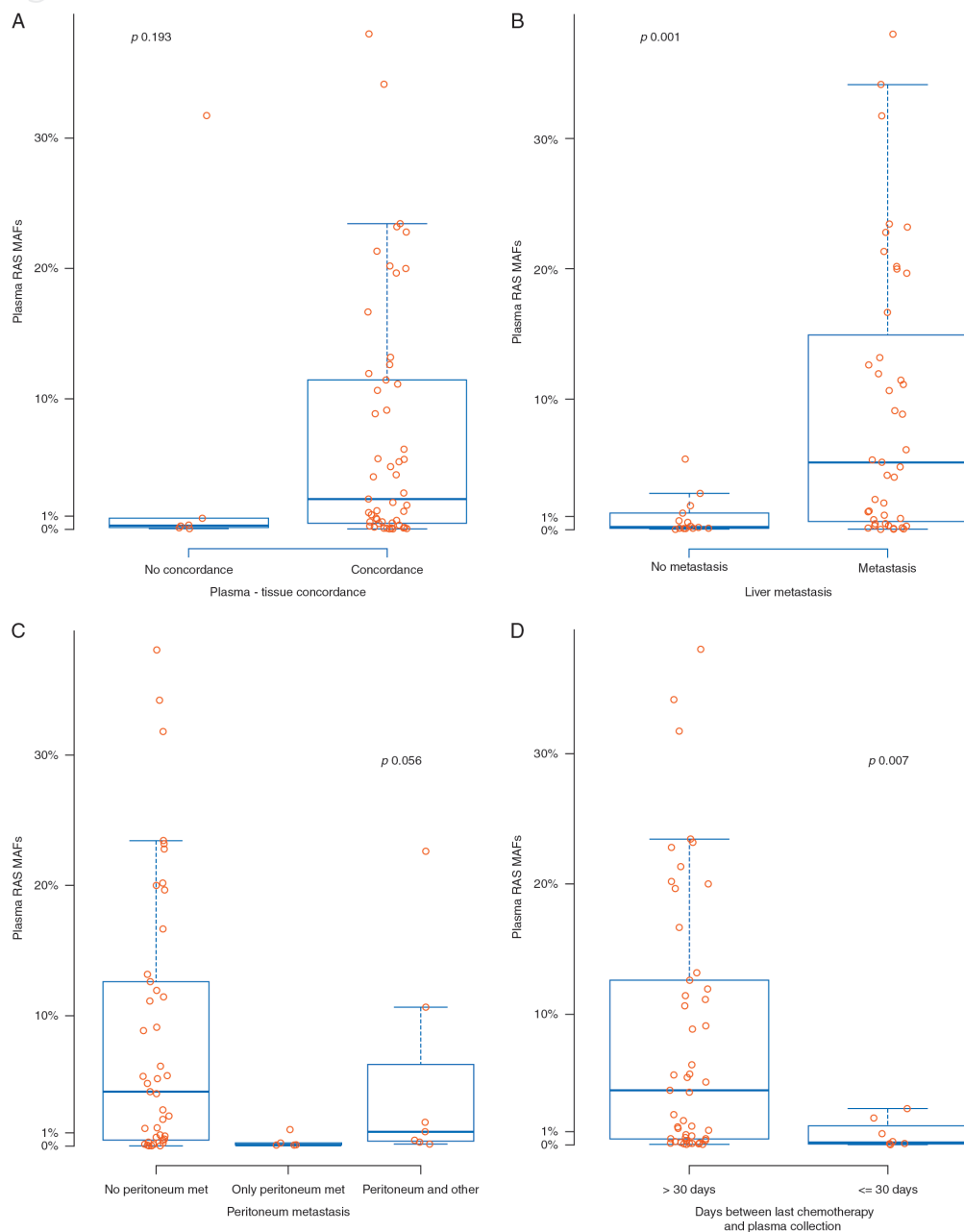


Figure 3. Correlation of circulating RAS mutations and clinico-pathological characteristics. (A) Differences in RAS ctDNA mutant allele fraction (MAF) in patients with concordant RAS plasma and tissue determination compared with discordant cases (RAS wild-type in plasma and RAS mutated in tissue or RAS mutated in plasma and RAS wild-type in tissue). (B) Differences in RAS ctDNA MAF according to patients with liver metastasis versus patients without liver involvement. (C) Differences in RAS ctDNA MAF according to patients without peritoneum involvement, patients with only peritoneum metastasis and patients with peritoneum plus another metastatic site. (D) Differences in RAS ctDNA MAF according to treatment naïve patients versus patients with previous systemic treatment received within a month prior ctDNA blood extraction.

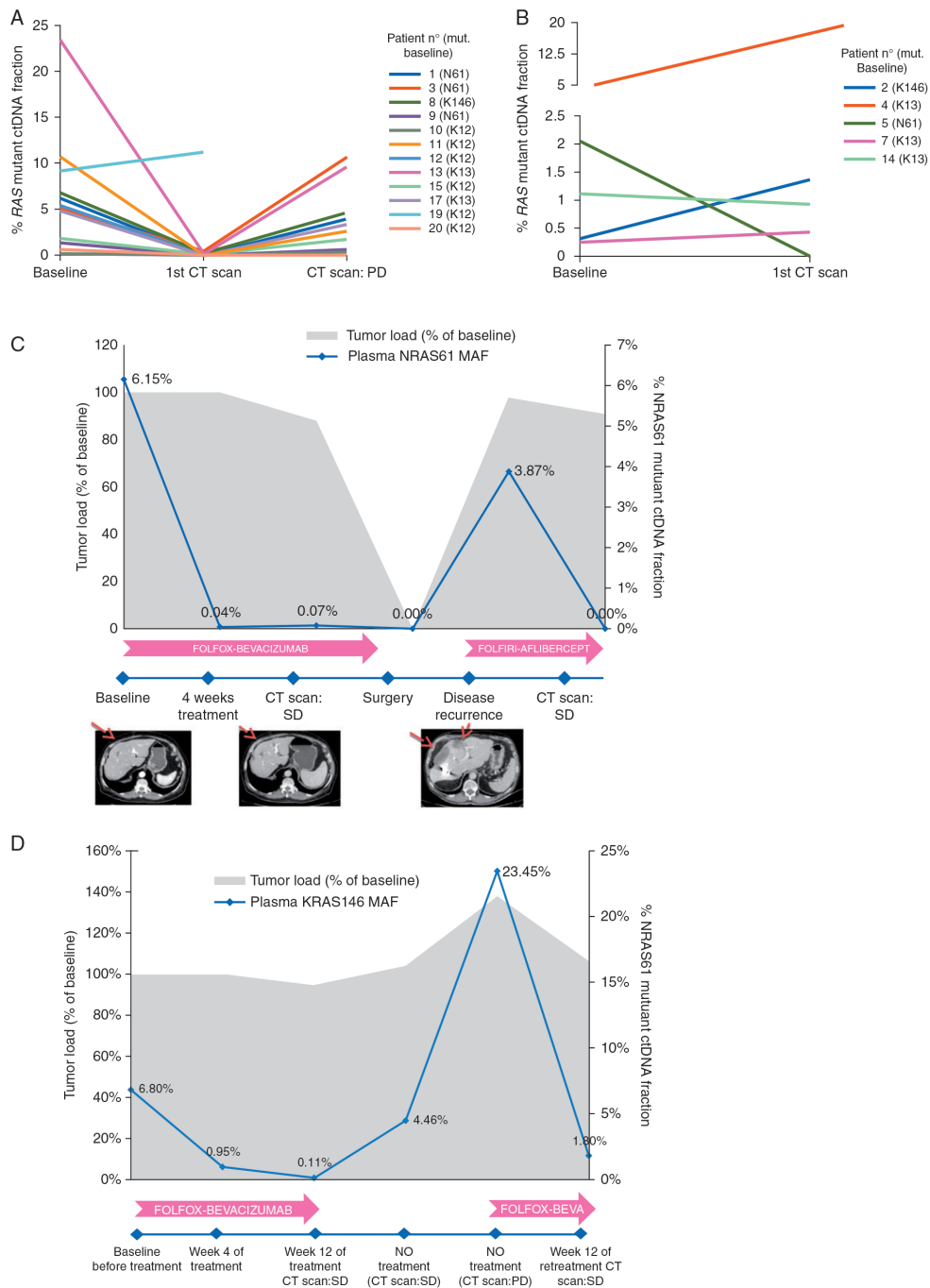


Figure 4. Longitudinal analysis of plasma RAS ctDNA to evaluate response to treatment with chemotherapy ± antiangiogenic. (A) RAS ctDNA dynamics in nine patients with RAS mutated tumors treated with chemotherapy ± antiangiogenic that initially respond to treatment. Frequency of circulating RAS mutant alleles at baseline, at time of first CT-scan to evaluate treatment response and at disease progression.

We then sought to analyze the impact of treatment on RAS mutation detection in plasma. No differences were observed in RAS plasma MAF between patients in whom the primary tumor had been removed before basal ctDNA extraction (4.026%) and patients in whom ctDNA was extracted from blood drawn at the time primary tumors had not been resected (1.558%; $P=0.584$). Regarding the relation between systemic treatment and plasma RAS mutation detection, 8 of 59 RAS mutant patients (13.6%) had received previous treatment with chemotherapy (comprising 5FU, oxaliplatin and/or irinotecan) $\pm$ anti-VEGF within a month prior ctDNA blood extraction. In all of these patients, lower RAS plasma MAFs were observed (0.173%; range 0.074–1.156) when compared with treatment-naïve patients (4.178%; range 0.451–12.620; $P=0.007$) (Figure 3D), emphasizing the relevance of blood draw timing for an accurate RAS determination.

Response to anti-EGFR therapy and prognosis according to baseline RAS ctDNA determination

We then determined the impact of RAS detection in predicting response to anti-EGFR based therapy. Among 54 patients having RAS wt tumor tissue, 34 were treated with anti-EGFR monoclonal antibodies (31 with cetuximab and 3 with panitumumab-based regimens; 30 plus chemotherapy and 4 in monotherapy). Twenty-three achieved a complete or partial response (68%) and 7 patients (20%) had stable disease for more than 16 weeks. Among tissue RAS wt patients treated with anti-EGFR therapy, four were found to have a plasma RAS positive result (Figure 2, discordant patients #1, #2, #4, #5). Three of them achieved a partial response, whereas one showed progressive disease after administration of anti-EGFR treatment.

Despite the retrospective nature of our study, we determined the progression-free survival (PFS) according to RAS mutation determination in plasma and RAS mutation determination in tissue. PFS was 10.3 month (95% CI 7.7–25) for wt RAS tissue patients and 10.3 months (95% CI 7.7–19.8) for RAS wt plasma patients.

In addition, baseline high RAS ctDNA MAF have been associated with low survival [8]. We analyzed the prognosis impact of basal MAF levels in a cohort of 22 patients with at least 3 year of follow-up. Patients with MAF levels $\geq 1\%$ had significant lower PFS and OS than those with basal levels $<1\%$ (supplementary Figure S2, available at *Annals of Oncology* online). These data

suggest that ctDNA levels could also provide valuable information to predict the disease evolution in RAS mutant patients before treatment onset.

Longitudinal ctDNA RAS testing for assessing response to patients treated with systemic treatment

Because ctDNA analysis has the capacity to reflect tumor load [2], we examined the utility of OncoBEAM RAS CRC ctDNA testing to monitor the efficacy of response of patients to treatment.

RAS was longitudinally monitored in serial blood draws from 21 patients with baseline RAS mutations undergoing systemic therapy. Seven patients were treated with combination chemotherapy + antiangiogenic therapy, 12 received chemotherapy alone and 2 anti-EGFR-based treatment (supplementary Table S2, available at *Annals of Oncology* online). A first CT-scan was carried out concurrent with the ctDNA RAS monitoring to evaluate tumor response after 8–12 weeks of treatment. Analysis of RAS ctDNA at the time of this first CT-scan revealed a dramatic decrease in plasma RAS MAF in responding patients with a median of 100%. For patients with clinical response to treatment, no differences in MAFs were observed in relation to the type of response achieved (median MAF reduction in patients with SD 99% versus 100% in patients with PR; $P=0.21$). However, MAF percentage of change was significantly lower in patients that progressed at first evaluation of response compared with patients with clinical benefit (PR + SD) (132% increase versus 99% reduction, respectively, $P=0.027$).

In 10 out of 11 responding patients that subsequently progressed, RAS ctDNA MAF increased accordingly, though in most cases patients exhibited lower MAFs than at the time of diagnosis (Figure 4A; supplementary Table S2, available at *Annals of Oncology* online). Of note, in one patient having a basal KRAS mutation in codon 12 (basal RAS MAF 9.12%), a decrease in RAS MAF was initially observed that was quickly followed by an increase in RAS MAF at week 12 although the CT scan showed stable disease. This patient subsequently showed a rapid progression of disease and died 4 months later.

Representative time courses of ctDNA along with clinical and radiologic data on two subjects are provided (Figure 4C and D), showing the high accuracy of RAS plasma ctDNA dynamics as a

Figure 4. Continued

Decline and increase in circulating RAS MAF correlate with response and progression to treatment, respectively. (B) RAS ctDNA dynamics in 5 patients with RAS mutated tumors that progressed at first CTscan at 8–12 weeks from beginning of treatment. (C) Patient diagnosed with stage IV rectal cancer with liver metastasis. An NRAS codon 61 mutation was detected in tissue and plasma. After 4 weeks of treatment with FOLFOX + bevacizumab, plasma MAF dramatically decreased correlating with a stable disease observed in the CT-scan at week 12. The patient underwent surgery of the primary tumor and liver metastasis, and plasma RAS became undetectable. Eight months later, the patient relapsed and RAS MAF increased accordingly. Three months after initiating second line treatment with FOLFIRI + aflibercept, the patient achieved a stable disease by CT scan, and no plasma ctDNA RAS mutations were detected. (D) Monitoring ctDNA KRAS codon 146 mutation during treatment with FOLFOX-Bevacizumab in patient #3, diagnosed with a stage IV colon cancer with lung and liver metastasis. The colonoscopic biopsy analysis was RAS wt but plasma ctDNA showed a KRAS codon 146 mutation. Following removal of the primary tumor, re-analysis of RAS in the surgical sample confirmed the plasma result. The patient received FOLFOX + bevacizumab with an early decrease in RAS ctDNA that became undetectable at 12 weeks, alongside at the first CT scan. Treatment was discontinued and a subsequently increase in KRAS codon 146 MAF was observed, which then rapidly decreased when the chemotherapy was reintroduced. Gray area indicates tumor load. Blue line indicates changes in ctDNA KRAS146 frequency.

surrogate marker of tumor load and a potential tool to evaluate early response to treatment.

ctDNA extended RAS for monitoring RAS mutations during and after withdrawal of anti-EGFR therapy

We and others previously reported that acquired resistance to anti-EGFR treatment is linked to the emergence of RAS mutations, that can be tracked in the blood of patients [2, 3, 8, 9]. In our study, we examined the value of OncoBEAM RAS CRC testing to detect the emergence of RAS mutations during anti-EGFR treatment. Plasma was available at the time of disease progression from 18 cases with acquired resistance to anti-EGFR therapy (i.e. disease progression after an initial complete response, partial response or stable disease for more than 16 weeks). Emergence of RAS mutations was detected in 7/18 patients (39%), 5 of them treated with chemotherapy + anti-EGFR and two with anti-EGFR monotherapy (supplementary Table S3, available at *Annals of Oncology* online). The most frequent mutations involved *KRAS* codon 12, *KRAS* codon 13 and *NRAS* codon 61. In three cases, different RAS mutations were concomitantly detected. Median RAS MAF detected at the time of anti-EGFR progression was 2.17% (range 0.024–24.957).

Discussion

Our study demonstrates that OncoBEAM RAS CRC assay is an efficient and accurate tool to be used in routine clinical practice with several applications in mCRC patients, including determination of baseline RAS at diagnosis to decide anti-EGFR therapy, assessment of efficacy to treatment and monitoring of the emergence of RAS mutations as a mechanism of resistance to anti-EGFR therapy.

The high overall agreement between baseline plasma and tissue RAS mutation status demonstrated in more than 100 patients evaluated in our study supports the use of blood-based testing with OncoBEAM™ RAS CRC as a viable alternative to tissue SoC for determining RAS mutation status in mCRC patients treated in routine clinical practice. Previous studies have shown that ctDNA can be detected in patients with mCRC by using personalized research panels with dPCR [7, 10, 11]. Recent publications have also shown a very high sensitivity with BEAMing to detect ctDNA mutations [12, 13]. However, to the best of our knowledge, this is the first study that explores the clinical use of plasma RAS determination by using a CE-marked assay in a daily clinical routine setting and in a large real world cohort of patients. Moreover, the minimal level of discordance (6%) between RAS tissue and plasma detection shown in our study is acceptable from a clinical point of view. In fact, it is far lower than the 5%–20% discrepancy found in RAS mutation detection when comparing two different tissue RAS testing SoC techniques [14, 15].

In an effort to explain plasma/tissue discrepancies as well as to better understand the biology of circulating tumor DNA, we identified several clinico-pathological features linked to low RAS ctDNA detection, including peritoneal/lung metastases or mucinous histology. In contrast, no correlation was found between the number of metastasis and RAS ctDNA mutations in our

study. This data suggests that intrinsic biological characteristics of the tumor rather than tumor burden may impact ctDNA release. In order to appreciate the utility and further optimize the routine evaluation of RAS ctDNA determination in daily clinical practice, we also studied external factors that may influence the result of RAS ctDNA determination. We found that the administration of recent systemic treatment had a clear negative impact on the ability to detect RAS mutations in the blood of patients, emphasizing the importance of collecting plasma for basal RAS analysis before the initiation of any systemic treatment. On the contrary removal of the primary tumor before blood draw for RAS analysis did not impact the RAS mutation results. In global, our study shows that the pattern of genetic alterations in cancer patients is dynamic and is affected by intrinsic and extrinsic factors.

Importantly, we also found a potential role of OncoBEAM RAS ctDNA assay in monitoring response and resistance during treatment. In patients with RAS mutant tumors, RAS plasma mirrored clinical and radiological response to treatment with chemotherapy drugs and was an early predictor of response. Likewise, Tie et al. [10] reported changes in ctDNA for mCRC patients treated with chemotherapy, although a more complex research-based approach was used. Moreover, we showed a potential use of RAS ctDNA in evaluating response to antiangiogenic drugs, which could be complementary to RECIST. On the other hand, in patients with RAS wt tumors treated with anti-EGFR, OncoBEAM RAS CRC was a valid tool to detect RAS mutations of resistance.

Despite the great value of the results presented, there are several limitations to our study. It is a retrospective analysis. Longitudinal blood extractions were only carried out in a limited number of patients. Additionally, given the low number of patients with specific clinico-pathological characteristics, our inferences from associations with *P*-values marginally <0.05% should be cautiously interpreted.

Overall, our data show that the OncoBEAM RAS CRC assay offers a minimally invasive and highly sensitive method for RAS assessment in plasma of mCRC patients which can be readily implemented into routine clinical practice to perform baseline diagnosis to select candidate patients to anti-EGFR therapy. Moreover, we show a potential use of OncoBEAM RAS in assessing the dynamics of RAS to monitor response and resistance to treatment practice.

Acknowledgements

The authors wish to thank biobank of I.D.I.S.-C.H.U.S. (PT13/0010/0068) for providing part of the tissue samples from colorectal cancer patients including at Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. The authors want to thank Mario Martin for his valuable contribution in the statistical analysis and Cristina Blanco for data management support.

Funding

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III grants PI15/00457, INT 16/00106 and DTS15/00048 (CM), PIE15/00008 and PI15/00146 (JA); 2014SGR740 (JA); Xarxa de Banc

de Tumors de Catalunya and Fundació Cellex. This work was supported in part by Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

Disclosure

FJ, DE and VS are employees of Sysmex-Inostics Inc. All remaining authors have declared no conflicts of interest.

References

1. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016; 27(8): 1386–422.
2. Misale Yaeger SR, Hobor S. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486(7404): 532–536.
3. Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486(7404): 4–7.
4. Van Emburgh BO, Arena S, Siravegna G. Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nat Commun* 2016; 7: 13665.
5. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B. 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): 221–223.
6. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra24.
7. Diehl F, Schmidt K, Choti MA. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14(9): 985–990.
8. Morelli MP, Overman MJ, Dasari A. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol/ESMO* 2015; 26(4): 731–736.
9. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G. Emergence of multiple EGFR extracellular mutations during cetuximab treatment in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21(9): 2157–2166.
10. Tie J, Kinde I, Wang Y. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2015; 26(8): 1715–1722.
11. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* 2015; 21(7): 795–801.
12. Toledo R, Cubillo AA, Vega E. Clinical validation of prospective liquid biopsy monitoring in patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI-cetuximab. *Oncotarget* 2016 [epub ahead of print].
13. Tabernero J, Lenz H-J, Siena S. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(8): 937–948.
14. Azuara D, Santos C, Lopez-Doriga A. Nanofluidic digital PCR and extended genotyping of RAS and BRAF for improved selection of metastatic colorectal cancer patients to anti-EGFR therapies. *Mol Cancer Ther* 2016; 15: 14–21.
15. Gonzalez de Castro D, Angulo B, Gomez B. A comparison of three methods for detecting KRAS mutations in formalin-fixed colorectal cancer specimens. *Br J Cancer* 2012; 107(2): 345–351.



• MATERIAL SUPPLEMENTARI ARTICLE 1



Supplementary table S1: Baseline clinico-pathological characteristics

Patient Characteristics	Total population [N (%)]	Plasma <i>RAS</i> WT patients [n (%)]	Plasma <i>RAS</i> MUT patients [n (%)]	MAF [median (IQR)]	<i>p</i>
Patients (n)	115	56	59	59	
Age (years) [median (IQR)]	67.8 (60.3-76.5)	68.2 (61.0-68.7)	65.6 (59.4-76.8)	65.6 (59.4-76.8)	
Age group					0.290
<65	45 (39.1%)	20 (35.7%)	25 (42.4%)	5.348 (0.316-13.185)	
>65	70 (60.9%)	36 (64.3%)	34 (57.6%)	1.321 (0.253-5.412)	
Gender					0.357
Male	81 (70.4%)	38 (67.9%)	43 (72.9%)	1.270 (0.284-9.891)	
Female	34 (29.6%)	18 (32.1%)	16 (27.1%)	3.403 (0.306-12.564)	
Stage at diagnoses					0.196
II / III	21 (18.3%)	11 (19.6%)	10 (16.9%)	0.502 (0.117-4.806)	
IV	94 (81.7%)	45 (80.4%)	49 (83.1%)	2.317 (0.316-11.942)	
Primary site of disease					0.590
Right colon	33 (28.7%)	14 (25.0%)	19 (32.2%)	1.420 (0.149-10.740)	
Left colon /Rectum	80 (69.6%)	41 (73.2%)	39 (66.1%)	2.317 (0.393-11.295)	
Unknown	2 (1.7%)	1 (1.8%)	1 (1.7%)		
Primary tumor resected					0.584
No	52 (45.2%)	25 (44.6%)	27 (45.8%)	4.026 (0.358-12.037)	
Yes	63 (54.8%)	31 (55.4%)	32 (54.2%)	1.558 (0.284-8.403)	
Systemic treatment 1 month before ctDNA					0.007
No	92 (80.0%)	43 (76.8%)	49 (83.0%)	4.178 (0.451-12.620)	
Yes	19 (16.5%)	11 (19.6%)	8 (13.6%)	0.173 (0.074-1.156)	
Unknown	4 (3.5%)	2 (3.6%)	2 (3.4%)		

Previous lines of treatment					0.585
0	95 (82.6%)	43 (76.8%)	52 (88.1%)	1.63 (0.27-11.02)	
1	16 (13.8%)	11 (19.6%)	5 (8.5%)	0.56 (0.06-18.2)	
2	4 (3.5%)	2 (3.6%)	2 (3.4%)	11.22	
Tumor site biopsy					0.885
Primary	84 (73.0%)	40 (71.4%)	44 (74.6%)	1.345 (0.149-11.295)	
Metastasis	12 (10.4%)	7 (12.5%)	5 (8.5%)	2.780 (0.840-4.026)	
Unknown	19 (16.5%)	9 (16.1%)	10 (16.9%)		
Number of metastatic sites					0.790
1	66 (57.4%)	29 (51.8%)	37 (62.7%)	1.270 (0.246-11.42)	
2	38 (33.0%)	20 (35.7%)	18 (30.5%)	3.403 (0.451-11.139)	
3 or more	11 (9.6%)	7 (12.5%)	4 (6.8%)	0.712 (0.201-11.220)	
Metastasis Location					
Liver	86 (74.8%)	41 (73.2%)	45 (76.3%)	4.806 (0.565-13.185)	0.001
No liver met	29 (25.2%)	15 (26.8%)	14 (23.7%)	0.203 (0.097-1.270)	
Lung	44 (38.3%)	22 (39.3%)	22 (37.3%)	1.633 (0.253-11.139)	0.718
No Lung met	71 (61.7%)	34 (60.7%)	37 (62.7%)	2.052 (0.315-11.942)	
Peritoneum	27 (23.5%)	15 (26.8%)	12 (20.3%)	0.383 (0.130-1.558)	0.068
No peritoneum met	88 (76.5%)	41 (73.2%)	47 (79.7%)	4.026 (0.512-12.283)	
Node	17 (14.8%)	14 (25.0%)	3 (5.1%)	0.161 (0.124-11.696)	0.220
No node met	98 (85.2%)	42 (75.0%)	56 (94.9%)	1.949 (0.316-11.696)	
Others	7 (6.1%)	3 (5.4%)	4 (6.8%)	0.201 (0.084-2.864)	0.116
No others met	108 (93.9%)	53 (94.6%)	55 (93.2%)	2.052 (0.383-11.696)	
Lung metastasis					0.129
No Lung metastasis	71 (61.7%)	34 (60.7%)	37 (62.7%)	2.052 (0.315-11.942)	

Only lung metastasis	9 (7.8%)	5 (8.9%)	4 (6.8%)	0.335 (0.074-0.614)	
Lung and other metastasis	35 (30.4%)	17 (30.4%)	18 (30.5%)	3.403 (1.109-11.450)	
Peritoneum metastasis					0.056
No Peritoneum metastasis	88 (76.5%)	41 (73.2%)	47 (79.7%)	4.026 (0.512-12.283)	
Only peritoneum metastasis	11 (9.6%)	6 (10.7%)	5 (8.5%)	0.100 (0.097-0.246)	
Peritoneum and other metastasis	16 (13.9%)	9 (16.1%)	7 (11.9%)	1.109 (0.383-6.253)	
Concordance					
Yes	107 (93.0%)	54 (96.4%)	53 (89.8%)	2.317 (0.451-11.450)	0.193
No	8 (7.0%)	2 (3.6%)	6 (10.2%)	0.281 (0.128-0.840)	

Supplementary Table S2. Emergence of *RAS* mutations at the time of progression to anti-EGFR treatment in 18 patients with *RAS* wild-type tumors at baseline. All patients achieved partial response or disease stabilization for at least 16 weeks under EGFR blockade, administered alone or in combination with standard chemotherapy indicate

Patient n°	RAS mutation (MAF, %)					
	KRAS exon2	KRAS exon3	KRAS exon4	NRAS exon2	NRAS exon3	NRAS exon4
16						
17	K12 (0.172)					
18					N61 (0.024)	
19						
20	K12 (0.21)	K61 (0.038)		N12 (0.046)	N61 (0.037)	
21						
22	K12 (5.51) K13 (0.153)			N13 (0.06)	N61 (0.037)	
23						
24						
25	K12 (0.137)	K61 (1.061)				
26	K12 (0.168)					
27			K146 (24.957)			
28						
29						
30						
31						
33						
34						

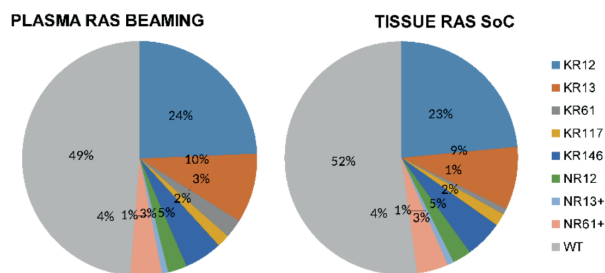
Supplementary table S3. Longitudinal analysis of circulating RAS mutations in 21 patients during treatment with chemotherapy +/- antiangiogenic or anti-EGFR. Frequency of circulating RAS mutant alleles is shown at specific time points and percentage MAF variation between baseline and first CT scan performed at 8-12 weeks of treatment. Treatment received and best response is described for each patient

Pt n° (baseline mut)	MAF (%)					Treatment	Best Response
	Baseline	Week 4	Week 8-12: first CT scan	CT Scan: PD	% Variation at first CT scan		
1 (N61)	6.1463	0.044	0.072	3.871	- 98.83%	FOLFOX_Bevacizumab	SD
2 (K146)	0.3153	0.54	1.35	-	328%	Cetuximab	PD
3 (N61)	5.17	ND	0.41	10.74	- 92.07%	Capecitabine_Bevacizumab	SD
4 (K13)	4.03	17.18	19.18	-		FOLFOX	PD
5 (N61)	2.052	0	0	-	- 100%	FOLFOX	PD
6 (K146)	12.62	8.9%	EXITUS	-		Capecitabine	PD
7 (K13)	0.2458	2.9	0.429	-	74.53%	FOLFOX-Panitumumab	PD
8 (K146)	6.8	0.949	0.107	4.46	- 98.43%	FOLFOX_Bevacizumab	SD
9 (N61)	1.27	0	0	0.46	- 100.00%	FOLFOX6	SD
10 (K12)	0.161	ND	0	ND	- 100.00%	FOLFOX_Bevacizumab	SD
11 (K12)	10.659	ND	0.038	2.554	- 99.64%	FOLFOX_Bevacizumab	SD
12 (K12)	5.412	0	0	ND	- 100.00%	XELOX	SD
13 (K13)	23.44	ND	0	9.56	- 100.00%	Irinotecan	SD
14 (K13)	1.109	ND	0.913	-	- 17%	FOLFIRI	PD
15 (K12)	1.8462	0.12	0	1.659	- 100.00%	FOLFOX	PR
16 (K12)	0.4705	0	ND	14.475		FOLFOX	PR
17 (K13)	4.8057	0.073	0	3.305	- 100.00%	FOLFOX	PR
18 (N61)	23.2071	5.813	ND	14.817		FOLFOX_Aflibercept	PR
19 (K12)	9.1229	3.71	11.195	EXITUS	22.71%	FOLFOX	SD
20 (K12)	0.675	0	0	0	- 100.00%	Capecitabine	PR
21 (K12)	16.6623	0.879	ND	4.88		FOLFOX_Aflibercept	SD

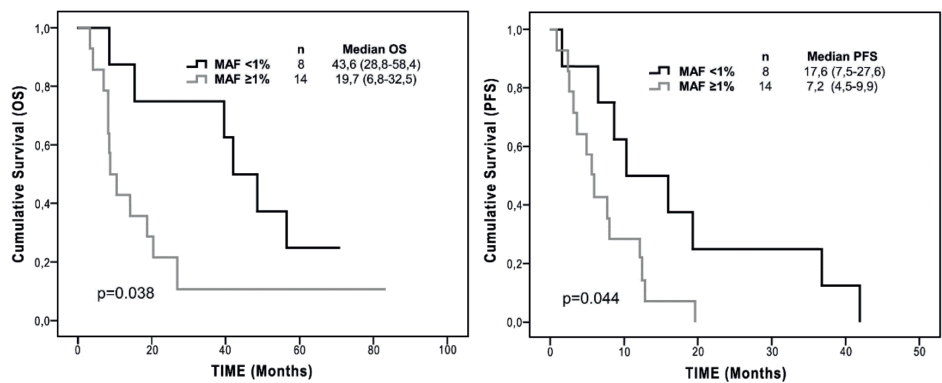
Supplementary table S4: *RAS* Mutations analyzed by OncoBEAM™ *RAS* CRC assay

KRAS		NRAS	
Exon	Mutation	Exon	Mutation
2	G12S	2	G12S
	G12R		G12R
	G12C		G12C
	G12D		G12D
	G12A		G12A
	G12V		G12V
	G13D		G13R
3	A59T	3	G13D
	Q61L		G13V
	Q61R		A59T
	Q61H		Q61K
4	Q61H		Q61R
	K117N		Q61L
	K117N		Q61H
			Q61H
		4	K117N
			K117N
			A146T

Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2





• ARTICLE 2





ARTICLE 2: Liquid biopsy detects early molecular response and predicts benefit to first-line chemotherapy plus cetuximab in metastatic colorectal cancer: PLATFORM-B study

Autors: J. Vidal, M.C. Fernández-Rodríguez, D. Casadevall, P. García-Alfonso, D. Páez, M. Guix, V. Alonso, M.T. Cano, C. Santos, G. Durán, E. Elez, J.L. Manzano, R. Garcia-Carbonero, R. Ferreiro, F. Losa, E. Pineda, J. Sastre, F. Rivera, B. Bellosillo, J. Tabernero, E. Aranda, R. Salazar, C. Montagut

Clinical Cancer Research 2023; 29 (2), 379-388





RESUM

Antecedents: la quimioteràpia més anti-EGFR és la teràpia estàndard de primera línia en pacients amb CCRm *RAS* wt, però clínicament es necessiten biomarcadors de resposta al tractament. L'objectiu d'aquest estudi és definir la utilitat de l'ADNct per avaluar la resposta primerenca en pacients amb CCRm que reben tractament anti-EGFR en primera línia.

Pacients i mètodes: es tracta d'un estudi prospectiu multicèntric de pacients amb CCRm *RAS* wt en teixit tractats en primera línia amb quimioteràpia més cetuximab i sotmesos a biòpsies líquides seqüencials. Es va analitzar l'ADNct mitjançant NGS previ inici de tractament (basal) i després de dos cicles (C3). La mutació en ADNct amb la MAF més elevada en cada mostra basal es va determinar com a mutació troncal i es van utilitzar com a marcador subrogat de la càrrega tumoral total. *RAS/BRAF/MEK/EGFR-ECD* es van considerar mutacions de resistència a anti-EGFR. Els resultats de l'ADNct es van correlacionar amb paràmetres clínics de resposta a tractament, SLP i SG.

Resultats: es van incloure 100 pacients de 15 hospitals espanyols. L'ADNct es va detectar en el 72% dels pacients previ inici de tractament i en el 34% al C3. La disminució de la mutació troncal en ADNct es va correlacionar amb una millor SLP (HR=0.23 P=0.001). Les úniques mutacions de resistència que es van detectar al C3 van ser mutacions de *RAS* o *BRAF*. Un augment de la fracció relativa de les mateixes després de dos cicles de tractament desencadenava una expansió clonal fins a la progressió i s'associava amb una SLP més curta (HR = 10.5; p <0. 001). El millor predictor de resposta va ser l'anàlisi combinada de mutacions troncal i de resistència a C3. En conseqüència, els pacients amb "resposta molecular primerenca" (disminució de mutacions troncal i disminució de mutacions de resistència a anti-EGFR) van tenir una millor resposta (77.5% vs. 25%, P=0.008) i una SLP més llarga (HR=0.18, P<0.001) en comparació amb els pacients amb "progressió molecular precoç" (augment de la mutació troncal i/o augment de mutacions de resistència).

Conclusions: l'ADNct detecta una resposta molecular precoç i prediu el benefici de la quimioteràpia més cetuximab. Es recomana un enfocament integral basat en NGS per integrar informació sobre el volum tumoral total i les mutacions de resistència.





Liquid Biopsy Detects Early Molecular Response and Predicts Benefit to First-Line Chemotherapy plus Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer: PLATFORM-B Study

Joana Vidal¹, Maria Concepción Fernández-Rodríguez², David Casadevall¹, Pilar García-Alfonso³, David Páez⁴, Marta Guix¹, Vicente Alonso⁵, Maria Teresa Cano⁶, Cristina Santos⁷, Gema Durán⁸, Elena Elez⁹, José Luís Manzano¹⁰, Rocío García-Carbonero¹¹, Reyes Ferreira¹², Ferran Losa¹³, Estela Pineda¹⁴, Javier Sastre¹⁵, Fernando Rivera¹⁶, Beatriz Bellosillo², Josep Tabernero⁹, Enrique Aranda⁶, Ramon Salazar⁷, and Clara Montagut¹; on behalf of the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumours (TTD)

ABSTRACT

Purpose: Chemotherapy plus anti-EGFR is standard first-line therapy in RAS wild-type (wt) metastatic colorectal cancer (mCRC), but biomarkers of early response are clinically needed. We aimed to define the utility of ctDNA to assess early response in patients with mCRC receiving first-line anti-EGFR therapy.

Experimental Design: Prospective multicentric study of tissue patients with RAS wt mCRC treated with first-line chemotherapy plus cetuximab undergoing sequential liquid biopsies. Baseline and early (C3) ctDNA were analyzed by NGS. Trunk mutations were assessed as surrogate marker of total tumor burden. RAS/BRAF/MEK/EGFR-ECD were considered mutations of resistance. ctDNA results were correlated with clinical outcome.

Results: One hundred patients were included. ctDNA was detected in 72% of patients at baseline and 34% at C3. Decrease in ctDNA trunk mutations correlated with progression-free survival

(PFS; HR, 0.23; $P = 0.001$). RAS/BRAF were the only resistant mutations detected at C3. An increase in the relative fraction of RAS/BRAF at C3 was followed by an expansion of the RAS clone until PD, and was associated with shorter PFS (HR, 10.5; $P < 0.001$). The best predictor of response was the combined analysis of trunk and resistant mutations at C3. Accordingly, patients with “early molecular response” (decrease in trunk and decrease in resistant mutations) had better response (77.5% vs. 25%, $P = 0.008$) and longer PFS (HR, 0.18; $P < 0.001$) compared with patients with “early molecular progression” (increase in trunk and/or increase in resistant mutations).

Conclusions: ctDNA detects early molecular response and predicts benefit to chemotherapy plus cetuximab. A comprehensive NGS-based approach is recommended to integrate information on total disease burden and resistant mutations.

Introduction

Treatment with anti-EGFR mAb plus chemotherapy in patients with RAS wild-type (wt) metastatic colorectal cancer (mCRC) is standard-of-care in the first-line setting (1). Patients treated with anti-EGFR mAb will ultimately develop acquired resistance promoted by clonal selection, mainly the emergence of mutations in the MAPK pathway (mostly RAS mutations) and in the extracellular domain of EGFR (EGFR-ECD; refs. 2–6). Currently, response to

anti-EGFR-based therapy is evaluated by clinical and radiological parameters using the RECIST v1.1 criteria (7) after 2 to 3 months of treatment.

Circulating tumor DNA (ctDNA) carrying tumor-specific molecular alterations are found in the cell-free fraction of blood from patients with cancer. ctDNA-sequencing technologies are rapidly improving with increasing evidence of clinical utility in mCRC. Baseline assessment of RAS mutations in the blood of patients correlates well with RAS tumor tissue testing and is currently an option in

¹Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Institut Mar Investigacions Mèdiques (IMIM), Universitat Pompeu Fabra, CIBERONC, Barcelona, Spain.

²Pathology Department, Hospital del Mar-IMIM, Barcelona, Spain. ³Medical Oncology Department, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ⁴Medical Oncology Department, H. Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ⁵Medical Oncology Department, H. Miguel Servet, Zaragoza, Spain. ⁶Medical Oncology Department, IMIBIC, Reina Sofia Hospital, University of Cordoba, CIBERONC, Cordoba, Spain. ⁷Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology (ICO), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL)-CIBERONC, Barcelona, Spain. ⁸Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Oncología Médica, Hospitales Universitarios Regional y Virgen de la Victoria, IBIMA, Málaga, Spain. ⁹Medical Oncology Department, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus, Vall d'Hebron Institute of Oncology (VHIO), Universitat Autònoma de Barcelona, CIBERONC, Barcelona, Spain. ¹⁰Medical Oncology Department, ICO, H. Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain. ¹¹Medical Oncology Department, Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (Imas12),

UCM, Madrid, Spain. ¹²Medical Oncology Department, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain. ¹³Medical Oncology Department, Hospital Sant Joan Despí - Moisès Broggi, ICO-Hospitalet, Barcelona, Spain. ¹⁴Medical Oncology Department Hospital Clinic, Barcelona, Spain. ¹⁵Medical Oncology Department, Hospital Universitario Clínico San Carlos, CIBERONC, Madrid, Spain. ¹⁶Medical Oncology Department Hospital Marqués de Valdecilla, IDIVAL, Santander, Spain.

E. Aranda and R. Salazar contributed equally to this article.

Corresponding Author: Clara Montagut, Medical Oncology, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Universitat Pompeu Fabra, CIBERONC, Passeig Marítim 25-29, Barcelona, 08003, Spain. E-mail: cmontagut@psmar.cat

Clin Cancer Res 2022;XX:XX-XX

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1696

©2022 American Association for Cancer Research

Translational Relevance

This prospective multicentric study aims to define the utility of liquid biopsies to assess early molecular response in patients with RAS wt metastatic colorectal cancer (mCRC) receiving first-line chemotherapy plus anti-EGFR. Sequential liquid biopsies were analyzed by a comprehensive NGS-based approach. Our data suggest that the best strategy to detect early molecular response and predict clinical benefit is the integration of information on early changes in total ctDNA tumor burden plus the detection of early emergence of resistant subclones after only two cycles of treatment. Moreover, longitudinal analysis of liquid biopsies reveal that only *RAS/BRAF* mutations emerge early during EGFR blockade, whereas *EGFR-ECD* mutations and other mechanisms of resistance emerge later. The PLATFORM-B study validates the role of ctDNA to further refine patient selection and sets the basis for the design of prospective clinical trials to evaluate early ctDNA-guided treatment decisions in first-line mCRC.

routine clinical practice to guide first-line therapy (8–11). However, the percentage of ctDNA RAS mutations (variant allele fraction, VAF), which most accurately predicts anti-EGFR therapy resistance and the most appropriate technology to be used is yet to be determined. Although next-generation sequencing (NGS) offers a comprehensive testing, dPCR-based sequencing offers a high sensitivity detection of specific point mutations.

Another potential clinical utility of liquid biopsy is the assessment of early response to chemotherapy plus anti-EGFR therapy in patients with mCRC, which remains unexplored so far. On one hand, the total amount of ctDNA correlates with total disease burden and can be used to monitor response to cancer therapy (chemotherapy, immunotherapy, or targeted therapy) earlier than radiologic evaluation and more accurately than serum markers (8, 12–15). On the other hand, liquid biopsy is a valuable tool to track clonal evolution and to identify the emergence of *RAS/EGFR-ECD* mutations of resistance in the blood of patients with mCRC treated with anti-EGFR therapy. Although RAS mutations emerge 4 to 9 months before radiologic progression, *EGFR-ECD* mutations emerge later during anti-EGFR therapy (8, 16–18). Altogether, the use of ctDNA to evaluate early molecular response to chemotherapy plus anti-EGFR mAb should be dual and complementary, including tracking of total disease burden together with the assessment of early rise of resistant subclones. Accordingly, next-generation ctDNA sequencing (NGS) offers the advantage of assessing trunk mutations together with multiple subclonal-resistant mutations in the same blood sample.

To define the utility of ctDNA to assess early response in patients with mCRC receiving anti-EGFR therapy, we conducted a prospective multicentric study of patients with RAS wt mCRC receiving first-line chemotherapy plus cetuximab undergoing sequential liquid biopsies analyzed by a comprehensive NGS-based approach.

Materials and Methods

Patients

The eligibility criteria included patients ≥ 18 years with histologically confirmed mCRC, RAS wt according to local laboratory tumor

tissue analysis and planned first-line treatment with chemotherapy plus cetuximab.

Assay methods

Whole blood samples were obtained before starting first-line treatment (baseline) and before the third cycle of treatment (C3; week 4–6; **Fig. 1A**) using Cell-Free DNA Collection Tubes (Roche Diagnostics). Collection tubes were sent to the central laboratory within 72 hours of blood extraction. In the Central Laboratory, plasma was isolated by centrifugation and aliquots were stored at -80°C until cell-free DNA (cfDNA) extraction. cfDNA was extracted using the QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen), QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (Qiagen), or MagMAX Cell-Free DNA Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocols. Minimum plasma volume for ctDNA assay was 4 mL with the goal of obtaining at least 20 ng of extracted cfDNA. ctDNA was analyzed at baseline and at C3 using dPCR (OncoBEAM for mCRC; Sysmex Inostics) and NGS (Oncomine Colon cfDNA Assay on an Ion S5 system). For patients with ctDNA *RAS/BRAF* mutations detected at baseline, tissue was reanalyzed by central laboratory using CAST PCR and ctDNA was also analyzed by NGS at first evaluation of response by CT-scan and at progression to chemotherapy plus cetuximab. OncoBEAM RAS CRC assay allow the detection of 34 different mutations in exons 2, 3, and 4 of *KRAS* and *NRAS* genes with a cut-off sensitivity of 0.01%. Ion Torrent Oncomine Colon cfDNA Assay covers 14 hotspot regions in genes (*AKT1*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *FBXW7*, *GNAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *SMAD4*, *TP53*, and *APC*) with a cut-off sensitivity of 0.1%. The cases with lower than 20 ng of cfDNA were considered of insufficient quality to perform NGS analysis. VAFs were calculated as the number of variant reads divided by the total number of reads for each variant position. Trunk mutations were defined as somatic mutations with the highest VAF within a plasma sample. Relative VAF (rVAF) was calculated as the frequency of a given mutation relative to the trunk mutation in the sample. Mutations in *RAS*, *EGFR-ECD*, *BRAF*, and *MAP2K1* were considered mutations of resistance to anti-EGFR therapy.

Study design

PLATFORM-B was a prospective, observational, multicentric study carried out in 15 Spanish Hospitals. Tumor response was assessed by local radiologists following RECIST v1.1. The protocol was approved by an independent Ethics Committee, and all patients gave their written informed consent before enrollment. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Statistical analysis

Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were estimated using the Kaplan–Meier method. PFS was defined as the time from initiation of first-line treatment with cetuximab until tumor progression or death, whichever occurred first, and OS was defined as the time from initiation of first-line treatment with cetuximab to death from any cause. Log-rank test was used to compare PFS and OS between the different groups considered. Clinical benefit rate (CBR) was defined as complete response (CR) + partial response (PR) + stable disease (SD) for ≥ 16 weeks. Chi-square or Fisher exact tests were used to compare the overall response rate (ORR) and the CBR according to ctDNA results at baseline and C3, and the association between ctDNA detection at baseline and clinical variables. Median VAF levels at baseline and C3 were compared using the Wilcoxon test.

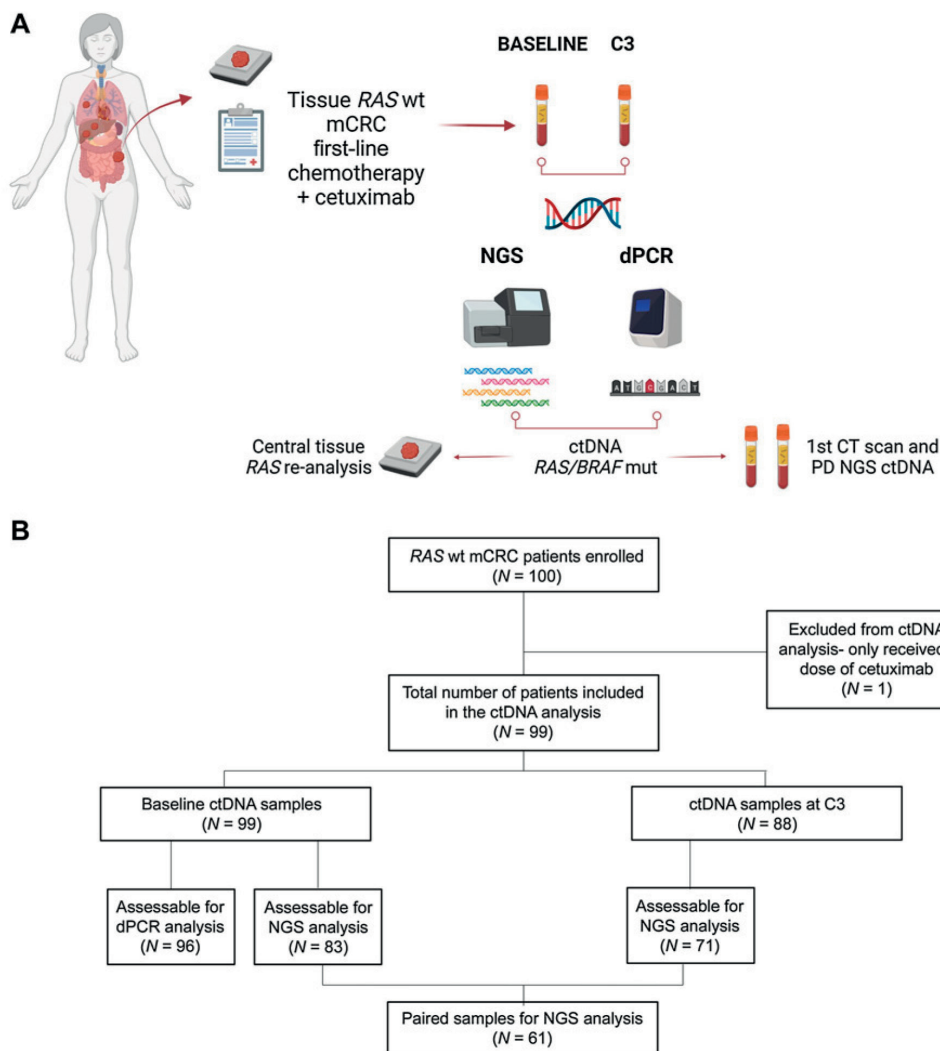


Figure 1. Study design (A) and study flow chart (B). dPCR, digital PCR; PD, progression disease.

Cox proportional hazard method was applied to estimate the corresponding HRs. The analysis was assessed in the intention-to-treat population, which included all eligible patients who underwent randomization and had both baseline and C3 blood specimens. Data analysis was carried out using IBM SPSS Statistics version 21 and R software version 4.1.1. The threshold for statistical significance was established at $P < 0.05$.

Data availability

The data generated in this study are available upon request from the corresponding author.

Results

Patients and samples

A total of 100 patients with tissue RAS wt mCRC receiving first-line chemotherapy plus cetuximab were included between February 2017 and April 2018. One patient received only one dose of cetuximab due to an anaphylactic reaction and was excluded from the ctDNA analysis. The study flowchart is summarized in **Fig. 1B**. Patients' clinicopathologic characteristics are described in **Table 1**. As of July 2021, the median follow-up was 25 months (range: 1–49 months). Overall, 11 (11%) patients achieved a CR, 53 (54%) a PR, and 19 (19%) SD, with

Table 1. Baseline clinico-pathologic characteristics of patients with mCRC treated with first-line chemotherapy plus cetuximab included in the ctDNA analysis and clinical outcomes.

	N = 99
Age, years, median (range)	66 (27–85)
Sex, males, <i>n</i> (%)	66 (67)
Tissue <i>RAS</i> wt, <i>n</i> (%)	99 (100)
Primary tumor location, <i>n</i> (%)	
Right colon	18 (18)
Left colon/rectum	81 (82)
Stage at diagnosis, <i>n</i> (%)	
I/II	4 (4)
III	15 (15)
IV	80 (81)
Surgery of the primary tumor, yes, <i>n</i> (%)	33 (33)
Number of metastatic sites, <i>n</i> (%)	
1	54 (55)
2	30 (30)
≥3	15 (15)
Metastatic locations, <i>n</i> (%)	
Liver	68 (68.7)
Lung	31 (31)
Nodes	29 (29)
Peritoneum	22 (22)
Others	15 (15)
Best overall response, <i>n</i> (%)	
Complete response	11 (11)
Partial response	53 (54)
Stable disease	19 (19)
Progression disease	10 (10)
Not evaluable	6 (6)
CBR, <i>n</i> (%)	82 (83)
PFS, months, median (95% CI)	15.1 (10.9–19.4)
Overall survival, months, median (95% CI)	27.3 (18.7–35.9)

Note: CBR (complete response + partial response + stable disease for ≥16 weeks). At the time of analysis, 71 (71.7%) of the patients had experienced disease progression and 67 (67.7%) patients had died.
Abbreviation: CI, confidence interval.

a CBR of 83%. Median PFS was 15.1 (95% CI, 10.9–19.4) months and median OS was 27.3 (95% CI, 18.7–35.9) months (Table 1).

As per study design, blood was obtained from all patients before initiating treatment (baseline) and before cycle 3 of chemotherapy plus cetuximab (C3; Fig. 1A). Plasma sequencing with a ctDNA NGS panel that covers hotspot sequencing of 14 genes related to mCRC detected at least one somatic mutation in 60 of 83 baseline plasma samples (72.3%) and 24 of 71 C3 plasma samples (33.8%; Fig. 2A and B). The only clinico-pathologic characteristic that was associated with detection of baseline ctDNA was the resection of the primary tumor (81% vs. 52% for nonresection vs. resection, respectively, $P = 0.007$; Supplementary Table S1).

Baseline *RAS/BRAF* ctDNA and resistance to chemotherapy plus cetuximab (NGS vs. dPCR testing)

All patients were tissue *RAS* wt according to local laboratory determination, as per protocol. Baseline *RAS* mutations in ctDNA were analyzed by NGS ($N = 83$) and dPCR ($N = 96$), and were detected in 8.4% ($N = 7$; median VAF 6.43%) and 11.5% ($N = 11$; median VAF 0.14%) of patients, respectively (Supplementary Table S2). The median VAF for the cases with *RAS* mutations detected by dPCR but not by NGS was 0.02%. Altogether this data confirms the intrinsic highest sensitivity for *RAS* mutation detection by dPCR compared with NGS.

Tissue re-analysis by the central laboratory of plasma-tissue discordant cases detected tissue *RAS* mutations in 5 of 10 analyzed cases, leaving a total of five true plasma-tissue discordant cases (5% of all patients; median VAF: 0.11; range: 0.024–0.38%) in agreement with previous results from our group and others (refs. 8–10; Supplementary Table S2). Of note, all plasma-tissue discordant cases had liver metastasis. A mutation in *BRAF* was detected baseline by NGS (VAF 4.35%) in one patient.

Although the number of patients with *RAS/BRAF* ctDNA mutations was very low, we next sought to find a threshold or a range in baseline *RAS/BRAF* mutation frequency in the blood of patients that best predicted resistance to anti-EGFR therapy. Detection of *RAS/BRAF* mutations were not associated with worse ORR or CBR at any VAF cutoff. *RAS/BRAF* mutations at VAF 1% cutoff discriminated well for PFS, although it did not reach statistical significance (16.0 months vs. 7.0 months; HR = 0.753; 95% CI, 0.47–1.2; $P = 0.230$; Supplementary Table S3).

Early changes in trunk mutation to predict early response to chemotherapy plus cetuximab

Because trunk mutations (the most frequently detected mutation within a specific plasma sample) are potentially present in all tumor cells, we used trunk mutations as a surrogate marker of total tumor burden, and analyzed the association between trunk mutations (baseline, C3, and changes between both timepoints) and clinical outcome. The most frequently detected trunk mutations (hereafter referred as trunk_ctDNA) at baseline were *TP53* (41.7% of patients) and *APC* (28.3%), and at C3 was *TP53* (45.8%; Fig. 2C). The median VAF for trunk_ctDNA decreased from 25.0% (range, 0.11–88.6%) at baseline to 1.0% (range, 0.12–68.0%) at C3 ($P = 0.003$).

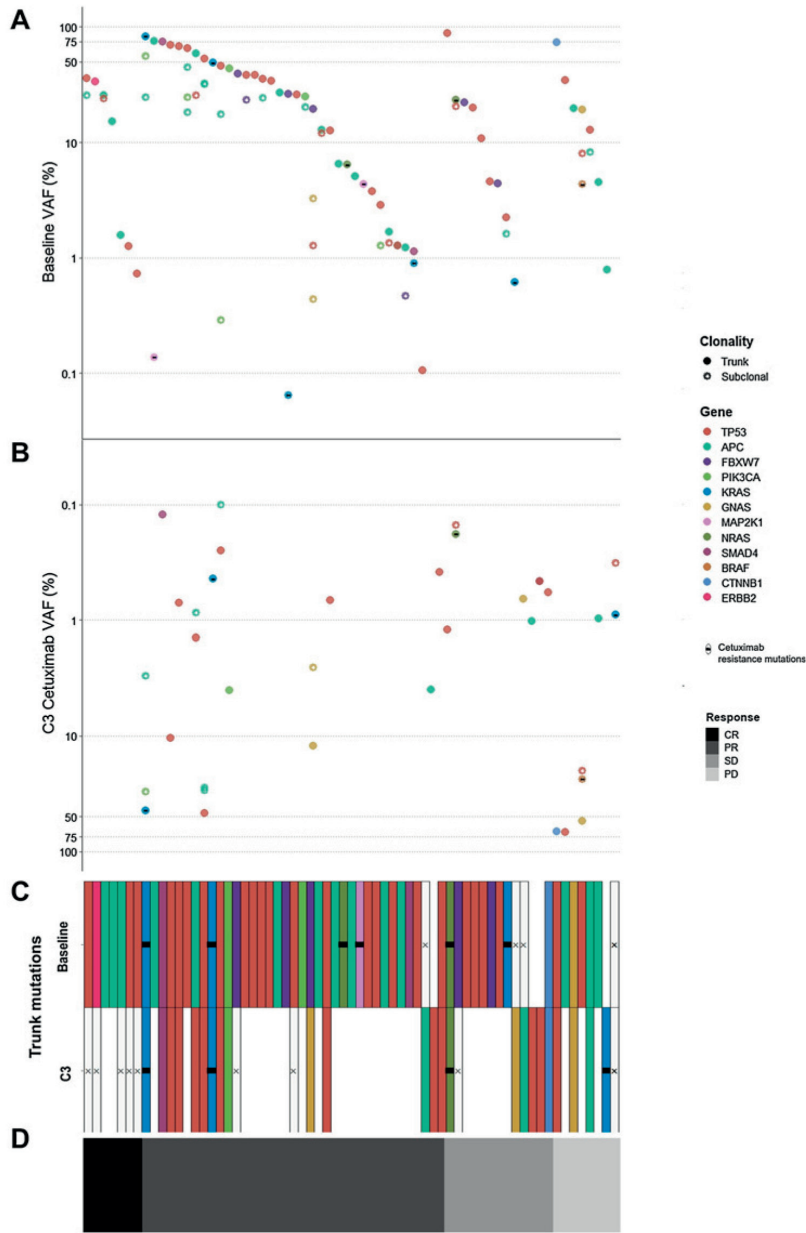
Baseline trunk_ctDNA was not prognostic nor predictive of clinical benefit to therapy (Fig. 2D; Supplementary Table S4). In contrast, detection of trunk_ctDNA at C3 was predictive of response to chemotherapy plus cetuximab (CBR 95.7% vs. 79.2%, $P = 0.04$ for trunk_ctDNA non-detected vs. detected; Supplementary Table S4). Moreover, the capacity of liquid biopsy to assess clinical benefit increased when taking into consideration the dynamics of trunk_ctDNA between baseline and C3. Radiologic response as assessed by RECIST v1.1 correlated with the percentage of change in trunk_ctDNA fraction. Accordingly, patients with clinical benefit had a median decrease in trunk_ctDNA of –81.5% compared with a median trunk_ctDNA increase of +31.9% in patients with progressive disease ($P = 0.003$). Similarly, a decrease in trunk_ctDNA fraction was significantly associated with longer PFS (18 month vs. 4 months; HR = 0.23; 95% CI, 0.09–0.57; $P = 0.001$). OS was numerically higher for patients with trunk_ctDNA decrease compared with patients with trunk_ctDNA increase (28.6 months vs. 10.5 months, respectively; HR, 1.36; 95% CI, 0.41–4.54; $P = 0.615$; Supplementary Table S5).

We then aimed at finding a cutoff in the change of trunk_ctDNA that most accurately predicted benefit to chemotherapy plus anti-EGFR mAb in PLATFORM-B patients. The best cutoff to discriminate for PFS was “any decrease” in the VAF of trunk-ctDNA as compared with “any increase or no change” in the VAF of trunk_ctDNA (Supplementary Table S6).

Early mutations of resistance to predict unresponsiveness to chemotherapy plus cetuximab

Previous cohorts of patients have shown the emergence of subclones of resistance in the blood of patients treated with anti-EGFR therapy (8, 17–19). NGS analysis of ctDNA from PLATFORM-B

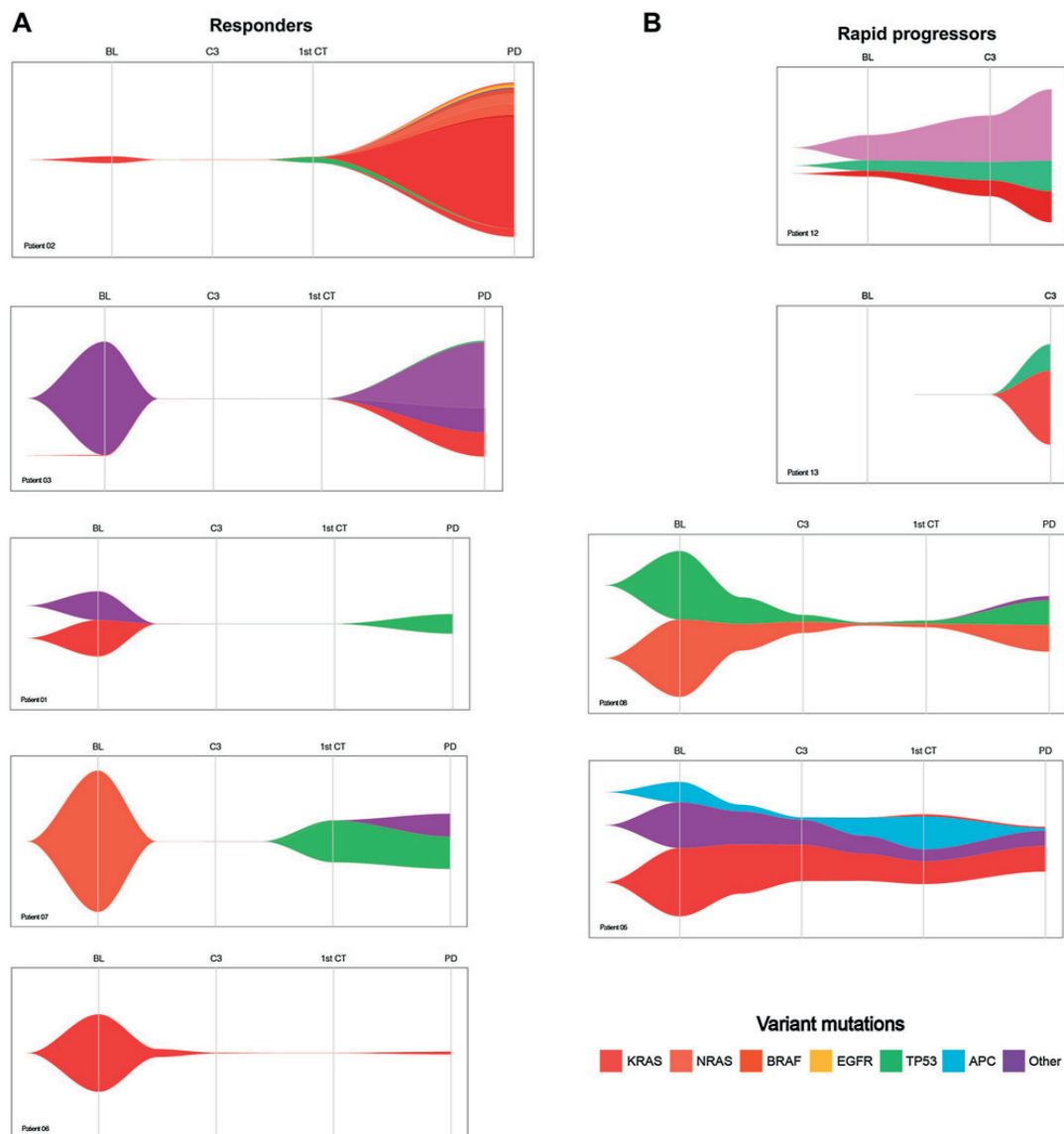
Figure 2. Liquid biopsy to detect early emergence of mutations of resistance and to monitor response to first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with mCRC. Oncoprint summary of molecular alterations detected by ctDNA plasma NGS at (A) baseline and (B) at cycle 3. Full circles indicate trunk mutation in each sample, and empty circles indicate subclonal mutations. Colors depict different mutations. Transverse lines indicate alteration of resistance to cetuximab, including mutations in *RAS/BRAF/MAP2K1/EGFR-EGF*. The median number of ctDNA mutations identified in each ctDNA positive sample was 1 (range 1–4) at baseline and 1 (range 1–3) at C3. C, ctDNA trunk mutation at baseline and at C3; black dots inside the bars represent mutations of resistance to anti-EGFR treatment. An “x” inside the bars represents timepoints without ctDNA sample available for analysis. D, Response as assessed by RECIST v1.1 criteria.



patients revealed that *RAS* mutations emerged at C3 in one patient (*KRAS* p.G12C mutation; VAF 0.9%), persisted in 3 patients and cleared in 4 patients. A mutation in *BRAF*^{V600E} persisted at C3 (Supplementary Table S7). No other mutations of acquired resistance were detected at baseline or at C3.

To identify changes in the clonality of *RAS* and *BRAF* mutations during anti-EGFR therapy, we analyzed the fraction of *RAS/BRAF* mutations relative to the trunk mutation in the sample (relative VAF,

rVAF; ref. 20). An increase in the rVAF of *RAS/BRAF* mutations was observed in 4 patients at C3 (pt#05, pt#08, pt#12, pt#13; Fig. 3A), whereas a decrease or stabilization was observed in the other 5 (pt#01, pt#02, pt#03, pt#06, pt#07; Fig. 3B; Supplementary Table S7). To characterize long-term clonal dynamics under anti-EGFR selective pressure, we exploited banked plasma samples from other time-points including plasma at first evaluation of response and at radiological progression from these 9 patients. An increase in the rVAF of

**Figure 3.**

Fishplots of *RAS/BRAF* somatic variants' clonal evolution, as detected by NGS at baseline (BL), cycle 3 (C3), first evaluation by CT scan (1st CT), and at progression of disease (PD) from 9 patients with *RAS/BRAF* mutations detected in ctDNA. **A**, Patients with decrease in the relative fraction of *RAS/BRAF* mutations of resistance at C3 were good responders to treatment, whereas **(B)** patients with an increase in the relative fraction of *RAS/BRAF* mutations of resistance at C3 were rapid progressors to chemotherapy plus cetuximab.

BRAF mutations of resistance at C3 was predictive of progressive clonal expansion of that specific *RAS/BRAF* mutation during anti-EGFR therapy until PD. On the contrary, in the 5 patients with a decrease in *RAS/BRAF* rVAF at C3, the *RAS* subclone did not necessarily expand and other genomic mechanisms of acquired resistance were uncovered, which emerged later during the course of anti-

EGFR. These late-emerging mutations of acquired resistance, mainly mutations in *EGFR-ECF*, had low VAFs and coexisted, suggesting subclonality (Fig. 3A).

A lower CBR was observed in the subgroup of patients with an increase in *RAS/BRAF* rVAF at C3 (50.0% vs. 91.2%, $P = 0.061$). Patients with an increase in *RAS/BRAF* relative fraction

had shorter PFS as compared with patients with a decrease in *RAS/BRAF* relative fraction at C3 (HR, 10.54; 95% CI, 3.13–35.50; $P < 0.001$). No differences in OS were observed (HR, 1.29; 95% CI, 0.39–4.23; $P = 0.672$; Supplementary Table S8).

Combined analysis of early changes in trunk mutation and mutations of resistance to predict response to chemotherapy plus cetuximab

To take advantage of the full capacity of ctDNA to evaluate early molecular response, we integrated data on total disease burden evaluation together with data on early expansion of subclones of resistance. Patients were grouped according to “early molecular response” (decrease in trunk ctDNA and decrease in *RAS/BRAF* relative fraction at C3) and “early molecular progression” (increase in trunk ctDNA and/or increase in *RAS/BRAF* relative fraction at C3). Patients with early molecular response had a higher ORR and CBR as compared with patients with early molecular progression (77.5% vs. 25%, $P = 0.008$ and 92.5% vs. 62.5%, $P = 0.061$ respectively; Fig. 4A). PFS was statistically longer in patients with early molecular response compared with patients with early molecular progression (HR, 0.18; 95% CI, 0.078–0.42; $P < 0.001$; Fig. 4B). No differences in OS were observed (HR, 0.92; 95% CI, 0.35–2.40; $P = 0.856$). Because laterality is an independent prognostic and predictive factor of response to anti-EGFR treatment in mCRC (21), we included primary tumor location as a potential confounding factor in a multivariable Cox regression analysis. Early molecular response was a significant predictive factor of response after adjusting by primary tumor location (adjusted HR, 0.16; 95% CI, 0.070–0.388; $P < 0.001$) confirming that laterality is not a confounding factor in early molecular response evaluation.

Discussion

PLATFORM-B is the first prospective study to assess the clinical utility of early liquid biopsies in patients with tissue *RAS* wt mCRC treated with first-line chemotherapy plus cetuximab. By using a comprehensive NGS-based approach, we show that an integrative dual assessment in ctDNA—that includes early changes in trunk mutation and in resistant mutations to anti-EGFR—detects early response to treatment and predicts clinical benefit as assessed by traditional radiological criteria. Patients with “early molecular response” in ctDNA, described as a decrease in trunk mutation (as a surrogate of total tumor burden) and a decrease in *RAS/BRAF* relative fraction at C3, resulted in longer progression free survival and a higher objective response rate compared with patients with “early molecular progression” (median PFS 18.84 months vs. 5.58 months; HR, 0.18, $P < 0.001$; ORR, 77.5% vs. 25%, $P = 0.008$).

Anti-EGFR therapy is recommended in combination with chemotherapy for the first line treatment of patients with *RAS* wt mCRC. However, approximately 15% of patients are rapid progressors and do not derive a clinical benefit as assessed by the standard RECIST radiological criteria (1, 22). This study detects 15% of “early molecular progressors” after two cycles of chemotherapy, which correlates with the rapid progressors in the radiologic evaluation performed later at C6. Early detection of rapid progressors is crucial to avoid overtreating patients with therapies that do not derive a clinical benefit and associate treatment-related toxicities.

ctDNA offers the potential to characterize the course of mCRC in a minimally invasive way to guide patient treatment. The concordance between tissue and plasma mutation detection has largely been demonstrated (8–10, 23). Moreover, serial genomic profiling of ctDNA provides a real-time comprehensive characterization

on clonal evolution, specifically the emergence of mutations of acquired resistance in patients treated with anti-EGFR therapy (4, 6, 8, 17–19). Recent studies also suggest that total ctDNA may be used to monitor response to chemotherapy (13–15). However, no studies have characterized the potential use of ctDNA to monitor response in patients with mCRC treated with first-line chemotherapy plus anti-EGFR therapy. This approach should integrate information on total ctDNA (assessed by trunk mutations) together with information on clonal evolution from mutations of resistance. In the PLATFORM-B study, longitudinal analysis of plasma samples revealed that *RAS/BRAF* clones detected early at C3 did not behave the same and did not have the same clinical meaning. In patients with an increase in *RAS/BRAF* rVAF at C3, the *RAS/BRAF* mutant clone progressively expanded during treatment until PD, and correlated with shorter PFS. On the contrary, in patients with no increase in *RAS/BRAF* rVAF at C3, the *RAS/BRAF* subclone did not expand during treatment and was not necessarily the main clone emerging at PD but instead coexisted with other subclones of resistance (mainly *EGFR-ECF* mutations); in these patients PFS was longer.

The emergence of mutations of resistance is the major limitation to effective targeted therapies. As expected, all early mutations of resistance detected in patients treated with anti-EGFR therapy were *RAS/BRAF* mutations, whereas *EGFR-ECF* mutations emerged later during EGFR blockade. This is in line with previous results that show that not all mutations of resistance to EGFR are created equal and that resistance to anti-EGFR therapy occurs in multiple waves of clonal expansion. Although *RAS* mutations are selected under environmental stress and rapidly expand under anti-EGFR pressure, *EGFR-ECF* subclones emerge later during drug-driven tumor evolution (2, 4, 18, 19). Altogether, this ultimately leads to detection of subclones carrying multiple mutations of resistance, as confirmed in our study.

Although most studies use dPCR to interrogate plasma-specific mutations previously detected in tumor tissue (13–15), we used a NGS tissue-agnostic strategy evaluating the most common mutations in colorectal cancer. The use of dPCR to cherry-pick one or two mutations found in tissue is a difficult strategy to use in daily clinical practice and limited to a biased view of tumor biology. The use of a larger panel allows to integrate data from trunk mutations (usually *TP53* and *APC*) as well as mutations of resistance to anti-EGFR treatment (*RAS*, *BRAF*, *EGFR-ECF*, and *MAP2K1*) increasing the probability of baseline ctDNA detection as well as a comprehensive evaluation of tumor dynamics and clonal evolution. Interestingly, despite a dramatic improvement in NGS technology in the recent years, 27.7% of patients in our study were ctDNA negative at baseline. We and others have previously described that ctDNA may be undetectable when tumor shedding is scarce (i.e., primary tumor removed, small lung metastasis, or exclusive peritoneum disease) or when therapy stabilizes tumor growth (8–10). Removal of the primary tumor was related to ctDNA detection in this study.

With the aim of improving the molecular selection of patients with mCRC, several works have attempted at defining threshold or range in baseline ctDNA *RAS* mutation frequency to better select patients to be treated with anti-EGFR therapy (15, 24–26). Results have been disparate and inherently affected by the explored cohort and the used technology. It is known that ctDNA dPCR techniques offer higher levels of sensitivity to detect ctDNA mutations compared with NGS (27, 28) but a lower threshold of ctDNA detection does not necessarily confer an improvement in patient response to anti-EGFR treatment, as seen in tissue testing (29). In our work we show that, in a

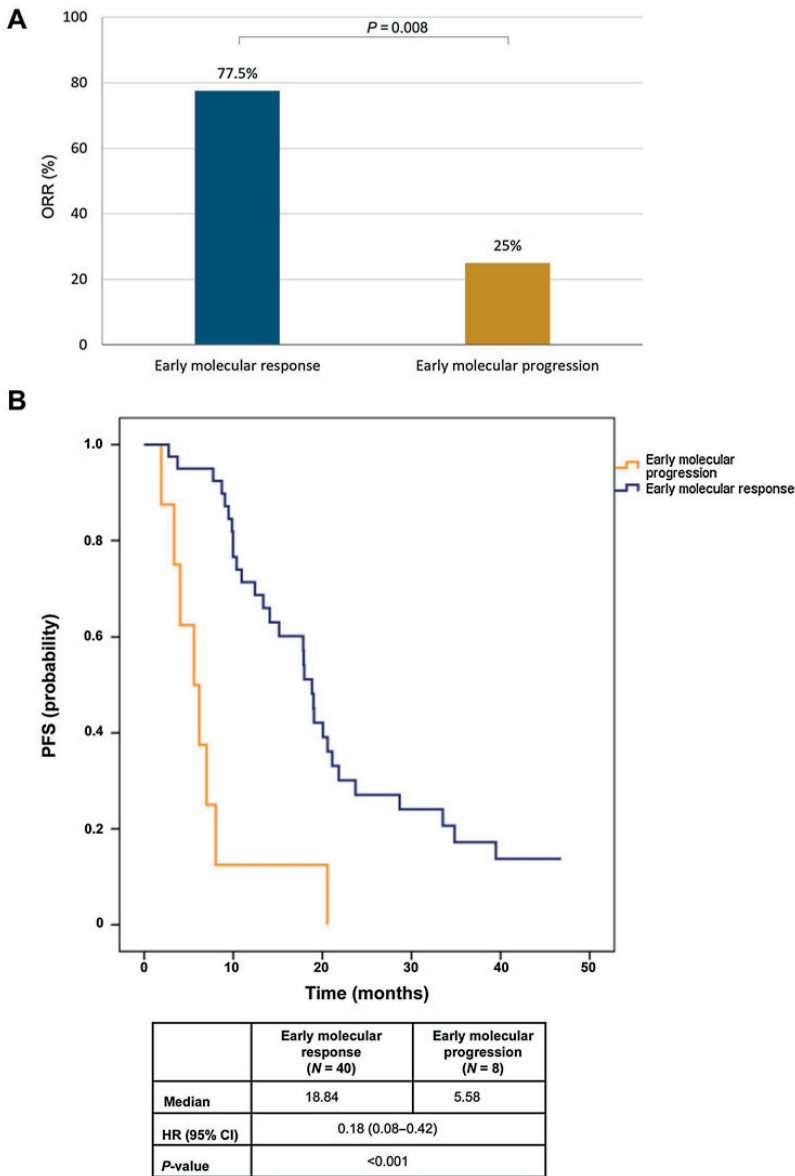


Figure 4.
A, ORR by RECIST v1.1 according to early molecular response versus early molecular progression. **B**, PFS according to early molecular response versus early molecular progression.

selected population of patients with tissue *RAS* wt mCRC, baseline *RAS* mutations preclude patients from responding to chemotherapy plus cetuximab. Interestingly, although a small number of patients with *RAS/BRAF* mutations, a VAF of 1% numerically discriminated for PFS. This may suggest that resistant mutations detected at very low VAF represent small subclones of the total tumor burden which do not predict unresponsiveness to anti-EGFR treatment, although our study is limited by a low number of patients with ctDNA *RAS* mutant and results should be confirmed in larger studies. Similarly, we aimed at finding a percentage of change in ctDNA to predict clinical outcome as

shown in previous works (13–15) but found that any decrease in the trunk mutation rather than a specific threshold was predictive of treatment efficacy. Defining a general and common cut-off value as a marker of response may be biased by specific characteristics of the explored cohort and the used technology than to the tumor's biology. On the contrary, ctDNA concentration and changes during treatment is intrinsic to a specific patient and tumor. Thus, a relative change in ctDNA within a patient during treatment is potentially a more accurate and realistic approach to be used in the clinics.

This study is mainly limited by the size of the cohort and the small subset of enrolled patients with available ctDNA paired samples. This was due to pre-analytic limitations based on blood collection of each participant center and the genomic coverage of the NGS panel used. Moreover, MMR and tissue *BRAF* status was not determined in the study, according to ESMO recommendations at the time the protocol was written (1).

Altogether, the PLATFORM-B study validates the role of early liquid biopsy to further refine patient selection by integrating information on changes in total disease burden and mutations of acquired resistance. The capacity of predicting clinical outcome after only two cycles of treatment sets the basis for prospective clinical trials evaluating early ctDNA-guided treatment decisions in patients with first-line mCRC receiving chemotherapy plus cetuximab with the aim of increasing the chance of potential benefit and reducing unnecessary toxicity from an ineffective therapy. Clinical trials should evaluate the survival impact of an early treatment switch based on early molecular response.

Authors' Disclosures

J. Vidal reports personal fees and other support from Merck and personal fees from Amgen, Sanofi, and BMS outside the submitted work. P. García-Alfonso reports personal fees from Roche, Sanofi, Lilly, Merck, Amgen, and Servier outside the submitted work. D. Páez reports grants and other support from Merck; personal fees and other support from Amgen, Ipsen, and Servier; other support from Sanofi, Roche, and Lilly; and personal fees from AAA outside the submitted work. M. Guix reports nonfinancial support from Merck, BMS, and Sanofi during the conduct of the study. V. Alonso reports other support from Merck Serono, Amgen, Sanofi, Servier, Ipsen, and Novartis outside the submitted work. C. Santos reports personal fees and nonfinancial support from Merck KGaA and Amgen outside the submitted work. R. García-Carbonero reports grants from Merck during the conduct of the study as well as personal fees from AAA, Advanz Pharma, Amgen, Bayer, BMS, HMP, Ipsen, Merck, Midatech, MSD, Novartis, Pharma Mar, Pierre Fabre, and Servier and grants from BMS, MSD, and Pfizer outside the submitted work. R. Ferreira reports other support from Servier, Amgen, Pierre Fabre, Bayer, and Merck outside the submitted work. J. Sastre reports personal fees from Roche, Merck, Servier, Amgen, Boehringer, Lilly, and MSD outside the submitted work. F. Rivera reports grants and nonfinancial support from Merck Serono; grants, personal fees, and nonfinancial support from Amgen, BMS, and Servier; personal fees and nonfinancial support from Sanofi-Aventis, Roche, and MSD; personal fees from Bayer, Astellas, and Celgene; and grants and personal fees from Lilly during the conduct of the study. B. Bellosillo reports personal fees from Amgen, AstraZeneca, Biocartis, Guardant-Health, Janssen, Merck-Serono, Qiagen, Pfizer, and Bristol Myers Squibb and grants and personal fees from Novartis, Hoffmann-La Roche, and ThermoFisher during the conduct of the study; in addition, B. Bellosillo has a patent for EGFR-ECD mutations licensed to Biocartis. J. Tabernero reports personal fees from Array Biopharma, AstraZeneca, Bayer, Boehringer Ingelheim, Chugai, Daiichi Sankyo, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Genentech Inc., HalioDX SAS, Hutchison MediPharma International, Ikena Oncology, Inspira Inc, IQVIA, Lilly, Menarini, Merck Serono, Merus, MSD, Mirati, Neophore, Novartis, Ona Therapeutics, Orion Biotechnology, Peptomyc, Pfizer, Pierre Fabre, Samsung Bioepis, Sanofi, Scandion Oncology, Scorpion Therapeutics, Seattle Genetics, Servier, Sotio Biotech, Taiho,

Tessa Therapeutics, TheraMyc, Imedex, Medscape Education, MJH Life Sciences, PeerView Institute for Medical Education, and Physicians Education Resource (PER) and other support from Oniria Therapeutics outside the submitted work. E. Aranda reports personal fees from Amgen, Bayer, Bristol Myers Squibb, Merck, Roche, and Sanofi outside the submitted work. C. Montagut reports grants from Merck Serono, Amgen, and Roche outside the submitted work. No disclosures were reported by the other authors.

Authors' Contributions

J. Vidal: Conceptualization, resources, data curation, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing. M.C. Fernández-Rodríguez: Software, validation, methodology, writing—review and editing. D. Casadevall: Conceptualization, data curation, software, formal analysis, visualization, writing—review and editing. P. García-Alfonso: Investigation, writing—review and editing. D. Páez: Investigation, writing—review and editing. M. Guix: Conceptualization, investigation, writing—review and editing. V. Alonso: Investigation, writing—review and editing. M.T. Cano: Investigation, writing—review and editing. C. Santos: Investigation, writing—review and editing. G. Durán: Investigation, writing—review and editing. E. Elez: Investigation, writing—review and editing. J.L. Manzano: Investigation, writing—review and editing. R. García-Carbonero: Investigation, writing—review and editing. R. Ferreira: Investigation, writing—review and editing. F. Lora: Investigation, writing—review and editing. E. Pineda: Investigation, writing—review and editing. J. Sastre: Investigation, writing—review and editing. F. Rivera: Investigation, writing—review and editing. B. Bellosillo: Conceptualization, resources, supervision, validation, investigation, methodology, writing—review and editing. J. Tabernero: Conceptualization, resources, investigation, writing—review and editing. E. Aranda: Resources, investigation, writing—review and editing. R. Salazar: Conceptualization, resources, supervision, validation, investigation, project administration, writing—review and editing. C. Montagut: Conceptualization, resources, data curation, formal analysis, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing.

Acknowledgments

This study was supported by Instituto de Salud Carlos III – FEDER Grant PI18/00031 and Fundación CRIS Excellence 19–30 Grant (to C. Montagut). The writing of this publication was provided by Aysén Clinical Research, sponsored by Merck, S.L.U., Spain, through a grant for the writing of an independent medical publication. The points of view and opinions that are collected in this publication do not necessarily reflect the ideas of the entity providing the grant. The authors want to thank the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumours (TTD Group) and especially Inma Ruiz de Mena and Susana Rodríguez.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note

Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Received May 31, 2022; revised July 22, 2022; accepted September 2, 2022; published first September 8, 2022.

References

1. 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;27:1386–422.
2. Diaz LA, Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012;486:537–40.
3. 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;4:1269–80.
4. 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;486:532–6.
5. 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;18:221–3.
6. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, Martínez A, Cañadas I, Lazzari L, et al. Emergence of multiple EGFR extracellular mutations during cetuximab treatment in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:2157–66.

7. 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;45:228–47.
8. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2017;28:1325–32.
9. 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;28:1294–301.
10. Bachet JB, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, et al. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol* 2018;29:1211–9.
11. Pascual J, Attard G, Bidard F-C, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* 2022;33:750–68.
12. Vidal J, Casadevall D, Bellosillo B, Pericay C, Garcia-Carbonero R, Losa F, et al. Clinical impact of presurgery circulating tumor DNA after total neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer: a biomarker study from the GEMCAD 1402 trial. *Clin Cancer Res* 2021;27:2890–8.
13. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2015;26:1715–22.
14. Parikh AR, Mojtabah A, Schneider JL, Kanter K, Van Seventer EE, Fetter IJ, et al. Serial ctDNA monitoring to predict response to systemic therapy in metastatic gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res* 2020;26:1877–85.
15. Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siaue N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, et al. Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study). *Clin Cancer Res* 2017;23:5416–25.
16. Jones RP, Pugh SA, Graham J, Primrose JN, Barriuso J. Circulating tumour DNA as a biomarker in resectable and irresectable stage IV colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2021;144:368–81.
17. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* 2015;21:795–801.
18. Van Emburgh BO, Arena S, Siravegna G, Lazzari L, Crisafulli G, Corti G, et al. Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nat Commun* 2016;7:1–9.
19. Montagut C, Argilés G, Ciardiello F, Poulsen TT, Dienstmann R, Kragh M, et al. Efficacy of Sym004 in patients with metastatic colorectal cancer with acquired resistance to anti-EGFR therapy and molecularly selected by circulating tumor DNA Analyses: a phase 2 randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2018;4:e175245–.
20. Zill OA, Banks KC, Fairclough SR, Mortimer SA, Vowles JV, Mokhtari R, et al. The landscape of actionable genomic alterations in cell-free circulating tumor DNA from 21,807 advanced cancer patients. *Clin Cancer Res* 2018;24:3528–38.
21. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, 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;28:1713–29.
22. Al B, Benson, Venook AP, Al-Hawary MM, Mwanzi SA, Al EN et al. Colon cancer colon cancer. *NCCN Harmon Guidel - Colon Cancer*. 2018;Version 2.1:1–5.
23. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med. Sci Transl Med*; 2014;6:224ra24.
24. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, et al. Circulating DNA as a strong multimarker prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin Cancer Res* 2016;22:3067–77.
25. Elez E, Chianese C, Sanz-García E, Martinelli E, Noguero A, Mancuso FM, et al. Impact of circulating tumor DNA mutant allele fraction on prognosis in RAS-mutant metastatic colorectal cancer. *Mol Oncol* 2019;13:1827–35.
26. Hamfjord J, Guren TK, Dajani O, Johansen JS, Glimelius B, Sorbye H, et al. Total circulating cell-free DNA as a prognostic biomarker in metastatic colorectal cancer before first-line oxaliplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol* 2019;30:1088–95.
27. García-Foncillas J, Tabernero J, Élez E, Aranda E, Benavides M, Camps C, et al. Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2018;119:1464–70.
28. Vivancos A, Aranda E, Benavides M, Élez E, Gómez-España MA, Toledano M, et al. Comparison of the clinical sensitivity of the Idylla platform and the OncoBEAM RAS CRC Assay for KRAS mutation detection in liquid biopsy samples. *Sci Rep* 2019;9:1–8.
29. Vidal J, Bellosillo B, Vivas CS, García-Alfonso P, Carrato A, Cano MT, et al. Ultra-selection of metastatic colorectal cancer patients using next-generation sequencing to improve clinical efficacy of anti-EGFR therapy. *Ann Oncol* 2019;30:439–46.



• MATERIAL SUPPLEMENTARI ARTICLE 2



Supplementary Table 1. Association between baseline total ctDNA detection and clinico-pathological characteristics in mCRC patients treated within the PLATFORM-B study.

Clinical variable	Patients with ctDNA detection N (%)	Patients without ctDNA detection N (%)	<i>P-value</i>
Sex			0.503
Male	37 (69.8)	16 (30.2)	
Female	23 (76.7)	7 (23.3)	
Primary site of disease			0.496
Left	50 (70.4)	21 (29.6)	
Right	10 (83.3)	2 (16.7)	
Primary tumour resected			0.007
Yes	13 (52.0)	12 (48.0)	
No	47 (81.0)	11 (19.0)	
Number of metastatic sites			0.920
1 or 2	49 (72.1)	19 (27.9)	
3 or more	11 (73.3)	4 (26.7)	
Abdominal limited disease			1.000
Yes	25 (65.8)	13 (34.2)	
No	35 (77.8)	10 (22.2)	
Thoracic limited disease			1.000
Yes	2 (66.7)	1 (33.3)	
No	58 (72.5)	22 (27.5)	
Peritoneum limited disease			0.306
Yes	2 (50%)	2 (50%)	
No	58 (73.4%)	21 (26.6%)	
Node only metastasis			0.557
Yes	3 (100%)	0 (0%)	
No	57 (71.3%)	23 (28.7%)	

Supplementary Table 2. *RAS* and *BRAF* mutations detected at baseline by dPCR and NGS.

Patient	dPCR <i>RAS</i> mutation	VAF dPCR <i>RAS</i> mutation	NGS <i>RAS/BRAF</i> mutation	VAF NGS <i>RAS/BRAF</i> mutation	<i>RAS</i> mutational status in tissue samples analysed by the central laboratory
01	<i>KRAS</i> 12	0.378%	<i>KRAS</i> G12A	0.9%	WT
02	<i>KRAS</i> 12	0.139%	<i>KRAS</i> G12V	0.615%	WT
03	<i>KRAS</i> 12	0.031%	<i>KRAS</i> G12D	0.0646%	Mutated
04	<i>KRAS</i> 12	0.024%	ND	-	WT
05	<i>KRAS</i> 146	53.15%	<i>KRAS</i> A146P	83.01%	Mutated
06	<i>KRAS</i> 146	38.34%	<i>KRAS</i> A146T	48.82%	Mutated
07	<i>NRAS</i> 12	20.73%	<i>NRAS</i> G12D	6.43%	Mutated
08	<i>NRAS</i> 61	6.9%	<i>NRAS</i> Q61L	23.26%	Mutated
09	<i>NRAS</i> 61	0.0379%	ND	-	WT
10	<i>NRAS</i> 146	0.0179%	ND	-	NA
11	<i>NRAS</i> 12	0.108%	NA	NA	WT
12	ND	-	<i>BRAF</i> V600E	4.35%	NA

NA: not available; ND: not detected

Supplementary Table 3. Tumor response and survival outcomes according to baseline ctDNA *RAS* detection assessed by NGS considering different VAF cut-offs in mCRC patients treated with chemotherapy anti-EGFR.

VAF cut-off	$\geq 0.01\%$		$\geq 0.1\%$		$\geq 1\%$	
Baseline	WT N= 75	MUT N=8	WT N= 76	MUT N= 7	WT N= 78	MUT N= 5
Overall response rate, n (%)	48 (64.0)	5 (62.5)	49 (64.5)	4 (57.1)	50 (64.1)	3 (60.0)
<i>P</i>	1.000		1.000		1.000	
Clinical benefit rate, n (%)	60 (80.0)	7 (87.5)	61 (80.3)	6 (85.7)	63 (80.8)	4 (80.0)
<i>P</i>	0.696		1.000		1.000	
Progression free survival						
Median	16.0	10.4	16.0	17.9	16.0	7.0
HR (95% CI)	0.69 (0.33-1.47)		0.86 (0.58-1.28)		0.753 (0.47-1.20)	
<i>P</i>	0.336		0.450		0.230	
Overall survival						
Median	27.3	18.0	25.0	23.1	25.0	18.0
HR (95% CI)	0.92 (0.40-2.15)		1.03 (0.65-1.64)		0.84 (0.50-1.40)	
<i>P</i>	0.850		0.891		0.510	

Clinical benefit rate (Complete response + Partial response + Stable disease for ≥ 16 weeks)

CI= confidence interval; MUT= mutated; WT= wild-type

Supplementary Table 4. Tumor response and survival according to detection of ctDNA trunk mutations at baseline and C3, as assessed by NGS.

	Baseline		C3	
	Detected ctDNA N= 60	Non-detected ctDNA N= 23	Detected ctDNA N= 24	Non-detected ctDNA N= 47
Clinical benefit rate, n (%)	49 (81.7)	18 (78.2)	19 (79.2)	45 (95.7)
<i>P</i>	<i>P</i> = 0.472		<i>P</i> = 0.040	
Progression free survival				
Median	17.8	11.3	10.0	19.0
HR (95% CI)	1.16 (0.65-2.10)		0.38 (0.21-0.68)	
<i>P</i>	0.615		0.001	
Overall survival				
Median	25.0	20.4	17.5	40.6
HR (95% CI)	0.91 (0.50-1.66)		0.52 (0.28-0.95)	
<i>P</i>	0.759		0.031	

Supplementary Table 5. Tumor response and survival according to change in VAF of trunk mutation.

	Decrease VAF trunk mutation N= 42	Increase VAF trunk mutation N= 6
Clinical benefit rate, n (%)	39 (92.9)	3 (50.0)
<i>P</i>		<i>P</i> = 0.020
Progression free survival		
Median	18.0	4.0
HR (95% CI)		0.23 (0.09-0.57)
<i>P</i>		0.001
Overall survival		
Median	28.6	10.5
HR (95% CI)		1.4 (0.41-4.5)
<i>P</i>		0.615

Supplementary Table 6. Progression-free survival according to different cutoff of change in the VAF of the trunk mutation detected in baseline and C3 plasma sample in patients treated with chemotherapy plus cetuximab.

VAF reduction cut-off			Below	Above
Any decrease	PFS	N	6	42
		Median	4.0	18.0
		HR (95% CI)	0.23 (0.09-0.57)	
		<i>P</i>	0.001	
≥ 1%	PFS	N	6	42
		Median	4.0	18.0
		HR (95% CI)	0.23 (0.09-0.57)	
		<i>P</i>	0.001	
≥ 10%	PFS	N	7	41
		Median	5.6	17.9
		HR (95% CI)	0.24 (0.09-0.60)	
		<i>P</i>	0.002	
≥ 30%	PFS	N	8	40
		Median	5.6	18.0
		HR (95% CI)	0.23 (0.09-0.56)	
		<i>P</i>	0.001	

Only patients with a least one sample with ctDNA detected (48 of 61 patients with samples).

Supplementary Table 7. Clonal dynamics in patients with baseline *RAS/BRAF* mutations.

Patient ID	Mutations at BL	VAF Mutations at BL (%)	Mutations at C3	VAF Mutations at C3 (%)	Mutations at 1st CT	VAF Mutations at 1st CT (%)	Mutations at PD	VAF Mutations at PD (%)
01	KRAS G12A SMAD4 G386D	0.9	KRAS G12A	0	KRAS G12A	0	KRAS G12A	0
		1.14	SMAD4 G386D	0	SMAD4 G386D	0	SMAD4 G386D	0
							TP53 C238T	0.1221
02	KRAS G12V	0.615	KRAS G12V	0	KRAS G12V	0	KRAS G12V	0.7558
							KRAS Q61H	10.2118
							NRAS G12C	1.0101
							NRAS Q61K	0.9009
							NRAS Q61R	0.4308
							KRASG13E	0.3021
							MAP2K1 K57T	0.1499
							EGFR S492R	0.2093
							EGFR S492R	0.1046
							KRAS Q61L	0.0627
KRAS G12S	0.0755							
				TP53 M237I	0.51			
03	KRAS G12A FBXW7 A465H	0.0646	KRAS G12A	0	KRAS G12A	0	KRAS G12A	3.25
		26.28	FBXW7 A465H	0	FBXW7 A465H	0	FBXW7 A465H	1.8
						MAP2K1 L57A	8.8	
						TP53 A249S	0.102	
05	PIK3CA G545L APC T1493fs KRAS A146P	55.74	PIK3CA G545L	30.5	PIK3CA G545L	14.68	PIK3CA G545L	18.48
		24.74	APC T1493fs	3	APC T1493fs	40.95	APC T1493fs	3.31
		83.01	KRAS A146P	44.07	KRAS A146P	27.64	KRAS A146P	31.21
					KRAS G61H	0.19	KRAS G61H	0.1611
					KRAS G12A	0.1247	KRAS G12A	0
06	KRAS A146T	48.82	KRAS A146T	0.44	KRAS A146T	0	KRAS A146T	1.7857
07	NRAS G12D	6.43	NRAS G12D	0	NRAS G12D TP53 T220H	0	NRAS G12D	0
						0.21	TP53 T220H	0.1489

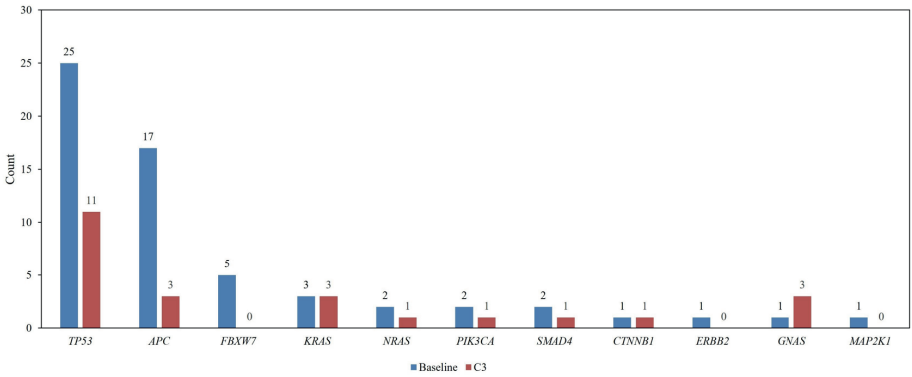
							PIK3CA M1043I	0.0564
08	NRAS Q61L TP53 A138V	23.26 20.63	NRAS Q61L TP53 A138V	0.18 0.15	NRAS Q61L TP53 A138V	1.1 0.86	NRAS Q61L TP53 A138V TP53 G245S	8.01 7.51 0.0823
12	BRAF V600E TP53 R273C GNAS R201C	4.35 8.059 19.1638	BRAF V600E TP53 GNAS	23.56 23.22 54.24				
13	KRAS G12C TP53 Y234C	0 0	KRAS G12C TP53 Y234C	0.9 0.32				

ID: identification; VAF: Variant allele fraction; BL: baseline; C3: cycle 3; 1st CT: first evaluation of response by CT scan; PD: Progression disease. Grey boxes: non available samples due to progression at first evaluation of response close to C3

Supplementary Table 8. Tumor response and survival according to early changes in mutations of resistance (*RAS/BRAF*) in the blood of patients.

	Absence/Decrease in <i>RAS/BRAF</i> rVAF N= 57	Increase <i>RAS/BRAF</i> rVAF N= 4
Clinical benefit rate, n (%)	52 (91.2)	2 (50.0)
<i>P</i>		<i>P</i> = 0.061
Progression free survival		
Median	18.0	4.0
HR (95% CI)		10.54 (3.13-35.50)
<i>P</i>		< 0.001
Overall survival		
Median	32.7	17.5
HR (95% CI)		1.29 (0.39-4.23)
<i>P</i>		0.672

Figure 1 Supplementary





• ARTICLE 3





ARTICLE 3: Clinical impact of pre-surgery circulating tumor DNA after total neoadjuvant treatment in locally advanced rectal cancer: a biomarker study from the GEM-CAD1402 Trial

Autors: J. Vidal, D. Casadevall B. Bellosillo, C. Pericay, R. Garcia-Carbonero, F. Losa, L. Layos, V. Alonso, J. Capdevila, J. Gallego, R. Vera, A. Salud, M. Martin-Richard, M. Nogué, E. Cillán, J. Maurel, I. Faull, V. Raymond, C. Fernández-Martos, C. Montagut

Clinical Cancer Research; 2021 27 (10), 2890-2898





RESUM

Antecedents: el tractament neoadjuvant total (TNT) és una estratègia vàlida per als pacients amb càncer de recte localment avançat (CRLA) d'alt risc. Els biomarcadors de resposta al TNT són una necessitat clínica no satisfeta. El nostre objectiu és determinar el valor de l'ADNct per predir la resposta, la recurrència i la supervivència global en pacients amb CRLA tractats amb TNT.

Pacients i mètodes: l'estudi GEMCAD 1402 és un assaig clínic aleatoritzat i multicèntric fase II que va aleatoritzar 180 pacients amb CRLA a rebre tractament amb mFOLFOX6 +/- Aflibercept seguit de QRT i cirurgia. Les mostres de plasma es van recollir previ inici de tractament (basal) i després del TNT dins de les 48h abans de la cirurgia (pre-cirurgia). Per a l'estudi de l'ADNct es va utilitzar un assaig de NGS ultrasensible que integra un anàlisi genòmic i epigenòmic. Els resultats de l'ADNct es van correlacionar amb variables de resposta local del tumor a la mostra de la cirurgia, recurrència local i sistèmica i supervivència global.

Resultats: es van incloure 144 mostres de plasma aparellades de 72 pacients. L'ADNct es va detectar en el 83% dels pacients a la mostra basal i en el 15% després de TNT (pre-cirurgia). No es va trobar cap associació entre l'estat de l'ADNct i la resposta patològica del tumor rectal. La presència d'ADNct abans de la cirurgia es va associar amb major risc de recurrència sistèmica, una supervivència lliure de malaltia més curta (HR=4 p= 0.033) i una supervivència global més curta (HR=23 p <0, 0001) comparat amb aquells pacients amb ADNct negatiu després del TNT.

Conclusió: en pacients amb CRLA tractats amb TNT, l'ADNct preoperatori detecta la presència de malaltia mínima metastàtica (MMM) identificant aquells pacients amb elevat risc de recurrència a distància i mort. Aquest estudi estableix les bases per a assaigs clínics prospectius que utilitzen la biòpsia líquida per personalitzar l'enfocament terapèutic després del TNT.



Clinical Impact of Presurgery Circulating Tumor DNA after Total Neoadjuvant Treatment in Locally Advanced Rectal Cancer: A Biomarker Study from the GEMCAD 1402 Trial



Joana Vidal¹, David Casadevall¹, Beatriz Bellosillo², Carles Pericay³, Rocio Garcia-Carbonero⁴, Ferran Losa⁵, Laia Layos⁶, Vicente Alonso⁷, Jaume Capdevila⁸, Javier Gallego⁹, Ruth Vera¹⁰, Antonieta Salud¹¹, Marta Martin-Richard¹², Miguel Nogué¹³, Elena Cillán¹⁴, Joan Maurel¹⁵, Iris Fauli¹⁶, Victoria Raymond¹⁶, Carlos Fernández-Martos¹⁷, and Clara Montagut¹

ABSTRACT

Purpose: Total neoadjuvant treatment (TNT) is a valid strategy for patients with high-risk locally advanced rectal cancer (LARC). Biomarkers of response to TNT are an unmet clinical need. We aimed to determine the value of circulating tumor DNA (ctDNA) to predict tumor response, recurrence, and survival in patients with LARC treated with TNT.

Experimental Design: The GEMCAD 1402 was a phase II randomized, multicentric clinical trial that randomized 180 patients with LARC to modified schedule of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) +/- aflibercept, followed by chemoradiation and surgery. Plasma samples were collected at baseline and after TNT within 48 hours before surgery (presurgery). An ultra-sensitive assay that integrates genomic and epigenomic cancer signatures was used to assess ctDNA status. ctDNA results were

correlated with variables of local tumor response in the surgery sample, local/systemic recurrence, and survival.

Results: A total of 144 paired plasma samples from 72 patients were included. ctDNA was detectable in 83% of patients at baseline and in 15% following TNT (presurgery). No association was found between ctDNA status and pathologic response. Detectable presurgery ctDNA was significantly associated with systemic recurrence, shorter disease-free survival (HR, 4; $P = 0.033$), and shorter overall survival (HR, 23; $P < 0.0001$).

Conclusions: In patients with LARC treated with TNT, presurgery ctDNA detected minimal metastatic disease identifying patients at high risk of distant recurrence and death. This study sets the basis for prospective clinical trials that use liquid biopsy to personalize the therapeutic approach following TNT.

Introduction

Preoperative administration of systemic chemotherapy, either before or after chemoradiation (CRT) or short-course radiation, also known as total neoadjuvant therapy (TNT), is a standard strategy to treat high-risk locally advanced rectal cancer (LARC). Compared with the conventional preoperative CRT followed by surgery and postoperative adjuvant chemotherapy, the TNT strategy demonstrated better toxicity profile and compliance with the systemic treatment without compromising local efficacy (1). More recently, two phase III trials have shown that TNT is associated

with higher pathologic complete response (pCR) rates and longer disease-free survival (DFS) or disease-related treatment failure (2, 3). Distant metastases, which potentially arise from systemic minimal residual disease (MRD) after surgery, undetectable by clinical examination, continue to be the main cause of treatment failure (1–3). While the value of pCR as a surrogate marker for survival is controversial, the neoadjuvant rectal (NAR) score (4–6) has recently been validated as a surrogate marker for DFS (6, 7). However, the NAR score is calculated after performing the rectal surgery because it integrates pathologic results from the tumor surgical specimen. Hence, presurgical identification of patients

¹Department of Medical Oncology, Hospital del Mar - IMIM, CIBERONC, Barcelona, Spain. ²Department of Pathology, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

³Department of Medical Oncology, Complex Sanitari Parc Tauli, Sabadell, Spain.

⁴Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Doce de Octubre, ImaS2, UCM, CNIO, CIBERONC, Madrid, Spain. ⁵Department of Medical Oncology, Hospital, Sant Joan Despi-Moises Broggi, Sant Joan Despi, Spain.

⁶Department of Medical Oncology, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut Català d'Oncologia, Badalona, Spain. ⁷Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Miguel Servet, IISA, CIBERONC, Zaragoza, Spain.

⁸Department of Medical Oncology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. ⁹Department of Medical Oncology, Hospital General Universitario de Elche, Elche, Spain. ¹⁰Department of Medical Oncology, Complejo Hospitalario de Navarra, Instituto de Investigaciones Sanitarias de Navarra (IdISNA), Pamplona, Navarra, Spain. ¹¹Department of Medical Oncology, Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, Lleida, Spain. ¹²Department of Medical Oncology, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain. ¹³Department of Medical Oncology, Hospital de Granollers, Granollers, Spain. ¹⁴Department of Medical Oncology, Hospital Sant Joan de Déu Fundació Althaia, Manresa, Spain. ¹⁵Department of

Medical Oncology, Hospital Clinic i Provincial de Barcelona, Barcelona, Spain.

¹⁶Guardant Health, Redwood City, California. ¹⁷Department of Medical Oncology, Hospital Quiron Salud, Valencia, Spain.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Corresponding Authors: Clara Montagut, Department of Medical Oncology, Hospital del Mar - IMIM, Passeig Marítim 25-29, Barcelona 08003, Spain. Phone: 349-3248-3137; E-mail: cmontagut@hospitaldelmar.cat; and Carlos Fernández-Martos, Department of Medical Oncology, Hospital Quiron Salud, Av. de Blasco Ibáñez, 14, Valencia 46010, Spain. Phone: 349-6369-0600; E-mail: carlosfmartos@institutooncologia.com

Clin Cancer Res 2021;XX:XX-XX

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4769

©2021 American Association for Cancer Research.

Translational Relevance

Total neoadjuvant therapy (TNT) is a valid strategy for patients with locally advanced rectal cancer (LARC) that may be followed by a watch-and-wait approach in selected patients. However, 30% of patients will still develop metastasis and die. In this prospective biomarker study, we assessed the role of circulating tumor DNA (ctDNA) before rectal surgery to predict response to TNT, relapse, and survival in patients with LARC. Using an ultrasensitive ctDNA assay that integrates genomic and epigenomic signatures, we found that presurgery ctDNA significantly identifies subjects at high risk of distant recurrence and death. On the contrary, presurgery ctDNA does not accurately predict local tumor response after TNT. Our data support the role of ctDNA as a biomarker of systemic minimal metastatic disease (MMD) rather than local tumor control, setting the basis for the design of prospective clinical trials to personalize the therapeutic approach in patients with LARC treated with TNT.

with minimal metastatic disease (MMD) who are potentially likely to recur at distant sites remains a challenge.

Several studies suggest that in patients who achieve a clinical complete response after administration of TNT, a close surveillance strategy [so called, nonoperative management (NOM) or watch-and-wait approach] is an acceptable alternative to rectal surgery, with the benefits of a proctectomy sparing approach (8). Biomarkers to select patients who are good candidates for a NOM strategy are not yet identified.

Circulating tumor DNA (ctDNA) analysis in patients with advanced solid tumors is a diagnostic alternative to traditional tissue molecular testing, with proven clinical utility (9–12). Emerging data support the use of ctDNA in patients with early-stage disease, treated with curative intent, to assess for MRD (12). Studies have shown that the presence of ctDNA is strongly associated with recurrence after curative treatment in localized tumors (13–15).

Our group completed a phase II randomized trial with the aim of examining the effect of an induction chemotherapy treatment with or without aflibercept plus a modified schedule of fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6), followed by standard CRT and total mesorectal excision (TME) surgery in patients with high-risk LARC treated with TNT in this trial. Early clinical results have been recently reported (15). Here, we report on a preplanned biomarker study of ctDNA in patients that participated in the substudy. The primary aim was to evaluate the association of baseline and post-TNT (presurgery) ctDNA status with clinical outcome markers, including pCR, NAR score, DFS, site of recurrence, and overall survival (OS).

Materials and Methods

Study design and participants

GEMCAD 1402 was an investigator-initiated phase II randomized trial, which recruited patients with high-risk LARC from 20 Spanish hospitals (16). The trial protocol was approved by the respective ethics committees of all participating institutions, and written informed consent was obtained from all patients prior to participation in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and followed the Consolidated Standards of Reporting Trials.

The eligibility criteria included patients ages 18–75 years with histologically confirmed rectal adenocarcinoma, with an inferior margin distal border below the peritoneal reflection. High-risk LARC was considered on the basis of high-resolution MRI clinical (c) staging. Tumors included were: (i) cT3 low-lying tumor at or below the elevators; (ii) cT3 tumors in the middle-third position extending 5 mm or more into the perirectal fat, or the presence of extramural venous invasion; (iii) cT3 tumors both at the distal- and middle-third positions with lymph node extending to within 1 mm of or beyond the mesorectal fascia; and (iv) any cT4 or cN2 tumors. Baseline thoracic and abdominal chemotherapy scan confirmed the absence of distant metastasis.

Patients were randomly assigned in a 2:1 ratio to arm A (induction chemotherapy with aflibercept plus mFOLFOX6) or arm B (induction chemotherapy with mFOLFOX6 alone). Both schemes were administered for six cycles, followed by 5 weeks of CRT with capecitabine. TME surgery was performed at 6–8 weeks after CRT completion in both treatment arms. The primary endpoint of the main study was the pCR rate defined as the absence of viable tumor cells in the primary tumor and lymph nodes (ypT0ypN0). Secondary endpoints included 3-year DFS and OS. Study protocol is available in Supplementary Data S1.

Serum carcinoembryonic antigen (CEA) level was collected at baseline and before surgery and measured by the local diagnostic laboratory at each participating site, with CEA concentrations of less than 5 ng/mL considered within reference range. Following completion of therapy, surveillance was performed according to standard of care, which included 3-monthly clinical review and CEA level and annual imaging for 3 years.

Biomarker substudy design and blood sample collection

The primary aim was to evaluate the association of ctDNA status with clinical outcome markers, including pCR, NAR score, DFS, site of recurrence, and OS. An independent written informed consent was obtained from all patients prior to participation in the biomarker substudy.

As per study design, blood samples were obtained from all patients prior to initiation of induction chemotherapy with mFOLFOX6 +/- aflibercept (baseline), and after completing all TNTs within 48 hours before surgery (presurgery). At each collection timepoint, 9–10 mL of whole blood was drawn into EDTA whole-blood collection tubes and centrifuged at 3,200 rpm for 15 minutes within the 3 hours after extraction. Plasma was aliquoted into 2 mL cryotubes for storage at -80°C . Samples were processed and aliquoted in each participant center.

Between January 2015 and March 2017, 180 patients were enrolled in the GEMCAD 1402 clinical trial and randomized to arm A (induction aflibercept plus mFOLFOX6 followed by CRT; $n = 115$) or arm B (induction mFOLFOX6 followed by CRT; $n = 65$). Patients with paired baseline and presurgery plasma samples and enough plasma quantity in both timepoints were selected for the biomarker substudy.

ctDNA analysis

The ctDNA assay selected for this study was a single-sample next-generation sequencing-based *in vitro* diagnostic assay validated for qualitative detection of cancer-derived cell-free DNA (cfDNA) in patients with colorectal cancer following resection and completion of standard-of-care therapy (MRD). The assay was performed in a single College of American Pathologists (CAP)-accredited and Clinical Laboratory Improvement Amendments–certified laboratory (LUNAR-1/ Guardant Reveal Guardant Health). This ctDNA test integrated

assessment of somatic alterations with an epigenomic cancer signature to return a result of either ctDNA detected or ctDNA not detected without *a priori* knowledge of tumor mutational status.

Briefly, whole blood was collected in EDTA or Streck blood collection tubes and ctDNA was extracted from isolated plasma as described previously (11). ctDNA fragments were then partitioned on the basis of DNA methylation level, barcoded, pooled, and sequenced using a 500 kb panel targeting both somatic and epigenomic regions. Sequencing data files were analyzed using a proprietary bioinformatics pipeline software to detect the presence of ctDNA based on genomic variation and epigenomic signals, and to exclude common sources of interference, such as clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP), using a proprietary bioinformatics caller (17). This integrated approach alleviates the need for tumor tissue sequencing and creation of bespoke panels and the need for white blood cell sequencing for assessment of CHIP.

Minimum plasma volume for this ctDNA assay was 4 mL with the goal of at least 10 ng of extracted cfDNA. Given the plasma volume in this cohort was below the minimum plasma volume, a pilot feasibility analysis was completed on paired samples from three subjects to ensure sufficient sample quality prior to full-cohort analysis. This pilot analysis assessed cfDNA yield and diversity, sample contamination, and quality of sequencing reads with the aim of determining sample quality prior to exhausting study samples for full analysis. All ctDNA analyses were performed blind to the treatment regimen and clinical outcomes.

Statistical analysis

DFS was defined as the time from randomization until recurrence, second primary tumor, or death, whichever occurred first, independently of whether patient underwent surgery or not. OS was defined as the time from randomization to death from any cause. The NAR score was developed as a composite short-term endpoint for clinical trials involving neoadjuvant therapy for rectal cancer and was calculated on the basis of clinical (c)T stage (1–4), pathologic (p)T stage (0–4), and pN stage (0–2; Supplementary Data S2). The NAR formula gives a relative weight of five for pN and three for downstaging of T and serves as a pseudocontinuous variable with 24 possible discrete scores from 0 to 100, with higher scores representing a poorer prognosis. On the basis of tertiles, NAR score was validated using the NSABP R-04 clinical trial patient dataset, categorizing the observed scores as low, intermediate, or high (4).

To compare the overall study cohort with the biomarker substudy cohort and identify any statistically significant differences, patient baseline characteristics and clinical outcomes were assessed using χ^2 and Fisher exact test for categorical variables, Spearman and Kendall tau correlations for ordinal variables, and *t* tests and Mann–Whitney (rank sum) test for continuous variables. Differences in survival times were estimated using the Kaplan–Meier method and the log-rank test. HRs were estimated by Cox proportional hazards models. ctDNA results from both study arms were analyzed together.

Data analysis was performed using R software version 3.6.3 or higher. The threshold for statistical significance was established at $P < 0.05$.

Results

Biomarker substudy flowchart is summarized in Fig. 1. Paired plasma samples at baseline and after completing TNT (presurgery) were collected from 86 patients (47%) from both treatment arms. After

processing, enough plasma at both timepoints was obtained from 72 patients (144 samples) that were included in the biomarker substudy. After ctDNA extraction and quality control (QC) analysis, 62 patients (97 samples) with good quality ctDNA at least at one timepoint were sequenced and included in the analysis.

Clinicopathologic and treatment arm characteristics according to ctDNA status are shown in Table 1. Median age was 60 years (range, 33–75) and 64.5% were male. Forty-four tumors (72.1%) were classified as cT3 and 43 (69.4%) as cN2. No significant differences in clinicopathologic features and treatment were found between the subset of patients included versus not included in the ctDNA analysis (Supplementary Table S1).

ctDNA analysis

Six paired baseline and presurgery samples from 3 patients were analyzed in the pilot feasibility assay prior to full-cohort analysis. Four of these (67%) samples passed QC analysis (total cfDNA yield between 40.3 and 120.25 ng). The two samples (33%) that failed QC analysis had less than 10 ng of isolated cfDNA. Following successful completion of the pilot assay, cfDNA analysis of the paired samples from the remaining 69 subjects was completed. Two of 138 samples failed cfDNA extraction (1%). Similar to QC results from the pilot assay, 43 samples (31%) failed QC analysis. The median volume of extracted cfDNA was 7.3 ng in the samples that failed QC analysis as compared with 21.4 ng in the 98 samples that passed QC.

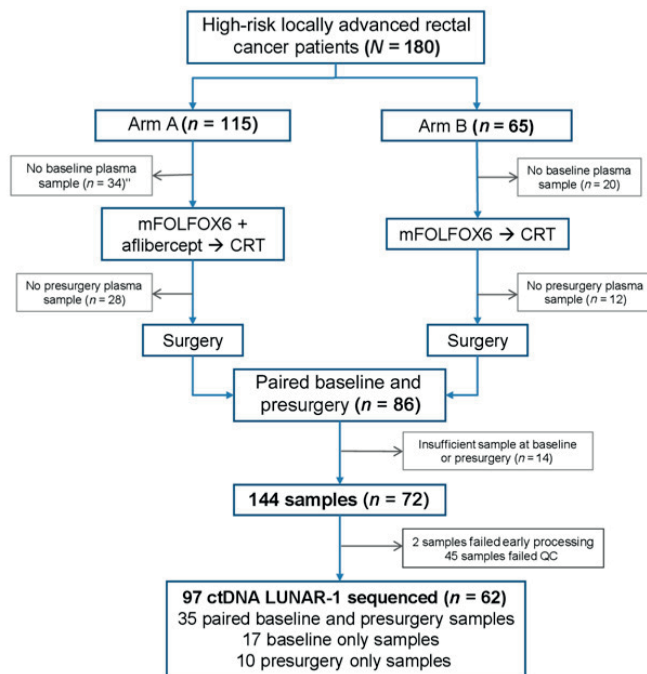
For samples that passed QC, the median baseline cfDNA was 16.64 ng (range, 3.8–110 ng) and median presurgery cfDNA was 24.9 ng (range, 5.7–120.3 ng). No differences between cfDNA total yields were found between treatment arms. Overall, ctDNA was detected in 43 of 52 (83%) of baseline samples and in seven of 45 (15%) of presurgery samples. A total of 23 subjects with paired baseline and presurgery samples showed ctDNA clearance following neoadjuvant treatment (66%), in 4 patients (11%) ctDNA remained positive at both timepoints, and in 7 patients ctDNA remained negative (20%) at both timepoints. In one subject, ctDNA emergence was detected. No differences in ctDNA dynamics were found between the two trial arms. Therefore, we herein report the results of the joint analysis, without distinction by treatment arm.

ctDNA detection and pathologic response to TNT

After completing TNT, 60 patients (97%) went through curative surgery and were included in the analysis. Pathologic analysis of surgical samples revealed pCR in 8 (13.3%) patients, ypT3–4 in 32 (53.3%) patients, and persistent node-positive disease (ypN1–2) in 17 (28.3%) subjects. Divided into tertiles, 12 (19.4%) patients had a low NAR score, 35 (56.5%) patients had a medium NAR score, and 15 (24.2%) patients had a high NAR score.

In the substudy cohort, pCR was neither associated with DFS ($P = 0.24$) nor OS ($P = 0.49$). However, high NAR score was significantly associated with worse DFS ($P = 0.0018$) and worse OS ($P = 0.024$) compared with low or medium NAR score (Supplementary Fig. S1). No statistically significant differences in prognosis were found between patients with low and medium NAR score.

There was no association between baseline ctDNA detection and pCR ($P = 0.134$). Among 45 patients with evaluable presurgery ctDNA, 5 patients achieved a pCR, of which 4 patients were ctDNA negative and 1 patient was ctDNA positive ($P = 0.66$). Presurgery ctDNA detection was not associated with pathologic ypT or ypN status in the rectal surgical specimen ($P = 0.8969$ and $P = 0.586$, respectively; Table 1). Neither baseline nor presurgery ctDNA status was associated with NAR score ($P = 0.6$ and $P = 0.9$,

**Figure 1.**

Study flowchart. Number of patients included in each of the analysis endpoints and reasons for exclusion are depicted. CRT, chemoradiation.

respectively; Table 1). Altogether, these data suggest that ctDNA detection is not a predictive biomarker of treatment response on the primary tumor as measured by pCR or NAR.

ctDNA status and risk of recurrence or death

As of December 2019, the median follow-up was 38 months (range, 2.3–51.5 months). During this period of time, 12 of 62 patients (19%) experienced disease recurrence, all of them involving distant sites. Risk of recurrence was not statistically different in the cohort of patients without ctDNA result (Supplementary Table S1).

Baseline ctDNA detection was not associated with survival outcome, neither DFS ($P = 0.59$) nor OS ($P = 0.38$; Fig. 2). Moreover, patients with ctDNA clearance following TNT had a similar prognosis to patients with persistent undetectable ctDNA before and after TNT (Fig. 3A and B).

Patients with presurgery-positive ctDNA had an increased risk of recurrence compared with patients with negative ctDNA [HR, 4.029; 95% confidence interval (CI), 1.004–16.16; $P = 0.033$] and a marked reduced survival (HR, 23; 95% CI, 2.4–212; $P < 0.0001$; Fig. 2). Kaplan–Meier estimates for DFS at 3 years were 66% and 84% for patients with presurgery-positive and -negative ctDNA, respectively. At 4 years, 84% of patients with undetectable presurgery ctDNA remained recurrence free compared with 33% of patients with detectable presurgery ctDNA. Similarly, the probability of OS rate was 97% both at 3 and 4 years for patients with undetectable presurgery ctDNA compared with 67% and 33%, respectively, in the detectable presurgery ctDNA subset of patients.

Altogether, presurgery ctDNA was shown to be a promising prognostic marker of recurrence and survival, independently of baseline ctDNA detection and ctDNA dynamics.

ctDNA and site of recurrence

Among 9 patients with disease recurrence and presurgery ctDNA available, 7 patients were limited to a single organ (2 patients in the liver, 3 patients with lung metastasis, and 2 patients with peritoneal involvement) and 2 patients developed multiple metastasis (both including the liver). Presurgery ctDNA was detectable in 3 of 4 patients (75%) who developed liver metastasis during the follow-up compared with 4 of 41 patients (9.8%) who never developed recurrence to the liver ($P = 0.009$; after Bonferroni multiplicity correction, $P = 0.054$). Sensitivity and specificity for presurgery ctDNA and liver recurrence were 0.75 (95% CI, 0.19–0.99) and 0.9 (95% CI, 0.77–0.97). Presurgery ctDNA was undetectable in all patients that recurred to the lung only or peritoneum only (Fig. 3C).

ctDNA, CEA, and clinical outcome

Paired ctDNA and CEA was available in 49 of 52 (94%) patients at baseline and 33 of 45 (73%) patients presurgery. Median baseline and presurgery CEA was 3.72 (0.50–115.5) and 1.39 (0.30–7.60), respectively, in patients included in the biomarker substudy.

At baseline, 15 of 49 (31%) patients had concurrent ctDNA positivity and elevated CEA, 26 (53%) had detectable ctDNA, but negative CEA, 4 patients (8%) had only elevated CEA, and the remaining 4 patients were negative for both biomarkers. No association was found between baseline ctDNA and CEA status and clinical outcome (Supplementary Fig. S2A and S2B).

At presurgery, 5 of 33 patients (15%) remained with an elevated CEA, 4 of them with positive ctDNA and 1 with undetectable ctDNA. Patients with both ctDNA positive and CEA presurgery elevated or CEA elevated had worse DFS compared with patients who were negative for both biomarkers ($P = 0.044$). Patients with ctDNA

Table 1. Baseline and treatment characteristics of patients.

	All patients (N = 62)	Baseline ctDNA (n = 52)		P	Presurgery ctDNA (n = 45)		P
		Negative (n = 9)	Positive (n = 43)		Negative (n = 38)	Positive (n = 7)	
Age, median (range)	62 (33–75)	66 (45–72)	59 (33–75)	0.143	62.5 (33–77)	66 (44–75)	0.772
Gender, male, n (%)	40 (64.5%)	7 (77.8%)	28 (65.1%)	0.462	22 (57.9%)	5 (71.4%)	0.502
Treatment, n (%)							
mFOLFOX6 + aflibercept	36 (58.1%)	8 (88.9%)	21 (48.8%)	0.028	23 (60.5%)	3 (42.9%)	0.384
mFOLFOX6	26 (41.9%)	1 (11.1%)	22 (51.2%)		15 (39.5%)	4 (57.1%)	
cT stage, n (%)							
T2	1 (1.6%)	0 (0.0%)	1 (2.4%)	0.085	1 (2.6%)	0 (0.0%)	0.1026
T3	44 (72.1%)	9 (100%)	28 (66.7%)		24 (63.2%)	7 (100.0%)	
T4	16 (26.2%)	0 (0.0%)	13 (31.0%)		13 (34.2%)	0 (0.0%)	
Missing	1	0	1		0	0	
cN stage, n (%)							
1	19 (30.6%)	5 (55.6%)	12 (27.9%)	0.11	13 (34.2%)	1 (14.3%)	0.3008
2	43 (69.4%)	4 (44.4%)	31 (72.1%)		25 (65.8%)	6 (85.7%)	
Tumor location, n (%)							
Middle	44 (71%)	7 (77.8%)	32 (74.4%)	1	28 (73.7%)	6 (85.7%)	1
Distal	18 (29%)	2 (22.2%)	11 (25.6%)		10 (26.3%)	1 (14.3%)	
CEA basal, median (range)	3.7 (0.5–115.5)	5.37 (1.9–18.9)	3.3 (0.5–115.5)	0.903	5.51 (0.5–115.5)	3.52 (2–5.6)	0.202
ypT stage, n (%)							
ypT0	8 (13.3%)	2 (22.2%)	2 (4.8%)	0.19	4 (10.5%)	1 (16.6%)	0.897
ypT1s	2 (3.3%)	0 (0.0%)	2 (4.8%)		2 (5.3%)	0 (0.0%)	
ypT1	3 (5%)	0 (0.0%)	1 (2.3%)		2 (5.3%)	0 (0.0%)	
ypT2	15 (25%)	3 (33.3%)	10 (23.8%)		10 (26.3%)	2 (33.3%)	
ypT3	30 (50%)	4 (44.4%)	25 (59.5%)		19 (50.0%)	3 (50%)	
ypT4	2 (3.3%)	0 (0.0%)	2 (4.8%)		1 (2.6%)	0 (0.0%)	
Missing	2	0	1		0	1	
ypN stage, n (%)							
0	43 (71.6%)	6 (66.7%)	29 (69%)	0.928	26 (68.4%)	4 (66.6%)	0.586
1	12 (20%)	3 (33.3%)	8 (19%)		11 (28.9%)	0 (0.0%)	
2	5 (8.3%)	0 (0.0%)	5 (12%)		1 (2.6%)	2 (33.3%)	
Missing	2	0	1		0	1	
Pathologic response, n (%)							
pCR	8 (13.3%)	2 (22.2%)	2 (4.8%)	0.077	4 (10.5%)	1 (16.7%)	0.660
Residual disease	52 (86.7%)	7 (77.8%)	40 (95.2%)		34 (89.5%)	5 (83.3%)	
Missing	2	0	1		0	1	
NAR, median (range)	8.4 (0–50.4)	8.43 (0.94–30.07)	14.98 (0.94–50.36)	0.556	8.43 (0–50.36)	11.71 (0.94–50.36)	0.181
NAR, n (%)							
Low	12 (19.4%)	2 (22.2%)	5 (11.6%)	0.598	17 (44.7%)	3 (42.8%)	0.900
Medium	35 (56.5%)	4 (44.4%)	26 (60.5%)		19 (50%)	3 (42.8%)	
High	15 (24.2%)	3 (33.3%)	12 (27.9%)		2 (5.3%)	1 (14.3%)	
CEA presurgery, median (range)	1.4 (0.3–7.6)	1.41 (1.1–3.68)	1.38 (0.3–7.6)	0.903	1.38 (0.5–6.93)	1.53 (1.23–4)	0.646

positive and CEA presurgery elevated had a significant worse OS compared with patients with both biomarkers negative or CEA positive, but ctDNA undetectable ($P = 0.014$; Supplementary Fig. S2C and S2D).

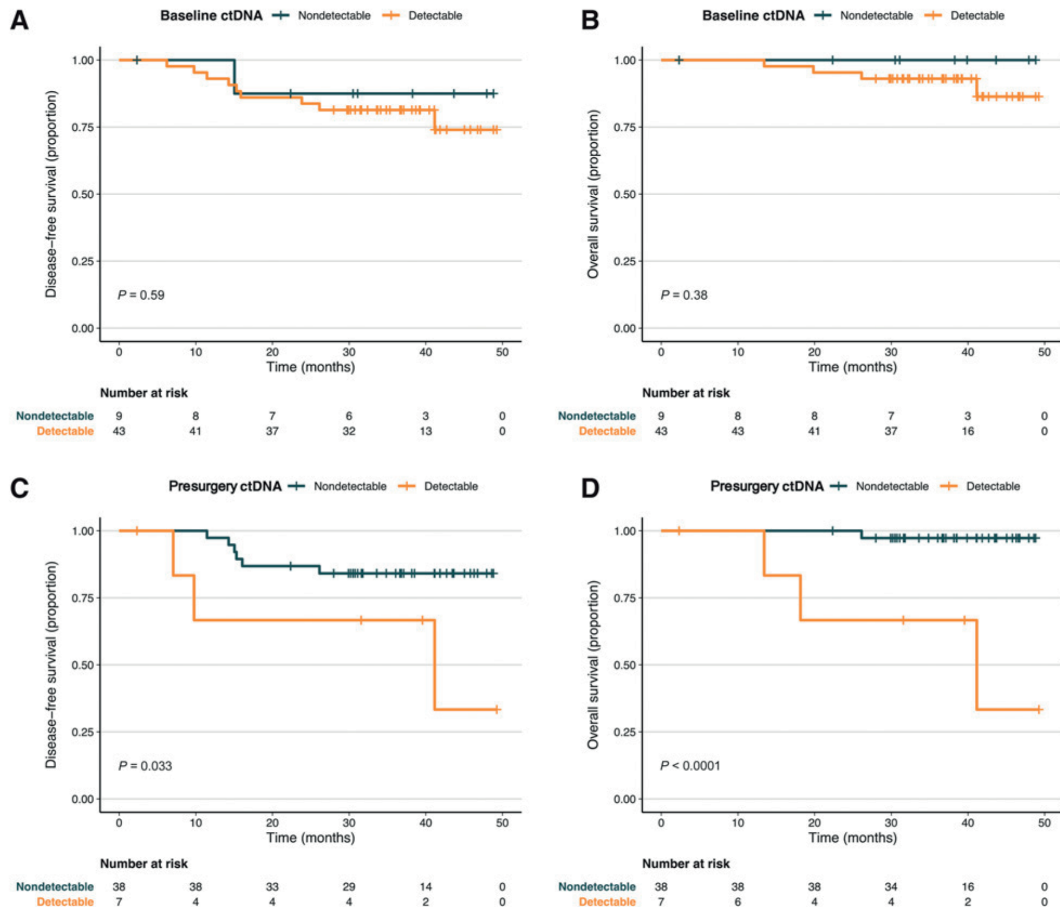
Discussion

GEMCAD 1402 was a phase II randomized, multicentric clinical trial which met its primary endpoint proving that the addition of aflibercept to mFOLFOX6 induction chemotherapy improves pCR rate compared with mFOLFOX6 alone (13.8% and 22.6%, respectively; $P = 0.15$; ref. 16) in patients with high-risk LARC. However, with a follow-up of 38 months, no benefit in DFS has been observed (18).

The current preplanned biomarker substudy from the GEMCAD 1402 trial shows that ctDNA before surgery is a promising predictive and prognostic biomarker that significantly detects MMD and predicts distant recurrence and survival in patients receiving a TNT approach.

Patients with presurgery ctDNA detection had a worse DFS compared with ctDNA undetectable patients (HR, 4.029; $P = 0.033$). Even more dramatic was the impact of ctDNA on OS. Patients with detectable presurgery ctDNA had a statistically significant increase in the risk of death (HR, 23; $P < 0.0001$), with an estimated 4-year OS of 33% compared with 97% for patients with undetectable presurgery ctDNA. Similarly, previous studies in localized colon (13–15, 19) and two recent studies in patients with LARC treated with standard preoperative CRT (20, 21) have shown the value of ctDNA to predict distant recurrence. To the best of our knowledge, this study is the first to demonstrate the value of ctDNA to predict not only recurrence, but also OS in LARC. This may be explained, in part, by the fact that patients had received full-dose systemic chemotherapy to potentially treat micrometastatic disease as part of a TNT strategy. Another important differential characteristic of this study is the technical approach for detecting ctDNA. While most previous studies of MRD in LARC had used droplet digital PCR to interrogate plasma-specific

Vidal et al.

**Figure 2.**

Kaplan-Meier estimates of DFS and OS according to baseline and presurgery ctDNA status. **A**, DFS in patients with baseline ctDNA detectable versus nondetectable. **B**, OS in patients with baseline ctDNA detectable versus nondetectable. **C**, DFS in patients with presurgery ctDNA detectable versus nondetectable. **D**, OS in patients with presurgery ctDNA detectable versus nondetectable.

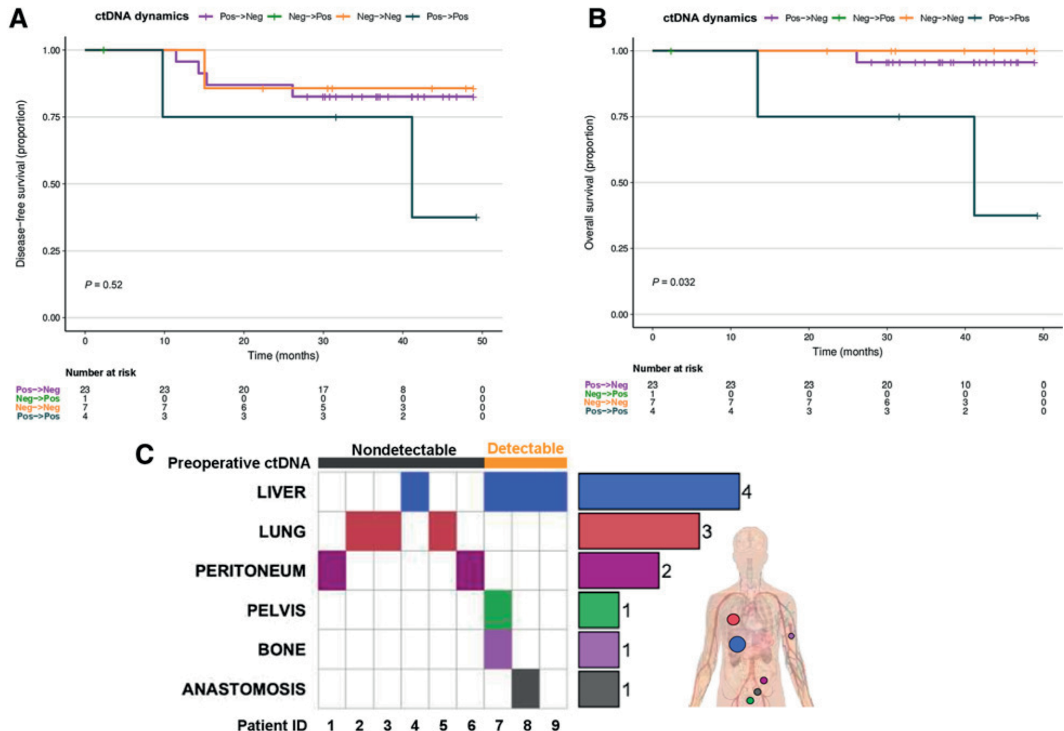
mutations detected previously in tumor tissue, this study used a next-generation sequencing approach that integrated both genomic and epigenomic signatures resulting in a more sensitive and more accurate detection of MMD before surgery.

Although presurgery blood samples were obtained within 48 hours before surgery, no association between ctDNA detection and pCR rates was found. These results are in line with other studies in LARC (18, 20, 21), supporting the idea that ctDNA analysis cannot differentiate between minimal versus no residual local disease. Moreover, we did not find a relationship with the NAR score. The prognostic role of NAR score by using the pathologic lymph node staging and the change between clinical and pathologic tumor stage were validated in the CAO/ARO/AIO-04 clinical trial (7). The lack of correlation between ctDNA and NAR score in our study suggests that ctDNA does not mirror changes in primary tumor staging. Our study supports the concept that ctDNA specifically reflects the presence of systemic disease rather than local minimal disease.

The concept of MRD refers to the persistence of disease after a potential curative surgery. We have proposed the term MMD to refer to the detection of ctDNA following total neoadjuvant systemic therapy in patients that are likely to recur at distant sites.

In the past years, there has been a dramatic improvement in the development of ctDNA technology. Currently, the efficacy of liquid biopsy is mainly limited by biology rather than a lack of technical sensitivity. In this study, although small numbers are presented, we can hypothesize that ctDNA may predict distant recurrence involving the liver more than metastasis to the peritoneum only or the lung only. This difference in ctDNA sensitivity related to the localization of the disease was also shown in previous works from our group and others in the metastatic setting (9, 22, 23). Another possibility is that this is related to tumor size, tumor growth rate, or cell turnover, as recently described using a mathematical theoretical model of ctDNA shedding in stage I–III lung cancer (24). A biological-based discovery to understand the multiple processes

Clinical Impact of ctDNA in Locally Advanced Rectal Cancer

**Figure 3.**

ctDNA tumor dynamics and recurrence pattern. **A**, DFS according to ctDNA changes at baseline and presurgery. **B**, OS according to ctDNA changes at baseline and presurgery. Only patients with paired baseline and presurgery ctDNA are represented in both Kaplan-Meier curves. In purple, patients with baseline ctDNA positive (pos) and presurgery ctDNA negative (neg; clearance); in green, patients with baseline ctDNA negative and presurgery ctDNA positive (emergence); in orange, patients with baseline ctDNA negative and presurgery ctDNA negative (remained negative); and in gray, patients with baseline ctDNA positive and presurgery ctDNA positive (remained positive). **C**, Presurgery ctDNA detection and recurrence pattern. Nine patients with tumor recurrence during the follow-up are shown. For each patient, the location of metastasis and presurgery ctDNA results are shown. Presurgery ctDNA from patient 7 detected epigenomic changes (methylation). Presurgery ctDNA from patient 8 was positive for a somatic mutation (APC R232X). Presurgery ctDNA from patient 9 detected epigenomic changes and a somatic mutation (APC p.Pro1439fs).

involved in ctDNA metabolism will be critical for further development of liquid biopsy.

This study is mainly limited by the small subset of analyzed patients from an initially large cohort. This was due to the limitation of some participating centers to collect and process the blood samples and the very small quantity of plasma collected because the study was designed to extract only 4.5 mL of blood at each timepoint. While QC analysis allowed for inclusion of only samples with sufficient DNA quality for analysis, lower sample volume and ctDNA input may reduce the sensitivity of this assay to detect ctDNA. One strength is the fact that all samples were collected within a prospective clinical trial which guarantees good sample quality from a homogeneous group of patients, and reliable and robust results. The small subset of patients available for analysis also precluded us from doing robust multivariable analysis that would potentially establish the independent role of ctDNA positivity and other known prognostic variables, such as ypN2 or pCR.

In conclusion, this study suggests that in patients with high-risk LARC treated with a TNT approach, presurgery liquid biopsy detects systemic MMD. Hence, it is a significant predictive biomarker of

systemic relapse (mainly to the liver) and ultimately a prognostic biomarker of death. Accordingly, future studies should evaluate whether presurgery ctDNA-positive patients should be managed as patients with metastatic rectal tumors (i.e., switch to chemotherapy, spare rectal surgery, and intensify treatment). This proof-of-concept study sets the basis for randomized prospective trials to investigate whether ctDNA-based therapeutic strategies improve outcomes in LARC treated with a TNT approach.

Authors' Disclosures

J. Vidal reports grants from SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) and TTD (Grupo de Tratamiento de los Tumores Digestivos) during the conduct of the study, and personal fees from Hoffman La-Roche, Merck-Serono, Sanofi, Guardant Health, and Bristol Myers Squibb outside the submitted work. B. Bellosillo reports personal fees from Biocartis, Thermo Fisher Scientific, Qiagen, Merck-Serono, BMS, and Pfizer, and grants and personal fees from Novartis, AstraZeneca, and Roche outside the submitted work. C. Pericay reports personal fees and nonfinancial support from Merck, and personal fees from Roche, Amgen, and Sanofi outside the submitted work. R. García-Carbonero reports grants from Sanofi during the conduct of the study, and personal fees from AAA, Advanz Pharma, Bayer, HMP, Ipsen, Merck, Midatech Pharma, MSD, Novartis, PharmaMar, Pfizer, Pierre Fabre, Roche, Sanofi,

and Servier outside the submitted work. L. Layos reports personal fees from Sanofi, Ipsen, Merck, Amgen, and Roche outside the submitted work. V. Alonso reports personal fees from Servier, Amgen, Sanofi, Merck Serono, Ipsen, Advanced Accelerator Applications, and Roche outside the submitted work. J. Capdevila reports grants and personal fees from Bayer, Eisai, Ipsen, and Adacap; personal fees from Lilly, Exelixis, Novartis, Pfizer, Hutchinson MediaPharma, and Merck; and grants from AstraZeneca and Roche outside the submitted work. R. Vera reports personal fees from Roche, MSD, Sanofi, Lilly, Amgen, and Merck outside the submitted work. E. Cillán reports personal fees and nonfinancial support from Amgen, Merck-Serono, and Hoffman La-Roche, and nonfinancial support from Sanofi outside the submitted work. J. Maurel reports grants from Amgen, Merck, and Incyte; nonfinancial support from NanoString; personal fees from Advance Medical, Cancer Expert Now, Fundación Clínica Universitaria, Sirtex, Pierre-Fabre, Servier, AstraZeneca, Roche, Sanofi, and Shire; and nonfinancial support from Biocartis outside the submitted work. J. Faull reports personal fees from Guardant Health Inc outside the submitted work. C. Fernández-Martos reports personal fees from Sanofi and grants from Amgen outside the submitted work. C. Montagut reports personal fees from Sanofi and grants and personal fees from Merck Serono, Roche, and Biocartis outside the submitted work. No disclosures were reported by the other authors.

Authors' Contributions

J. Vidal: Conceptualization, resources, data curation, supervision, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, writing—review and editing. **D. Casadevall:** Data curation, software, formal analysis, validation, visualization, methodology, writing—original draft, writing—review and editing. **B. Bellosillo:** Conceptualization, resources, supervision, validation, methodology, writing—review and editing. **C. Pericay:** Resources, visualization, writing—review and editing. **R. García-Carbonero:** Resources, visualization, writing—review and editing. **F. Losa:** Resources, validation, writing—review and editing. **L. Layos:** Resources, visualization, writing—review and editing. **V. Alonso:** Resources, visualization, writing—review and editing. **J. Capdevila:** Resources, visualization, writing—review

and editing. **J. Gallego:** Resources, visualization, writing—review and editing. **R. Vera:** Resources, visualization, writing—review and editing. **A. Salud:** Resources, visualization, writing—review and editing. **M. Martín-Richard:** Resources, visualization, writing—review and editing. **M. Nogué:** Resources, visualization, writing—review and editing. **E. Cillán:** Resources, visualization, writing—review and editing. **J. Maurel:** Resources, visualization, writing—review and editing. **I. Faull:** Resources, data curation, formal analysis, supervision, validation, visualization, methodology, writing—review and editing. **V. Raymond:** Resources, data curation, software, formal analysis, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, writing—review and editing. **C. Fernández-Martos:** Conceptualization, resources, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing. **C. Montagut:** Conceptualization, resources, formal analysis, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing.

Acknowledgments

The authors thank the patients, their families, and the sites participating in the study. Data management support was provided by PIVOTAL S.L.U. This study was supported by Instituto de Salud Carlos III – FEDER grant PI18/00031 and Fundación CRIS (Excellence 19-30) grant (to C. Montagut). J. Vidal was supported by SEOM and TTD grants. D. Casadevall was supported by ISCIII (Juan Rodés Research Contract JR18/00003).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received December 9, 2020; revised February 6, 2021; accepted March 10, 2021; published first March 16, 2021.

References

- Fernández-Martos C, García-Albeniz X, Pericay C, Maurel J, Aparicio J, Montagut C, et al. Chemoradiation, surgery and adjuvant chemotherapy versus induction chemotherapy followed by chemoradiation and surgery: long-term results of the Spanish GCR-3 phase II randomized trial. *Ann Oncol* 2015;26:1722–8.
- Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, Marijnen CAM, Putter H, Kranenbarg EM-K, et al. Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2021;22:29–42.
- Conroy T, Lamfichek N, Etienne P-L, Rio E, Francois E, Mesgouez-Nebout N, et al. Total neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer: final results of PRODIGE 23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. *J Clin Oncol* 2020;38:4007.
- George TJ, Allegra CJ, Yothers G. Neoadjuvant rectal (NAR) score: a new surrogate endpoint in rectal cancer clinical trials. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2015;11:275–80.
- Rose BS, Winer EP, Mamon HJ. Perils of the pathologic complete response. *J Clin Oncol* 2016;34:3959–62.
- Fokas E, Glynn-Jones R, Appelt A, Beets-Tan R, Beets G, Haustermans K, et al. Outcome measures in multimodal rectal cancer trials. *Lancet Oncol* 2020;21:e252–64.
- Fokas E, Fietkau R, Hartmann A, Hohenberger W, Grützmann R, Ghadimi M, et al. Neoadjuvant rectal score as individual-level surrogate for disease-free survival in rectal cancer in the CAO/ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *Ann Oncol* 2018;29:1521–7.
- Cercek A, Roxburgh CSD, Strombom P, Smith JJ, Temple LKF, Nash GM, et al. Adoption of total neoadjuvant therapy for locally advanced rectal cancer. *JAMA Oncol* 2018;4:e180071.
- Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2017;28:1325–32.
- Odegaard JJ, Vincent JJ, Mortimer S, Vowles JV, Ulrich BC, Banks KC, et al. Validation of a plasma-based comprehensive cancer genotyping assay utilizing orthogonal tissue- and plasma-based methodologies. *Clin Cancer Res* 2018;24:3539–49.
- Leigh NB, Page RD, Raymond VM, Daniel DB, Divers SG, Reckamp KL, et al. Clinical utility of comprehensive cell-free DNA analysis to identify genomic biomarkers in patients with newly diagnosed metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2019;25:4691–700.
- Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AIB, Boland P, et al. ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal-Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17:757–70.
- Tie J, Wang Y, Tomasetti C. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016;8:346ra92.
- Tie J, Cohen JD, Wang Y, Christie M, Simons K, Lee M, et al. Circulating tumor DNA analyses as markers of recurrence risk and benefit of adjuvant therapy for stage III colon cancer. *JAMA Oncol* 2019;5:1710–7.
- Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of plasma cell-free DNA by ultradeep sequencing in patients with stages I to III colorectal cancer. *JAMA Oncol* 2019;5:1124–31.
- Fernández-Martos C, Pericay C, Losa F, García-Carbonero R, Layos L, Rodríguez-Salas N, et al. Effect of aflibercept plus modified FOLFOX6 induction chemotherapy before standard chemoradiotherapy and surgery in patients with high-risk rectal adenocarcinoma: the GEMCAD 1402 randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2019;5:1566–73.
- Artieri C, Axelrod H, Baca A, Burke J, Chudova D, Dahdouli M, et al. Analytical validation of a tissue agnostic ctDNA MRD assay using tumor specific methylation and somatic variant profiles in early-stage CRC. *J Clin Oncol* 2020;38:e15549.
- Fernández-Martos C, Machado I, Pericay C, Salas N, Batlle JF, ten Hoor S, et al. Randomized phase II trial of modified (m) FOLFOX6 induction chemotherapy with or without aflibercept before standard chemoradiotherapy (CRT) and total mesorectal excision (TME) in patients with high-risk rectal adenocarcinoma (HRR): final results of the GEMCAD 1402, and by molecular subtypes. *J Clin Oncol* 2020;38:4102.

19. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V, Zúñiga S, Rentero-Garrido P, Huerta M, et al. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol* 2019; 30:1804–12.
20. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Li Lu, Christie M, Simons K, et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut* 2019;68:663–71.
21. Khakoo S, Carter PD, Brown G, Valeri N, Picchia S, Bali MA, et al. MRI tumor regression grade and circulating tumor DNA as complementary tools to assess response and guide therapy adaptation in rectal cancer. *Clin Cancer Res* 2020;26: 183–92.
22. Bachet JB, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, et al. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol* 2018;29:1211–9.
23. García-Foncillas J, Tabernero J, Élez E, Aranda E, Benavides M, Camps C, et al. Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between Onco- BEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2018;119:1464–70.
24. Avanzini S, Kurtz DM, Chabon JJ, Moding EJ, Hori SS, Gambhir SS, et al. A mathematical model of ctDNA shedding predicts tumor detection size. *Sci Adv* 2020;6:1–10.

Clinical Cancer Research

Clinical Impact of Presurgery Circulating Tumor DNA after Total Neoadjuvant Treatment in Locally Advanced Rectal Cancer: A Biomarker Study from the GEMCAD 1402 Trial

Joana Vidal, David Casadevall, Beatriz Bellosillo, et al.

Clin Cancer Res Published OnlineFirst March 16, 2021.

Updated version	Access the most recent version of this article at: doi:10.1158/1078-0432.CCR-20-4769
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://clincancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2021/03/15/1078-0432.CCR-20-4769.DC1

E-mail alerts [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

Reprints and Subscriptions To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org.

Permissions To request permission to re-use all or part of this article, use this link <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/early/2021/04/01/1078-0432.CCR-20-4769>. Click on "Request Permissions" which will take you to the Copyright Clearance Center's (CCC) Rightslink site.



• MATERIAL SUPPLEMENTARI ARTICLE 3

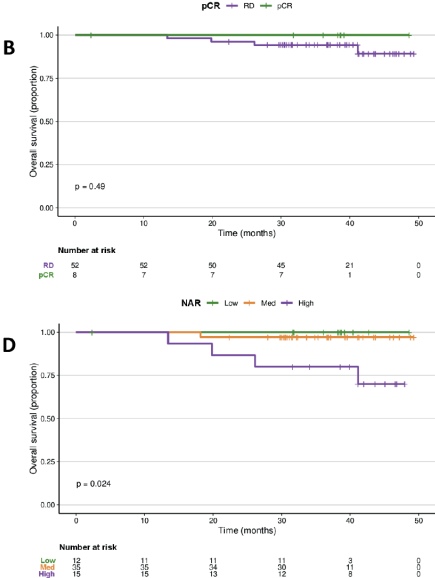
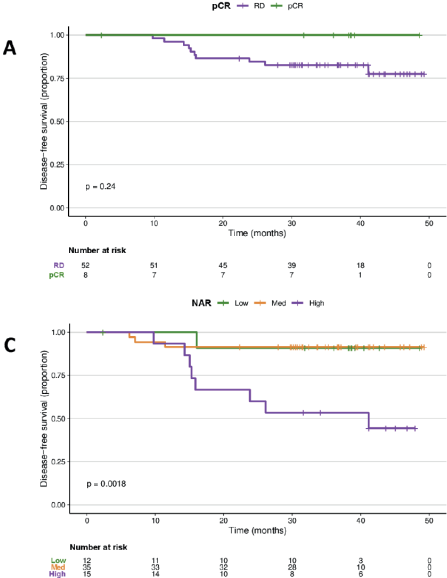


Supplementary Table 1 Baseline clinico-pathological characteristics from patients included versus not included in the ctDNA analysis

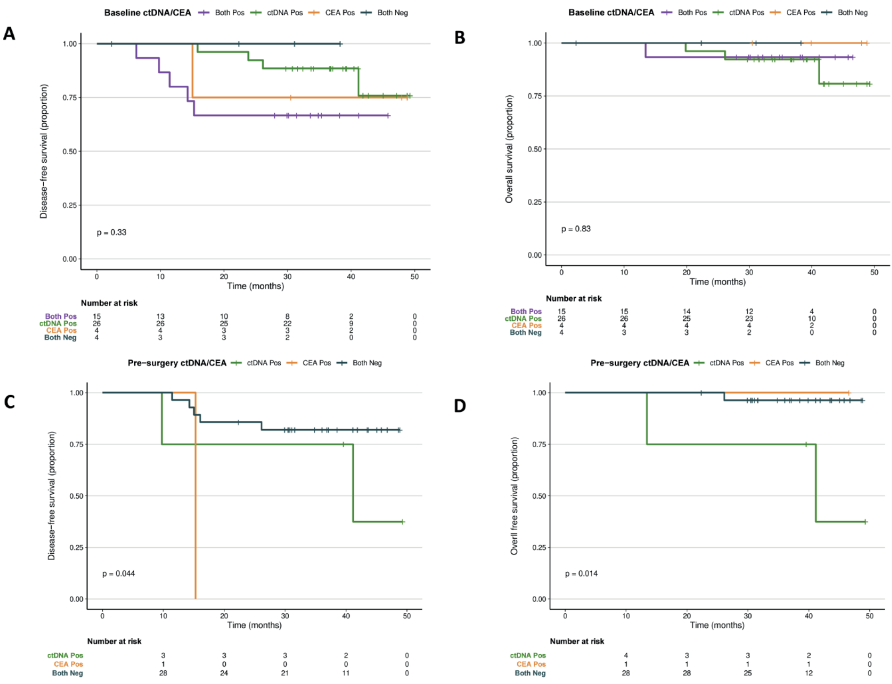
	No ctDNA subset (N=118)	ctDNA subset (N=62)	Total (N=180)	P value
Age , median [range]	62 (32-75)	62 (33-75)	62 (32-75)	0.707
Gender , male, n (%)	78 (66.1%)	40 (64.5%)	118 (65.6%)	0.832
Treatment , n (%)				
mFOLFOX6 + Afibercept	79 (66.9%)	36 (58.1%)	115 (63.9%)	0.238
mFOLFOX6	39 (33.1%)	26 (41.9%)	65 (36.1%)	
cT stage , n (%)				
T2	0 (0.0%)	1 (1.6%)	1 (0.6%)	0.085
T3	83 (70.9%)	44 (72.1%)	127 (71.3%)	
T4	34 (29.1%)	16 (26.2%)	50 (28.1%)	
Missing	1	1	2	
cN stage , n (%)				
1	36 (30.5%)	19 (30.6%)	55 (30.6%)	0.111
2	82 (69.5%)	43 (69.4%)	125 (69.4%)	
Tumor Location , n (%)				
Middle	89 (75.4%)	44 (71.0%)	133 (73.9%)	0.593
Distal	29 (24.6%)	18 (29.0%)	47 (26.1%)	
CEA basal , median [range]	4.2 (0.4 - 185.7)	3.7 (0.5 - 115.5)	3.8 (0.4- 185.7)	0.246
ypT stage , n (%)				0.194
ypT0	27 (25.7%)	8 (13.3%)	35 (21.2%)	
ypTis	3 (2.9%)	2 (3.3%)	5 (3.0%)	
ypT1	7 (6.7%)	3 (5.0%)	10 (6.1%)	
ypT2	26 (24.8%)	15 (25.0%)	41 (24.8%)	
ypT3	39 (37.1%)	30 (50.0%)	69 (41.8%)	
ypT4	3 (2.9%)	2 (3.3%)	5 (3.0%)	
Missing	13	2	15	
ypN stage , n (%)				0.928
0	82 (78.1%)	43 (71.7%)	125 (75.8%)	
1	11 (10.5%)	12 (20.0%)	23 (13.9%)	
2	12 (11.4%)	5 (8.3%)	17 (10.3%)	
Missing	13	2	15	
Path. response , n (%)				0.061
pCR	27 (25.7%)	8 (13.3%)	35 (21.2%)	

Residual disease	78 (74.3%)	52 (86.7%)	130 (78.8%)	
Missing	13	2	15	
NAR, median [range]	8.4 (0 - 65)	8.4 (0-50.4)	8.4(0 - 65)	0.393
NAR, n (%)				
Low	36 (30.5%)	12 (19.4%)	48 (26.7%)	0.273
Medium	58 (49.2%)	35 (56.5%)	93 (51.7%)	
High	24 (20.3%)	15 (24.2%)	39 (21.7%)	
CEA pre-op, median [range]	1.4 (0.2-81.3)	1.4 (0.3-7.6)	1.4 (0.2-81.3)	0.249
Recurrence, yes (%)	31 (26.3%)	12 (19.4%)	43 (23.9%)	0.301
Death, yes (%)	14 (11.9%)	5 (8.1%)	19 (10.6%)	0.430

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Material

Calculation of the neoadjuvant rectal (NAR) score.

$$\text{NAR} = \frac{[5pN - 3(cT - pT) + 12]^2}{9.16}$$

cT is an element of the set (1, 2, 3, 4), pT is in (0, 1, 2, 3, 4), and pN is in (0, 1, 2). cT

clinical tumor stage, pT pathologic tumor stage, pN pathologic nodal stage¹

George TJ, Allegra CJ, Yothers G. Neoadjuvant Rectal (NAR) Score: a New Surrogate Endpoint in Rectal Cancer Clinical Trials. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2015;11(5):275-280. doi:10.1007/s11888-015-0285-2





La biòpsia líquida mitjançant la detecció de molècules d'ADN provinents de tumor en el plasma ha suposat un canvi de paradigma en el diagnòstic molecular del càncer. Tot i que el seu descobriment és de fa més de 50 anys, no ha estat fins als darrers 10-15 anys que la tecnologia ha evolucionat suficientment com per poder detectar de forma fiable ADNct.

Des d'aleshores, els treballs on s'estudia l'ADNct i les seves potencials aplicacions clíniques s'han anat succeint permetent la implementació de la biòpsia líquida basada en ADNct com una eina que està canviant el diagnòstic, el tractament i el seguiment dels pacients amb càncer.

L'objectiu principal d'aquesta tesi era el d'avaluar la utilitat clínica de l'estudi de l'ADNct en el diagnòstic i monitoratge en CCR i ho hem fet mitjançant tres treballs en dos escenaris diferents, el càncer colorectal metastàtic i el càncer de recte localment avançat.

Avaluació de la concordança de l'estat mutacional de *RAS* entre teixit i plasma en CCRm

El primer pas per a determinar el valor potencial de la biòpsia líquida en pràctica clínica era demostrar la detecció en ADNct de les mutacions trobades en teixit. El nostre primer estudi demostra que la biòpsia líquida en pacients amb CCRm mitjançant el test de PCRd OncoBEAM RAS CRC™ és una eina eficient i precisa en l'avaluació de l'estat mutacional de *RAS*, comparat amb el gold estàndard (teixit). L'elevada concordança entre la determinació de *RAS* en plasma i en teixit observada en més de 100 pacients avaluats en un entorn de pràctica clínica dona suport a l'ús de proves basades en sang com una alternativa viable l'estudi en teixit per a la selecció de pacients amb CCRm a rebre tractament anti-EGFR.

Estudis previs havien demostrat l'eficàcia de la detecció d'ADNct en pacients amb CCRm en un entorn de recerca i utilitzant panells de PCRd dissenyats per a cada individu en funció de la mutació prèviament detectada en teixit (88,123,156). En paral·lel i posteriorment al nostre treball, diferents grups han aportat evidència que suporta l'ús de biòpsia líquida en el diagnòstic molecular de *RAS* en pacients amb CCRm utilitzant plataformes comercials (170–173). La concordança global entre





teixit i plasma dels diferents estudis oscil·la entre el 78% i el 95%. En el nostre cas era del 93%, amb una concordança positiva (capacitat de la biòpsia líquida per detectar mutacions presents en teixit) de fins al 96.4%. Una dada també interessant del nostre estudi és la concordança negativa d'un 90%, és a dir, en un 10% en casos la biòpsia líquida era capaç de detectar mutacions en *RAS* que no s'observaven en el fragment de teixit estudiat.

En un esforç per explicar les discrepàncies entre el plasma i el teixit, així com per entendre millor la biologia de l'ADNct, vam identificar diverses característiques clínico-patològiques relacionades amb la limitació de detecció de *RAS* en plasma. Vam descriure que els pacients amb metàstasis únicament peritoneals o pulmonars, o la histologia mucinosa eren la principal limitació per a la detecció d'ADNct. Per contra, no es va trobar cap correlació entre la detecció d'ADNct i el nombre de metàstasi, la localització del tumor primari o haver realitzat cirurgia prèvia del primari. Encara que els números eren petits, aquestes dades suggerien per primera vegada que les característiques biològiques intrínseques del tumor (i no només la càrrega tumoral com s'havia descrit anteriorment) afecten l'alliberament d'ADNct al torrent sanguini.

La correlació entre la localització de les metàstasi i l'alliberació tumoral d'ADNct ha estat validada en estudis posteriors (174,175) i reconeguda com un dels principals factors causants de falsos negatius en la utilització de la biòpsia líquida. Aquest subgrup s'ha anomenat "tumors no alliberadors de DNA" (en anglès "non-shedder tumors") i inclouen principalment la disseminació peritoneal o pulmonar i, en el cas de la detecció de MMR, la recidiva únicament local (176).

Per tal d'optimitzar l'aplicació clínica del diagnòstic molecular mitjançant biòpsia líquida, també vam estudiar factors externs que poden influir en el resultat. La troballa més rellevant va ser que l'administració d'un tractament sistèmic previ a l'extracció de la mostra de sang té un clar impacte negatiu en la capacitat de detectar ADNct. Aquest fet denota la importància de recollir plasma per a l'anàlisi basal de mutacions de *RAS* abans de l'inici de qualsevol teràpia oncològica independentment de l'ús de tractament anti-EGFR.

En global, les nostres dades mostren que la biòpsia líquida és un mètode mínimament invasiu i altament sensible per a l'avaluació de *RAS* en plasma de pacients amb





CCRm. Treballs com el nostre han contribuït a establir l'ús de la biòpsia líquida com una alternativa a l'estudi de mutacions en teixit acceptada per les principals societats oncològiques (145,154).

Utilitat de la biòpsia líquida per la valoració precoç de resposta al tractament en CCRm

Un cop validada la utilitat clínica de la biòpsia líquida pel diagnòstic molecular en CCRm, el següent objectiu era avaluar la seva utilitat en la valoració de resposta al tractament i estudiar el potencial benefici respecte les tècniques d'avaluació d'imatge convencionals.

En el nostre primer estudi vam observar, en una cohort de 21 pacients, la capacitat del seguiment de les mutacions de *RAS* en ADNct en el monitoratge i avaluació de resposta dels pacients amb CCRm tractats amb quimioteràpia +/- fàrmac biològic. Així, en pacients amb tumors *RAS* mutats i biòpsies líquides seriades, la disminució de *RAS* en ADNct es correlacionava amb la resposta clínica i radiològica al tractament i va ser un predictor primerenc de resposta. Aquestes troballes ratificaven les d'un estudi previ publicat a 2015 per Tie i col·laboradors (151). Tot i que sense dades estadísticament avaluables, els resultats observats suggerien que la resposta per biòpsia líquida precedia a la valoració estàndard radiològica per criteris RECIST.

Amb els resultats d'aquestes dades preliminars vam dissenyar l'estudi PLATFORM-B amb l'objectiu d'avaluar la utilitat clínica de la biòpsia líquida per a determinar resposta precoç en pacients amb CCRm *RAS* wt tractats en primera línia amb quimioteràpia i cetuximab. Aquest estudi es va dur a terme a 15 hospitals espanyols en el marc del grup de tractament de tumors digestius TTD i va ser el primer estudi prospectiu en interrogar el paper de la biòpsia líquida en aquest subgrup de pacients.

Mitjançant un enfocament integral basat en NGS, el nostre estudi mostra que una avaluació dual de la dinàmica de l'ADNct que inclogui (a) canvis primerencs en la mutació troncal (descrita com la mutació amb major freqüència al·lèlica mutada (MAF) en cada pacient) i (b) canvis en les mutacions de resistència a anti-EGFR, detecta una resposta precoç al tractament i prediu el benefici clínic. Amb la avaluació conjunta d'aquesta informació vam descriure dos grups de pacients: aquells amb





“resposta molecular primerenca” on s’observava una disminució de la MAF de la mutació troncal sumat a una disminució de la MAFr de les mutacions de resistència a anti-EGFR; i un grup de pacients amb “progressió molecular primerenca” on hi havia un augment de la MAF de la mutació troncal o un augment de la MAFr de les mutacions de resistència a anti-EGFR.

Després de dos cicles de quimioteràpia + anti-EGFR, aquells pacients on s’observava una “resposta molecular primerenca” per ADNct obtenien una SLP i una taxa de resposta superior als pacients amb “progressió molecular precoç”. Aquestes diferències eren clínicament molt rellevants amb una HR de 0.18 i una SLP mitjana de 18.84 mesos vs. 5.58 mesos ($p < 0.001$) i una taxa de respostes del 75% en pacients amb resposta molecular primerenca vs. tan sols del 25% en el grup de progressió molecular precoç ($p = 0.008$).

A la pràctica clínica seleccionem els pacients candidats a tractament anti-EGFR mitjançant l’estudi de les mutacions de *RAS* en teixit i fem una primera valoració de resposta després de tres mesos de quimioteràpia + anti-EGFR. Amb aquestes eines, la SLP esperada a una primera línia de quimioteràpia + anti-EGFR és de 10 mesos i aproximadament un 15% dels pacients no obtindran benefici del tractament segons criteris RECIST (65,67,177). Gràcies a la avaluació mitjançant biòpsia líquida podem, no només preveure quins seran els pacients que es beneficiaran del tractament durant un llarg període, sinó poder detectar de forma precoç aquell subgrup de pacients que seran ràpids progressors. En el nostre estudi hem detectat un 15% “progressors moleculars primerencs” després de 2 cicles de quimioteràpia, xifra que es correlaciona amb els pacients que no es beneficien de tractament en l’avaluació rutinària després de 6 cicles. Amb el nostre mètode d’anàlisi per biòpsia líquida som capaços d’avançar-nos dos mesos a la resposta radiològica evitant així mantenir un tractament potencialment tòxic com és la quimioteràpia i els fàrmacs anti-EGFR en aquells pacients sense benefici.

Tot i que els estudis clínics limiten el benefici del tractament amb anti-EGFR a aquells pacients amb tumors originats en el còlon esquerre (51,69,70), la predicció de benefici mitjançant biòpsia líquida era independent a la lateralitat del tumor primari, de tal manera que els pacients amb resposta molecular primerenca obtenien major SLP tan en tumors de còlon dret com esquerre.





Altres estudis recents també han explorat el paper de la biòpsia líquida en la valoració precoç al tractament sistèmic en CCRm. Alguns grups suggereixen que variacions en la concentració de l'ADNct total es pot utilitzar per controlar la resposta a la quimioteràpia (151–153) però cap d'ells és específic de primera línia amb quimioteràpia + anti-EGFR ni tenen en compte l'evolució clonal de mutacions de resistència a anti-EGFR.

Amb l'objectiu de millorar la selecció molecular dels pacients amb CCRm candidats a tractament anti-EGFR, diversos treballs han intentat definir el llindar de la MAF basal de *RAS* en ADNct que predigui resposta a tractament (153,175,178,179). Els resultats d'aquests estudis han estat dispars i inherentment afectats per les característiques de l'estudi i la metodologia utilitzada. Sabem que les tècniques de PCRd d'ADNct ofereixen major sensibilitat en comparació amb les tècniques de NGS (174,180). Tot i així, una major sensibilitat de detecció de mutacions no confereix necessàriament una millora en la resposta del pacient al tractament anti-EGFR, com hem descrit en un estudi previ d'anàlisi de mutacions en teixit (80). En el nostre treball mostrem que, en una població seleccionada de pacients amb CCRm *RAS* wt en teixit, la presència de mutacions basals de *RAS* en biòpsia líquida no impedeix que els pacients responguin a la quimioteràpia més cetuximab. Tot i que donat el reduït nombre de pacients no es poden extreure conclusions, veiem com la presència de mutacions de *RAS/BRAF* basal amb MAF $\geq 1\%$ va discriminar numèricament per SLP. Això pot suggerir que les mutacions de resistència detectades a una MAF molt baixa representen només petites subclones dins del volum total de tumor que no impedeixen la resposta global del tumor.

En el nostre treball també mostrem com qualsevol disminució de l'ADNct als dos cicles de tractament prediu resposta i no es pot establir un percentatge de canvi en l'ADNct a partir del qual discriminar pacients responedors de no responedors com es mostra en treballs anteriors (151–153). Definir un valor de tall general i comú com a marcador de resposta pot estar esbiaixat per les característiques específiques de la cohort explorada i la tecnologia utilitzada. Per contra, els canvis en la concentració de l'ADNct en cada pacient durant el tractament són intrínsecs a l'individu i al tumor. Per tant, un canvi relatiu en l'ADNct d'un pacient durant el tractament és potencialment una millor manera per predir la resposta al tractament que la recerca d'un punt de tall numèric de disminució d'ADNct.





Utilitat de la biòpsia líquida per a la detecció de resistència adquirida a fàrmacs anti-EGFR

L'aparició de mutacions de resistència és la principal limitació en l'eficàcia de les teràpies dirigides. Els nostre grup i d'altres ja havíem reportat prèviament que el principal mecanisme de resistència adquirida a fàrmacs anti-EGFR en CCRm és l'emergència de mutacions en la via de les MAPK (especialment de *RAS*) i en EGFR-ECD, i que aquestes es poden detectar a la sang dels pacients (85–89).

En el primer estudi d'aquesta tesi vam utilitzar la tècnica de PCRd OncoBEAM RASCRC™ com a prova de concepte per a demostrar la detecció de mutacions de *RAS* emergents a la sang de pacients amb CCRm tractats amb fàrmacs anti-EGFR en pràctica clínica. En una mostra de 18 pacients tractats amb quimioteràpia + anti-EGFR o amb anti-EGFR en monoteràpia vam observar un 40% d'emergència de mutacions de *RAS* en sang perifèrica, dades que confirmaven els resultats obtinguts en els treballs transnacionals prèviament mencionats.

A l'estudi PLATFORM-B vam utilitzar una tècnica de NGS que ens permetés l'avaluació integral de múltiples mutacions de resistència adquirida (*RAS*, *BRAF* i *EGFR-ECD*). En pacients on s'observaven mutacions de resistència a anti-EGFR després de dos cicles de tractament es realitzava un monitoratge per biòpsia líquida en mostres de sang en el moment de la primera valoració radiològica de resposta i a la progressió al tractament. L'anàlisi longitudinal de mostres de plasma va revelar que no totes les clones de *RAS/BRAF* detectades precoçment després de dos cicles es comportaven igual o tenien el mateix significat clínic. En pacients amb un augment de la MAF relativa de *RAS/BRAF* previ al tercer cicle, les clones de *RAS/BRAF* s'expandien progressivament durant el tractament fins a la progressió i es correlacionava amb una SLP més curta. Per contra, en pacients on la variant al·lèlica mutada de *RAS/BRAF* es mantenia o disminuïa després de dos cicles de tractament, aquesta subclona no s'expandia i no era necessàriament la clona principal de resistència a la progressió, sinó que coexistia amb altres subclones de resistència (principalment EGFR-ECD). En aquests pacients la SLP va ser més llarga.

Com era d'esperar, totes les mutacions primerenques de resistència detectades en pacients tractats amb teràpia anti-EGFR eren mutacions de *RAS/BRAF*, mentre que



les mutacions EGFR-ECD van sorgir més tard durant el bloqueig d'EGFR. Això està en línia amb resultats anteriors que mostren que no totes les mutacions de resistència es creen iguals i que la resistència a la teràpia anti-EGFR es produeix en múltiples ones d'expansió clonal. Mentre que les mutacions *RAS* es seleccionen sota estrès ambiental i s'expandeixen ràpidament, les subclones EGFR-ECD sorgeixen de forma tardana durant l'evolució del tumor impulsada per fàrmacs anti-EGFR (85,89,181). D'altra banda el percentatge de mutacions de resistència a anti-EGFR detectades en aquests pacients tractats amb quimioteràpia + fàrmac anti-EGFR en primera línia va ser inferior al percentatge reportat en estudis previs del nostre grup i altres en pacients politractats i/o que rebien anti-EGFR en monoteràpia. Un estudi recent ha demostrat també aquesta incidència inferior de mutacions de *RAS* en pacients en tractament en primera línia amb quimioteràpia + anti-EGFR, suggerint altres mecanismes involucrats en l'adquisició de resistència a més de l'expansió clonal com ara canvis en el microambient tumoral (104,105).

En conjunt, el nostre estudi confirma que l'anàlisi de l'ADNct mitjançant tècniques de NGS permet la detecció de diferents subclones que porten múltiples mutacions de resistència i permet una major comprensió de la biologia tumoral adaptativa en pacients tractats amb fàrmacs anti-EGFR.

Utilitat de la biòpsia líquida per a la detecció de malaltia mínima residual després de tractament neoadjuvant en CRLA

El tercer aspecte clínic que volíem explorar en aquesta tesi era la utilitat de la biòpsia líquida per a la valoració de resposta en pacients amb CRLA que havien rebut tractament neoadjuvant total.

Per a fer-ho vam dissenyar un estudi de biomarcadors dins l'assaig clínic GEMCAD 1402. GEMCAD 1402 és un assaig clínic aleatoritzat multicèntric fase II realitzat en el marc del "Grupo Español Multidisciplinar en Cáncer Digestivo" (GEMCAD) que va demostrar que l'addició d'aflibercept a la quimioteràpia d'inducció de mFOLFOX6 en pacients amb CRLA millora la taxa de RCp en comparació amb mFOLFOX6 sol (13,8% i 22,6%, respectivament; $p=0,15$) (30). Tanmateix, amb un seguiment de 38 mesos, no s'ha observat benefici en SLR quan s'afegeix aquest antiangiogènic al tractament neoadjuvant total (182).





El nostre estudi mostra que l'ADNct abans de la cirurgia és un biomarcador predictiu i pronòstic capaç de detectar la presència de malaltia mínima metastàtica (MMM) no visible per proves d'imatge convencionals i predir la recurrència a distància i la supervivència en pacients que reben TNT. Els pacients amb biòpsia líquida positiva abans de la cirurgia tenien un SLR pitjor en comparació amb els pacients sense ADNct (HR=4.029; p=0,033). Encara més rellevant va ser l'impacte de la relació entre la detecció d'ADNct i la supervivència. Els pacients amb ADNct previ a la cirurgia tenien risc de mort 23 vegades superior en comparació als pacients amb ADNct preoperatori indetectable (p<0,0001), amb una probabilitat estimada de supervivència als 4 anys del 33% vs. el 97% respectivament.

En els darrers anys s'ha publicat diferents estudis en càncer de còlon localitzat (160–163) i càncer de recte tractats amb QRT preoperatori estàndard (166,167) que mostren el valor de la biòpsia líquida per predir recurrència a distància després de la cirurgia. El nostre estudi és el primer en demostrar l'impacte de la biòpsia líquida en la predicció de supervivència en pacients amb càncer de recte tractats amb neoadjuvència.

Una troballa interessant del nostre treball és el fet que no es va observar cap associació entre la detecció d'ADNct i les taxes de RCp en la cirurgia ni amb la classificació per NAR, suggerint que l'ADNct no reflecteix els canvis en l'estadiatge del tumor primari. Els nostres resultats concorden amb els dels altres dos estudis publicats en càncer de recte on tampoc s'observava relació entre els resultats de biòpsia líquida i la RCp després del tractament neoadjuvant (166,167). En línia amb aquests resultats, recentment s'han comunicat dades de l'estudi DYNAMIC-II d'adjuvència en càncer de còlon on s'observa que la biòpsia líquida no és capaç de detectar aquells casos que presenten recaiguda local durant el seguiment (165,176). Així doncs, el nostre estudi dona suport al concepte que l'ADNct reflecteix específicament la presència de malaltia sistèmica en lloc de malaltia mínima local. Així, el terme àmpliament utilitzat en biòpsia líquida de detecció de malaltia mínima residual (MMR) fa referència a la persistència de la malaltia després d'una cirurgia potencialment curativa. Nosaltres hem encunyat el terme malaltia mínima metastàtica (MMM) per referir-nos a la detecció d'ADNct després del tractament neoadjuvant i previ a la cirurgia com a indicador de risc recaiguda a distància.





Una altra característica diferencial important del present estudi és l'enfocament tècnic per detectar l'ADNct. Si bé en la majoria d'estudis previs de MMR en CCR s'utilitza una tècnica de PCRd per interrogar en plasma mutacions analitzades prèviament al teixit tumoral, en aquest estudi vam utilitzar un enfocament mitjançant NGS que integra signatures tant genòmiques com epigenòmiques, donant lloc a una detecció més sensible i precisa d'ADNct. Tot i la utilització d'una tecnologia d'última generació, la presència d'ADNct continuava sent limitada en els pacients que desenvolupaven metàstasi únicament peritoneals o pulmonars. Per contra, era molt sensible en la detecció de MMM en pacients que durant el seguiment presentarien metàstasi hepàtiques.

En global, les nostres troballes donen suport al paper de la biòpsia líquida com a biomarcador de malaltia sistèmica a distància en pacients amb càncer de recte localment avançat tractats amb l'estratègia de TNT. Per contra, donada la manca de relació entre l'ADNct pre-quirúrgic i la RCp del tumor primari, no podem establir que la biòpsia líquida sigui una bona eina per a la valoració de pacients candidats a estratègia de preservació d'òrgan.

Impacte de la tècnica utilitzada per a la detecció d'ADNct

Com he anat revisant en el decurs de la discussió, un aspecte determinant en biòpsia líquida és la tècnica que s'utilitzarà per a la detecció d'ADNct. Aquestes tècniques poden anar des de la PCRd per a la detecció de mutacions puntuals en un sol gen fins a panells de NGS on s'integra la seqüenciació de diferents regions genòmiques amb la detecció d'alteracions epigenòmiques o fragmentòmiques.

El nostre estudi publicat a 2017 de concordança entre teixit i plasma va ser un dels primers en utilitzar una tècnica comercial de PCRd que interrogava en una sola mostra un total de 34 mutacions en *KRAS* i *NRAS* determinants en càncer de còlon. Aquesta tècnica conferia una molt elevada sensibilitat però un nombre limitat de mutacions puntuals en un sol gen a estudi. Com hem demostrat posteriorment a l'estudi PLATFORM-B, per tal de poder fer un diagnòstic molecular precís i una valoració integral dels mecanismes de resistència adquirida necessitem plataformes de NGS que analitzin una varietat de gens implicats en cada subtipus tumoral.





Tan en l'estudi PLATFORM-B com en l'estudi GEMCAD-1402 hem utilitzat plataformes de NGS. Això és clarament un punt distintiu amb la majoria d'estudis previs publicats on s'utilitzava PCRd per interrogar mutacions específiques de plasma detectades prèviament al teixit tumoral (152,153,160,161,166,167). Les tècniques de NGS tenen diversos avantatges respecte la PCRd, la principal de les quals és el genotipat tumoral sense necessitat de disposar d'informació molecular sobre el tumor primari. A més, donada l'extensa cobertura genòmica permet detectar alteracions moleculars subclonals. Les potencials limitacions inclouen la necessitat de quantitats superiors d'ADNc (entre 20 i 50 ng per mostra a analitzar) i la sensibilitat de detecció de mutacions que és entorn a un 0.1%, clarament inferior a les tècniques de PCRd.

Les dues tècniques de NGS utilitzades en els nostres estudis son també diferents entre elles. A l'estudi PLATFORM-B es va utilitzar Oncomine™ Colon cfDNA Assay amb cobertura en regions "hotspot" dels 14 gens més freqüentment implicats en CCR (*AKT1*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *FBXW7*, *GNAS*, *KRAS*, *MAP2K1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *SMAD4*, *TP53* i *APC*) amb llindar de sensibilitat de detecció de mutacions del 0.1%. Tot i així en, el 27,7% dels pacients del nostre estudi no vam poder detectar ADNct en la mostra basal. A l'estudi GEMCAD-1402 vam utilitzar la plataforma de NGS LUNAR-1/Guardant Reveal™ que integra l'avaluació d'alteracions somàtiques amb una signatura epigenòmica a més del filtratge bioinformàtic per eliminar mutacions provinents de l'hematopoesi clonal. Aquesta tècnica reporta un resultat dicotòmic: ADNct detectable vs. ADNct no detectable. Aquesta tecnologia incrementa la sensibilitat respecte Oncomine fent-la millor en el context MMR on la concentració d'ADNct en sang perifèrica és mínima. Tot i així, en el nostre estudi hi va haver un percentatge de pacients amb ADNct no detectable i que experimentaven recidiva durant el seguiment. A més a més, utilitzant aquesta plataforma no podem determinar les variacions en la MAF de les diferents mutacions trobades ni conèixer l'emergència de mecanismes de resistència adquirida a fàrmacs anti-EGFR ja que no es detalla les alteracions moleculars sinó només si la mostra és positiva o negativa per ADNct.

Independentment de la tecnologia utilitzada en cada treball, la detecció d'ADNct ha estat limitada en aquells pacients amb metàstasi únicament pulmonars o peritoneals o amb malaltia localitzada. Aquesta relació entre la localització tumoral i la capacitat per alliberar ADNct ha estat una troballa constant en tots els nostres tre-





balls permetent-nos validar la nostra hipòtesi inicial que més enllà d'un problema de sensibilitat tècnica, la biòpsia líquida està limitada principalment per la biologia tumoral. L'estudi de les bases biològiques que descriguin els múltiples processos implicats en el metabolisme de l'ADNct serà fonamental per a continuar el desenvolupament de la biòpsia líquida.

Així doncs no existeix una única tècnica ideal per a l'estudi de biòpsia líquida, sinó que l'elecció de la tecnologia a utilitzar depèn del context en el que ens trobem, de les mostres que necessitem analitzar i de les preguntes clíniques que vulguem resoldre. De la mateixa manera, la implementació de la biòpsia líquida a la pràctica clínica haurà de tenir en compte la tecnologia apropiada per cada utilitat clínica.

Limitacions i fortaleeses dels estudis presentats

Malgrat el valor dels resultats presentats, els nostres estudis no estan exempts de limitacions.

El primer estudi es veu limitat principalment per ser un estudi retrospectiu d'una cohort no homogènia de pacients i pel fet que les extraccions de sang longitudinals només es van realitzar en un nombre limitat de casos. Tot i així, les conclusions extretes van servir com a prova de concepte i han estat confirmades posteriorment per altres grups i ratificades en els estudis subsegüents recollits en aquesta tesi.

Tan l'estudi PLATFORM-B com l'estudi de biomarcadors de l'assaig GEMCAD-1402 són dos estudis prospectius, amb una cohort homogènia de pacients tractats amb el mateix esquema terapèutic i dissenyats en el marc d'estudis realitzats pels dos grans grups cooperatius de tumors digestius del nostre país. Tot i així, ambdós estudis estan limitats pel reduït nombre de mostres analitzades. En l'estudi GEMCAD-1402, tot i existir una cohort inicialment gran de pacients, finalment el subconjunt analitzat va ser petit. Això es va deure a la limitació d'alguns centres participants per recollir i processar les mostres de sang i a la escassa quantitat de plasma disponible per pacient, ja que l'estudi estava dissenyat per extreure només 4,5 ml de sang en cada moment. A l'estudi PLATFORM-B la recollida de mostres va ser més regular per part dels centres participants però tot i així vam obtenir un nombre limitat de mostres aparellades amb ADNct detectable. Això posa de rellevància la importància





i la dificultat de la part pre-analítica en l'anàlisi de la biòpsia líquida, incloent els de tubs emprats, el transport de la mostra de sang, el processament de la mostra de sang i l'extracció de l'ADN. Aquest fet no va ser només per les limitacions en la extracció per part dels centres, sinó en la cobertura genòmica del panell de NGS que vam utilitzar per aquest estudi.

Tot i aquesta limitació, el fet que ambdues cohorts de pacients siguin homogènies tan en característiques clínico-patològiques com en el tractament rebut permet que les conclusions extretes siguin fiables i que puguin establir les bases per al disseny d'assajos clínics prospectius que confirmen l'impacte de la personalització del tractament mitjançant biòpsia líquida.





• CONCLUSIONS





- 1.** La biòpsia líquida (ADNct) és un mètode mínimament invasiu i altament sensible per a la determinació molecular tumoral en pacients amb càncer colorectal metastàtic (CCRm).
- 2.** L'elevada concordança en la detecció de mutacions de *RAS* en teixit i plasma avalen l'ús de la biòpsia líquida com a alternativa a la biòpsia de teixit en pacients amb CCRm.
- 3.** La presència de metàstasi únicament pulmonars o peritoneals és un factor limitant en la detecció d'ADNct en pacients amb CCRm.
- 4.** L'extracció de sang per la caracterització molecular de l'ADNct en pacients amb CCRm ha de ser previ a l'inici de qualsevol tractament sistèmic.
- 5.** La resposta molecular primerenca inclou l'anàlisi combinat en ADNct de mutacions troncal i mutacions de resistència a anti-EGFR després de només dos cicles de quimioteràpia més cetuximab en pacients amb CCRm tractats en primera línia.
- 6.** Els pacients amb CCRm en tractament de primera línia amb quimioteràpia més cetuximab i "resposta molecular primerenca" tenen una millor resposta i millor supervivència lliure de progressió en comparació als pacients amb "progressió molecular primerenca".
- 7.** Per a l'estudi d'ADNct en pacients amb CCRm es recomana un anàlisi basat en tècniques de next generation sequencing (NGS) que permetin integrar la informació sobre la càrrega total de malaltia i l'existència de mutacions de resistència a fàrmacs anti-EGFR.
- 8.** La presència d'ADNct basal (abans d'iniciar tractament) en pacients amb CCRm o càncer de recte localment avançat (CRLA) no és un factor pronòstic ni predictor de resposta a tractament.
- 9.** En pacients amb CRLA tractats amb total neoadjuvant treatment (TNT), l'ADNct no prediu resposta patològica local.
- 10.** En pacients amb CRLA tractats amb TNT, la presència d'ADNct post-TNT i pre-quirúrgic detecta malaltia mínima metastàtica identificant pacients amb elevat risc de recaiguda a distància i mort.





• BIBLIOGRAFIA





BIBLIOGRAFIA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May 1;71(3):209–49.
2. Siegel RL, Wagle NS, Cercek A, Smith RA, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023; Mar 1-22
3. IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Available from: <https://www.iarc.who.int/>
4. Biller LH, Schrag D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA.* 2021 Feb 16;325(7):669–85.
5. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin.* 2023 Jan;73(1):17–48.
6. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Fritz ctr A, Reno A, et al. *AJCC: Colon and rectum. AJCC Cancer staging manual.* 7th Edition. Springer. 2010;
7. Mahul B. Amin, Stephen Edge, Frederick Greene, David R. Byrd, Robert K. Brookland, Mary Kay Washington, et al. *AJCC Cancer Staging Manual.* 8th ed. 2017. 1–1032 p.
8. James D. Brierley, Mary K. Gospodarowicz CW, editor. *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th Edition. Wiley-Blackwell; 2016. 272 p.
9. Argilés G, Tabernero J, Labianca R, Hochhauser D, Salazar R, Iveson T, et al. Localised colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2020;31(10):1291–305.
10. Roth AD, Delorenzi M, Tejpar S, Yan P, Klingbiel D, Fiocca R, et al. Article integrated Analysis of Molecular and clinical Prognostic Factors in Stage ii/iii colon cancer. 2012 Nov 7;104(21):1635-46
11. Konishi T, Shimada Y, Hsu M, Tufts L, Jimenez-Rodriguez R, Cercek A, et al. Association of preoperative and postoperative serum carcinoembryonic antigen and colon cancer outcome. *JAMA Oncol.* 2018;4(3):309–15.
12. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 1;27(19):3109–16.





13. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. Vol. 375, The Lancet. Elsevier B.V.; 2010. p. 1030–47.
14. Schmoll HJ, Twelves C, Sun W, O’Connell MJ, Cartwright T, McKenna E, et al. Effect of adjuvant capecitabine or fluorouracil, with or without oxaliplatin, on survival outcomes in stage III colon cancer and the effect of oxaliplatin on post-relapse survival: A pooled analysis of individual patient data from four randomised controll. *Lancet Oncol.* 2014;15(13):1481–92.
15. Yothers G, O’Connell MJ, Allegra CJ, Kuebler JP, Colangelo LH, Petrelli NJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: Updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol.* 2011 Oct 1;29(28):3768–74.
16. Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, Fedewa SA, Butterly LF, Anderson JC, et al. Colorectal cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(3):145–64.
17. Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, et al. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28(Supplement 4):iv22–40.
18. Capdevila J, Gómez MA, Guillot M, Páez D, Pericay C, Safont MJ, et al. SEOM-GEMCAD-TTD clinical guidelines for localized rectal cancer (2021). *Clin Transl Oncol.* 2022;24(4):646–57.
19. Brændengen M, Tveit KM, Berglund Å, Birkemeyer E, Frykholm G, Pålman L, et al. Randomized phase III study comparing preoperative radiotherapy with chemoradiotherapy in nonresectable rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Aug 1;26(22):3687–94.
20. Bosset J-F, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with Preoperative Radiotherapy in Rectal Cancer. *N Engl J Med.* 2006 Sep 14;355(11):1114–23.
21. Ngan SY, Burmeister B, Fisher RJ, Solomon M, Goldstein D, Joseph D, et al. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group Trial 01.04. *J Clin Oncol.* 2012;30(31):3827–33.
22. Bosset JF, Calais G, Mineur L, Maingon P, Stojanovic-Rundic S, Bensadoun RJ, et al. Fluorouracil-based adjuvant chemotherapy after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer: Long-term results of the EORTC 22921 randomised study. *Lancet Oncol.* 2014;15(2):184–90.
23. Breugom AJ, Swets M, Bosset JF, Collette L, Sainato A, Cionini L, et al. Adjuvant chemotherapy after preoperative (chemo)radiotherapy and surgery for patients with rectal cancer: A systema-





- tic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2015 Feb 1;16(2):200–7.
24. Breugom AJ, Van Gijn W, Muller EW, Berglund A, van den Broek CBM, Fokstuen T, et al. Adjuvant chemotherapy for rectal cancer patients treated with preoperative (chemo)radiotherapy and total mesorectal excision: A Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG) randomized phase III trial. *Ann Oncol.* 2015 Apr 1;26(4):696–701.
25. Glynne-Jones R, Counsell N, Quirke P, Mortensen N, Maraveyas A, Meadows HM, et al. Chronicle: Results of a randomised phase III trial in locally advanced rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation randomising postoperative adjuvant capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus control. *Ann Oncol.* 2014;25(7):1356–62.
26. Hong YS, Kim SY, Lee JS, Nam BH, Kim K pyo, Kim JE, et al. Oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy for rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy (ADORE): Long-term results of a randomized controlled trial. *J Clin Oncol.* 2019;37(33):3111–23.
27. Sauer R, Liersch T, Merkel S, Fietkau R, Hohenberger W, Hess C, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: Results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol.* 2012;30(16):1926–33.
28. Fernández-Martos C, Garcia-Albeniz X, Pericay C, Maurel J, Aparicio J, Montagut C, et al. Chemoradiation, surgery and adjuvant chemotherapy versus induction chemotherapy followed by chemoradiation and surgery: Long-term results of the Spanish GCR-3 phase II randomized trial. *Ann Oncol.* 2015;26(8):1722–8.
29. Cercek A, Roxburgh CSD, Strombom P, Smith JJ, Temple LKF, Nash GM, et al. Adoption of total neoadjuvant therapy for locally advanced rectal cancer. *JAMA Oncol.* 2018;4(6).
30. Fernández-Martos C, Pericay C, Losa F, García-Carbonero R, Layos L, Rodríguez-Salas N, et al. Effect of Aflibercept Plus Modified FOLFOX6 Induction Chemotherapy before Standard Chemoradiotherapy and Surgery in Patients with High-Risk Rectal Adenocarcinoma: The GEMCAD 1402 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(11):1566–73.
31. Fokas E, Allgäuer M, Polat B, Klautke G, Grabenbauer GG, Fietkau R, et al. Randomized phase II trial of chemoradiotherapy plus induction or consolidation chemotherapy as total neoadjuvant therapy for locally advanced rectal cancer: CAO/ArO/AIO-12. *J Clin Oncol.* 2019;37(34):3212–22.
32. Bahadoer RR, Dijkstra EA, van Etten B, Marijnen CAM, Putter H, Kranenbarg EMK, et al.





Short-course radiotherapy followed by chemotherapy before total mesorectal excision (TME) versus preoperative chemoradiotherapy, TME, and optional adjuvant chemotherapy in locally advanced rectal cancer (RAPIDO): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021;22(1):29–42.

33. Conroy T, Lamfichekh N, Etienne P-L, Rio E, FRANCOIS E, Mesgouez-Nebout N, et al. Total neoadjuvant therapy with mFOLFIRINOX versus preoperative chemoradiation in patients with locally advanced rectal cancer: Final results of PRODIGE 23 phase III trial, a UNICANCER GI trial. *J Clin Oncol.* 2020 May 20;38(15_suppl):4007–4007.

34. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus Postoperative Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *N Engl J Med.* 2004 Oct 21;351(17):1731–40.

35. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P, Rödel C, Kuo LJ, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: A pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2010;11(9):835–44.

36. Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, Barni S. Pathologic complete response and disease-free survival are not surrogate endpoints for 5-year survival in rectal cancer: An analysis of 22 randomized trials. *J Gastrointest Oncol.* 2017;8(1):39–48.

37. George TJ, Allegra CJ, Yothers G. Neoadjuvant Rectal (NAR) Score: a New Surrogate Endpoint in Rectal Cancer Clinical Trials. *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2015;11(5):275–80.

38. Rose BS, Winer EP, Mamon HJ. Perils of the pathologic complete response. *J Clin Oncol.* 2016;34(33):3959–62.

39. Fokas E, Fietkau R, Hartmann A, Hohenberger W, Grützmann R, Ghadimi M, et al. Neoadjuvant rectal score as individual-level surrogate for disease-free survival in rectal cancer in the CAO/ ARO/AIO-04 randomized phase III trial. *Ann Oncol.* 2018;29(7):1521–7.

40. Smith JJ, Garcia-Aguilar J. Advances and challenges in treatment of locally advanced rectal cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(16):1797–808.

41. Smith JJ, Strombom P, Chow OS, Roxburgh CS, Lynn P, Eaton A, et al. Assessment of a Watch-and-Wait Strategy for Rectal Cancer in Patients with a Complete Response after Neoadjuvant Therapy. *JAMA Oncol.* 2019;5(4).

42. Thompson H, Kim JK, Yuval JB, Verheij F, Patil S, Gollub MJ, et al. Survival and organ preservation according to clinical response after total neoadjuvant therapy in locally advanced rectal





cancer patients: A secondary analysis from the organ preservation in rectal adenocarcinoma (OPRA) trial.. 2021 May 28;39(15_suppl):3509–3509.

43. P P, P R, M B, J P, L R, R H, et al. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 1998;16(1):301–8.

44. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone. as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000;355(9209):1041–7.

45. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(1):23–30.

46. 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;0(July):mdw235.

47. Cervantes A, Adam R, Roselló S, Arnold D, Normanno N, Taïeb J, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2023 Jan;34(1):10-32

48. Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 2000 1956. 2000 Dec 27;19(56):6550–65.

49. Vallböhmer D, Zhang W, Gordon M, Yang DY, Yun J, Press OA, et al. Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J Clin Oncol.* 2005;23(15):3536–44.

50. Citri A, Yarden Y. EGF–ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 77. 2006 Jul 17 [cited 2022 Oct 11];7(7):505–16.

51. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, 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 Off J Eur Soc Med Oncol.* 2017 Aug;28(8):1713–29.

52. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: The first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):459–65.

53. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(11):828–51.

54. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res.*



2012;72(10):2457–67.

55. Dienstmann R, Connor K, Byrne AT. Precision Therapy in RAS Mutant Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020;158(4):806–11.

56. Patelli G, Tosi F, Amatu A, Mauri G, Curaba A, Patanè DA, et al. Strategies to tackle RAS-mutated metastatic colorectal cancer. *ESMO Open*. 2021;6(3):100156.

57. 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. 2004 Jul 22;351(4):337–45.

58. Jonker DJ, O CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au H-J, et al. Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2007 Nov 15;2(11):2040–8.

59. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1658–64.

60. 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 Apr 2;360(14):1408–17.

61. 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.

62. 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.

63. 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.

64. V H, LF von W, T D, A K, U V-K, SE A-B, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(10):1065–75.

65. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, et al. Effect of first-li-



ne 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 - J Am Med Assoc.* 2017;317(23):2392–401.

66. Ciliberto D, Staropoli N, Caglioti F, Chiellino S, Ierardi A, Ingargiola R, et al. The best strategy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer patients in first-line treatment: A classic and Bayesian meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;125(March):69–77.

67. Heinemann V, Weikersthal LF von, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran S-E, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014 Sep 1;15(10):1065–75.

68. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Kaiser F, Al-Batran SE, et al. FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab for advanced colorectal cancer: final survival and per-protocol analysis of FIRE-3, a randomised clinical trial. *Br J Cancer.* 2021;124(3):587–94.

69. Venook AP, Niedzwiecki D, Innocenti F, Fruth B, Greene C, O’Neil BH, et al. Impact of primary (1o) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). 2016 May 20;34(15_suppl):3504–3504.

70. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, et al. 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 Feb 1;3(2):194–201.

71. Benson AB, Al-Hawary MM, Azad N, Chen Y-J, Ciombor KK, Cohen S, et al. NCCN Guidelines Version 1.2022 Colon Cancer Continue NCCN Guidelines Panel Disclosures.2022; Jun 28;12:930108

72. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949–54.

73. Turski ML, Vidwans SJ, Janku F, Garrido-Laguna I, Munoz J, Schwab R, et al. Genomically Driven Tumors and Actionability across Histologies: BRAF-Mutant Cancers as a Paradigm. *Mol Cancer Ther.* 2016 Apr 1;15(4):533–47.

74. Taieb J, Lapeyre-Prost A, Laurent Puig P, Zaanan A. Exploring the best treatment options for





BRAF-mutant metastatic colon cancer. *Br J Cancer*. 2019 Sep 10;121(6):434–42.

75. Cohen R, Liu H, Fiskum J, Adams R, Chibaudel B, Maughan TS, et al. BRAF V600E Mutation in First-Line Metastatic Colorectal Cancer: An Analysis of Individual Patient Data From the ARCAD Database. *J Natl Cancer Inst*. 2021 Oct 1;113(10):1386–95.

76. Martinelli E, Cremolini C, Mazard T, Vidal J, Virchow I, Tougeron D, et al. Real-world first-line treatment of patients with BRAFV600E-mutant metastatic colorectal cancer: the CAPSTAN CRC study. *ESMO Open*. 2022;7(6):100603.

77. Tabernero J, Ros J, Élez E. The Evolving Treatment Landscape in BRAF-V600E –Mutated Metastatic Colorectal Cancer . *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2022;(42):254–63.

78. 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 Mar;51(5):587–94.

79. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):753–62.

80. Vidal J, Bellosillo B, Santos Vivas C, García-Alfonso P, Carrato A, Cano MT, et al. Ultra-selection of metastatic colorectal cancer patients using next-generation sequencing to improve clinical efficacy of anti-EGFR therapy. *Ann Oncol*. 2019 Mar 1;30(3):439-446

81. Network TCGA, Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K, Dinh HH, Drummond J a., et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330–7.

82. Morris VK, Kennedy EB, Baxter NN, Benson AB, Cercek A, Cho M, et al. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Onco*. 2023;Jan 20;41(3):678-700.

83. Russo M, Siravegna G, Blaszkowsky LS. Tumor heterogeneity and Lesion-Specific response to targeted therapy in colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(2):147–53.

84. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):883–92.

85. Diaz Jr L a., Williams RT, Wu J. The molecular evolution of acquired resistance to targeted





EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486(7404):4–7.

86. Misale S, Yaeger R, Hobor S. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2014;486(7404):532–6.

87. 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 Jan 22;18(2):221–3.

88. Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, Martínez A, Cañadas I, Lazzari L, et al. Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015 May 1;21(9):2157–66.

89. Van Emburgh BO, Arena S, Siravegna G, Lazzari L, Crisafulli G, Corti G, et al. Acquired RAS or EGFR mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nat Commun*. 2016 Dec 8;7:13665.

90. Strickler JH, Loree JM, Ahronian LG, Parikh AR, Niedzwiecki D, Pereira AAL, et al. Genomic landscape of cell-free DNA in patients with colorectal cancer. *Cancer Discov*. 2018;8(2):164–73.

91. Montagut C, Argilés G, Ciardiello F, Poulsen TT, Dienstmann R, Kragh M, et al. Efficacy of Sym004 in patients with metastatic colorectal cancer with acquired resistance to anti-EGFR therapy and molecularly selected by circulating tumor DNA analyses a phase 2 randomized clinical trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(4).

92. Misale S, Arena S, Lamba S, Siravegna G, Lallo A, Hobor S, et al. Blockade of EGFR and MEK Intercepts Heterogeneous Mechanisms of Acquired Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer. *Sci Transl Med*. 2014 Feb 19;6(224):224ra26–224ra26.

93. Sartore-Bianchi A, Pietrantonio F, Lonardi S, Mussolin B, Rua F, Crisafulli G, et al. Circulating tumor DNA to guide rechallenge with panitumumab in metastatic colorectal cancer: the phase 2 CHRONOS trial. *Nat Med*. 2022;28(8):1612–8.

94. Santos Vivas C, Salva F, Fernández-Rodríguez C, Alonso Orduña V, Losa F, Paez D, et al. P-118 Cetuximab rechallenge in RAS, BRAF, EGFR-ECD wild type metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with anti-EGFR therapies in first line: The CITRIC study. *Ann Oncol*. 2022;33:S291.

95. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK, Liu X, Clifton KK, Napolitano S, et al. Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: Implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann Oncol*. 2019;30(2):243–9.





96. Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C. Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with Anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res.* 2015;21(5):1087–97.
97. Azuara D, Santos C, Lopez-Doriga A, Grasselli J, Nadal M, Sanjuan X, et al. Nanofluidic digital PCR and extended genotyping of RAS and BRAF for improved selection of metastatic colorectal cancer patients for anti-EGFR therapies. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(5).
98. Russo M, Crisafulli G, Sogari A, Reilly NM, Arena S, Lamba S, et al. Adaptive mutability of colorectal cancers in response to targeted therapies. *Science* (80-). 2019 Dec 20;366(6472):1473–80.
99. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, et al. Amplification of the MET Receptor Drives Resistance to Anti-EGFR Therapies in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2013 Jun;3(6):658–73.
100. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov.* 2014;3(6):658–73.
101. Rankin A, Klempner SJ, Erlich R, Sun JX, Grothey A, Fakih M, et al. Broad Detection of Alterations Predicted to Confer Lack of Benefit From EGFR Antibodies or Sensitivity to Targeted Therapy in Advanced Colorectal Cancer. *Oncologist.* 2016 Nov 1;21(11):1306–14.
102. Ahronian LG, Sennott EM, Van Allen EM, Wagle N, Kwak EL, Faris JE, et al. Clinical Acquired Resistance to RAF Inhibitor Combinations in BRAF-Mutant Colorectal Cancer through MAPK Pathway Alterations. *Cancer Discov.* 2015 Apr 1;5(4):358–67.
103. Oddo D, Sennott EM, Barault L, Valtorta E, Arena S, Cassingena A, et al. Therapeutics, Targets, and Chemical Biology Molecular Landscape of Acquired Resistance to Targeted Therapy Combinations in BRAF-Mutant Colorectal Cancer. 2016 Aug 1;76(15):4504-15
104. Woolston A, Khan K, Spain G, Barber LJ, Griffiths B, Gonzalez-Exposito R, et al. Genomic and Transcriptomic Determinants of Therapy Resistance and Immune Landscape Evolution during Anti-EGFR Treatment in Colorectal Cancer. *Cancer Cell.* 2019 Jul 8;36(1):35-50.e9.
105. Raghav K, Ou FS, Venook AP, Innocenti F, Sun R, Lenz HJ, et al. Acquired Genomic Alterations on First-Line Chemotherapy with Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer: Circulating Tumor DNA Analysis of the CALGB/SWOG-80405 Trial (Alliance). *J Clin Oncol.* 2023;41(3):472–8.
106. Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoal M, François E, Formento P, Renée N, et al.





K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 1;14(15):4830-5.

107. Santini D, Loupakakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, et al. High Concordance of KRAS Status Between Primary Colorectal Tumors and Related Metastatic Sites: Implications for Clinical Practice . *Oncologist*. 2008;13(12):1270–5.

108. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, Murthy R, Yao JC, Hicks ME, et al. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol*. 2013 Jan 1;31(1):17–22.

109. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. Vol. 32, *Journal of Clinical Oncology*. 2014.

110. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov*. 2016;6(5):479–91.

111. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):531–48.

112. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l’homme. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948 Mar;142(3–4):241–3.

113. Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science* (80-). 1965 Apr 16;148(3668):374–6.

114. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977 Mar;37(3):646–50.

115. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989;46(5):318–22.

116. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 3(1):67–71.

117. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1994 Apr;86(4):774–9.

118. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 Feb 15;61(4):1659–65.





119. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016 Sep 1;35(3):347–76.
120. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J, van Dyk E, du Plessis L, Pretorius PJ. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2016;1863(1):157–65.
121. Elliott MR, Ravichandran KS. The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. *Dev Cell.* 2016;38(2):147–60.
122. Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, et al. Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med.* 2018;10(466):1–14.
123. Diehl F, Schmidt K, Choti MA. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med.* 2008 Sep;14(9):985–90.
124. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov;102(45):16368–73.
125. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Sep;101(18):1284–5.
126. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014 Feb;6(224):224ra24.
127. Zonta E, Garlan F, Pécuchet N, Perez-Toralla K, Caen O, Milbury C, et al. Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations. *PLoS One.* 2016 Jul 1;11(7):e0159094.
128. Perkins G, Lu H, Garlan F, Taly V. Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. *Adv Clin Chem.* 2017 Dec 1;79:43–91.
129. Dressman D, Yan H, Traverso G. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8817–22.
130. Diehl F, Li M, He Y. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods.* 2006 Jul;3(7):551–9.
131. Forsheew T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl*





Med. 2012 May 30;4(136).

132. Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013 May;497(7447):108–12.

133. Newman AM, Bratman S V, To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014 Apr;20(5):548–54.

134. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour*. 2011 Sep;11(5):759–69.

135. Quail M, Smith ME, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012 Jul;13(1):341.

136. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. Liquid biopsies come of age: Towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(4):223–38.

137. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the preanalytical conditions for analyzing circulating cell-free DNA. *Clin Chem*. 2019;65(5):623–33.

138. Corcoran RB, Chabner BA. Application of Cell-free DNA Analysis to Cancer Treatment. *N Engl J Med*. 2018;379(18):1754–65.

139. Masfarré L, Vidal J, Fernández-Rodríguez C, Montagut C. Ctdna to guide adjuvant therapy in localized colorectal cancer (Crc). *Cancers (Basel)*. 2021;13(12):1–20.

140. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2015 Jul 2;126(1):9–16.

141. Razavi P, Li BT, Brown DN, Jung B, Hubbell E, Shen R, et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nat Med*. 2019 Dec 1;25(12):1928–37.

142. Bellosillo B, Montagut C. High-accuracy liquid biopsies. *Nat Med*. 2019;25(12):1820–1.

143. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016 Jan 14;164(1–2):57–68.

144. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, et al. Comprehensive hu-





man cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun* 2018 91. 2018 Nov 29;9(1):1–12.

145. Pascual J, Attard G, Bidard F-C, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2022 Aug;33(8):750-768

146. Vidal J, Taus A, Dalmases A, Montagut C. Implementing circulating tumor DNA in oncology clinical practice. *Cancer Chemother Rev.* 2017;12(1).

147. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med.* 2014;20(4).

148. 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 Jan;45(2):228–47.

149. Nicholson BD, Shinkins B, Pathiraja I, Roberts NW, James TJ, Mallett S, et al. Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. Vol. 2015, *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2015.

150. Shinkins B, Nicholson BD, Primrose J, Perera R, James T, Pugh S, et al. The diagnostic accuracy of a single CEA blood test in detecting colorectal cancer recurrence: Results from the FACS trial. *PLoS One.* 2017;12(3).

151. Tie J, Kinde I, Wang Y. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol / ESMO.* 2015 Aug;26(8):1715–22.

152. Parikh AR, Mojtahed A, Schneider JL, Kanter K, Van Seventer EE, Fetter IJ, et al. Serial ctDNA monitoring to predict response to systemic therapy in metastatic gastrointestinal cancers. *Clin Cancer Res.* 2020;26(8):1877–85.

153. Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, et al. Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study). *Clin Cancer Res.* 2017;23(18):5416–25.

154. Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB, Boland P, et al. ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal–Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev*





Clin Oncol. 2020; Dec;17(12):757-770

155. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*. 2015 Jul 7;21(7):827–827.

156. Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, Kazmi SMA, Mazard T, Vilar E, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol / ESMO*. 2015 Apr;26(4):731–6.

157. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med*. 2015 Aug;7(302):302ra133-302ra133.

158. Kruger S, Heinemann V, Ross C, Diehl F, Nagel D, Ormanns S, et al. Repeated mutKRAS ctDNA measurements represent a novel and promising tool for early response prediction and therapy monitoring in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018 Dec 1;29(12):2348–55.

159. Lee RJ, Gremel G, Marshall A, Myers KA, Fisher N, Dunn JA, et al. Circulating tumor DNA predicts survival in patients with resected high-risk stage II/III melanoma. *Ann Oncol*. 2018;29(2):490–6.

160. Tie J, Wang Y, Tomasetti C. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016;8(346).

161. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Christie M, Simons K, Lee M, et al. Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(12):1710–1717.

162. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V, Zuñiga S, Rentero-Garrido P, Huerta M, et al. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019;30(11):1804–12.

163. Henriksen TV, Tarazona N, Frydendahl A, Reinert T, Gimeno-Valiente F, Carbonell-Asins JA, et al. Circulating Tumor DNA in Stage III Colorectal Cancer, beyond Minimal Residual Disease Detection, toward Assessment of Adjuvant Therapy Efficacy and Clinical Behavior of Recurrences. *Clin Cancer Res*. 2022;28(3):507–17.

164. Kotani D, Oki E, Nakamura Y, Yukami H, Mishima S, Bando H, et al. Molecular residual di-



sease and efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Nat Med*. 2023;29(1):127–34.

165. Tie J, Cohen JD, Lahouel K, Lo SN, Wang Y, Kosmider S, et al. Circulating Tumor DNA Analysis Guiding Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(24):2261–72.

166. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Li L, Christie M, Simons K, et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: A prospective biomarker study. *Gut*. 2019;68(4):663–71.

167. Khakoo S, Carter PD, Brown G, Valeri N, Picchia S, Bali MA, et al. MRI tumor regression grade and circulating tumor DNA as complementary tools to assess response and guide therapy adaptation in rectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2020;26(1):183–92.

168. Zhou J, Wang C, Lin G, Xiao Y, Jia W, Xiao G, et al. Serial circulating tumor DNA in predicting and monitoring the effect of neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer: A prospective multicenter study. *Clin Cancer Res*. 2021;27(1):301–10.

169. Murahashi S, Akiyoshi T, Sano T, Fukunaga Y, Noda T, Ueno M, et al. Serial circulating tumour DNA analysis for locally advanced rectal cancer treated with preoperative therapy: prediction of pathological response and postoperative recurrence. *Br J Cancer*. 2020;123(5):803–10.

170. 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).

171. Normanno N, Esposito Abate R, Lambiase M, Forgione L, Cardone C, Iannaccone A, et al. RAS testing of liquid biopsy correlates with the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line FOLFIRI plus cetuximab in the CAPRI-GOIM trial. *Ann Oncol*. 2018;29(1):112–8.

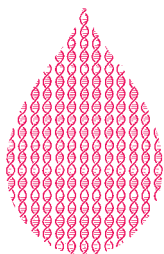
172. Bachet JB, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, et al. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: The AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol*. 2018;29(5):1211–9.

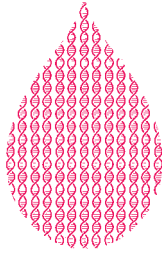
173. Maurel J, Alonso V, Escudero P, Fernández-Martos C, Salud A, Méndez M, et al. Clinical Impact of Circulating Tumor RAS and BRAF Mutation Dynamics in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With First-Line Chemotherapy Plus Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Therapy. *JCO Precis Oncol*. 2019;(3):1–16.



174. García-Foncillas J, Tabernero J, Élez E, Aranda E, Benavides M, Camps C, et al. Prospective multicenter real-world RAS mutation comparison between OncoBEAM-based liquid biopsy and tissue analysis in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2018;119(12):1464–70.
175. Elez E, Chianese C, Sanz-García E, Martinelli E, Noguerido A, Mancuso FM, et al. Impact of circulating tumor DNA mutant allele fraction on prognosis in RAS-mutant metastatic colorectal cancer. *Mol Oncol*. 2019;13:1827–35.
176. Tie J, Cohen J, Lahouel K, Lo SN, Wang Y, Wong R, et al. 318MO Circulating tumour DNA (ctDNA) dynamics, CEA and sites of recurrence for the randomised DYNAMIC study: Adjuvant chemotherapy (ACT) guided by ctDNA analysis in stage II colon cancer (CC). *Ann Oncol*. 2022 Sep 1;33:S683.
177. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014 Jul 1;25(7):1346–55.
178. El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevis C, Gillet B, Nouaille M, et al. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res*. 2016 Jun;22(12):3067–77.
179. Hamfjord J, Guren TK, Dajani O, Johansen JS, Glimelius B, Sorbye H, et al. Total circulating cell-free DNA as a prognostic biomarker in metastatic colorectal cancer before first-line oxaliplatin-based chemotherapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019 Jul;30(7):1088–95.
180. Vivancos A, Aranda E, Benavides M, Élez E, Gómez-España MA, Toledano M, et al. Comparison of the Clinical Sensitivity of the Idylla Platform and the OncoBEAM RAS CRC Assay for KRAS Mutation Detection in Liquid Biopsy Samples. *Sci Reports* 2019 91. 2019 Jun;9(1):1–8.
181. 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 Nov 1;4(11):1269–80.
182. Fernandez-Martos C, Machado I, Pericay C, Salas N, Feliu Batlle J, ten Hoorn S, et al. Randomized phase II trial of modified (m) FOLFOX6 induction chemotherapy with or without aflibercept before standard chemoradiotherapy (CRT) and total mesorectal excision (TME) in patients with high-risk rectal adenocarcinoma (HRR): Final results of the GEMCAD 1402, and by molecular subtypes. *J Clin Oncol*. 2020 May 20;38(15_suppl):4102–4102.







Tesi doctoral Joana Vidal Barrull

• • • • •

**Programa de doctorat de
Medicina i Recerca Translacional
Universitat de Barcelona, 2023**

