

Fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino con y sin cetuximab en el tratamiento de primera línea del cáncer colorrectal metastásico

Carsten Bokemeyer, Igor Bondarenko, Anatoly Makhson, Joerg T. Hartmann, Jorge Aparicio, Filippo de Braud, Serban Donea, Heinz Ludwig, Gunter Schuch, Christopher Stroh, Anja H. Loos, Angela Zubel, and Piotr Koralewski

Del Hospital Universitario, Hamburgo-Eppendorf; Suroeste de Alemania Cáncer integral, Hospital Universitario Tu-bingen, Tu-bingen; Merck Serono, Darmstadt Alemania; Academia Médica Estatal, Hospital Clínico de la ciudad #4, Dnepropetrovsk, Ucrania; Hospital de Oncología de la ciudad de Moscú #62, Moscú, Federación Rusia; Hospital Universitario La Fe, Valencia, España; Instituto Europeo de Oncología, Milán, Italia; Instituto Oncológico "Prof. Dr. Al. Trestioreanu" Bucuresti, Bucarest, Rumania; Wilhelminenspital der Stadt Wien, Vienna, Austria; y Wojewódzki Szpital Specjalistyczny Oddział Chemioterapii, Krakow, Polonia.

Sometido el 31 de Octubre, 2008; aceptado el 25 de Noviembre, 2008; publicado en línea antes de imprimir en www.jco.org en Diciembre 29, 2008.

Presentado en la 43a Reunión Anual de la Sociedad Americana de Oncología Clínica, Junio 1-5, 2007, Chicago, IL; 14ª Conferencia Europea de Cáncer, Septiembre 23-27, 2007, Barcelona, España; 44a Reunión Anual de la Sociedad Americana de Oncología Clínica, Mayo 30-Junio 3, 2008, Chicago, IL; y Simposio Internacional de la ESMO: 10º Congreso Mundial en Cáncer Gastrointestinal, Junio 25-28, 2008, Barcelona, España.

La revelación de posibles conflictos de interés de los Autores y las contribuciones de los autores se encuentran al final de este artículo.

Link al archive de estudios clínicos disponible en JCO.org.

Autor correspondiente: Carsten Bokemeyer, MD, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburgo-Eppendorf, Alemania, e-mail: c.bokemeyer@uke.uni-hamburg.de.

2008 por la Sociedad Americana de Oncología Clínica

0732-183X/09/2799-1/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8397

R E S U M E N

Propósito

Este estudio aleatorizado evaluó si la mejor tasa de respuesta general (ORR) de cetuximab en combinación con oxaliplatino, leucovorina y fluorouracilo (FOLFOX-4) fue superior a la de FOLFOX-4 solo como tratamiento de primera línea para el cáncer colorrectal metastásico. La influencia del estado de la mutación del gen *KRAS* fue investigado.

Pacientes y Métodos

Los pacientes recibieron cetuximab (400 mg/m² dosis inicial seguida de 250 mg/m²/semana a partir de entonces), más FOLFOX-4 (oxaliplatino 85 mg/m² en el día 1, más leucovorina 200 mg/m² y fluorouracilo en una dosis de 400mg/m² en bolo seguido de una infusión de 600 mg/m² durante 22 horas en los días 1 y 2, n = 169) o FOLFOX-4 solo (n = 168). El tratamiento se continuó hasta la progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. El estado de mutación de *KRAS* se evaluó en el subgrupo de pacientes con muestras de tumores evaluables (n = 233).

Resultados

El ORR confirmado para cetuximab más FOLFOX-4 fue mayor que con FOLFOX-4 solo (46% vs 36%). No se pudo establecer un aumento estadísticamente significativo en la probabilidad de respuesta con la adición de cetuximab a FOLFOX-4 (relación de probabilidad = 1,52, *p* = 0,064). En los pacientes con tumores *KRAS* de tipo salvaje, la adición de cetuximab a FOLFOX-4 se asoció con un incremento clínicamente significativo en la probabilidad de respuesta (ORR= 61% vs 37%; relación de probabilidad = 2.54, *p* = 0,011) y un menor riesgo de progresión de la enfermedad (índice de riesgo = 0,57, *p* = 0,0163) en comparación con FOLFOX-4 solo. Cetuximab más FOLFOX-4 fue generalmente bien tolerado.

Conclusión

El estado mutacional de *KRAS* ha demostrado ser un criterio de selección altamente predictivo en relación con la decisión de tratamiento con respecto a la adición de cetuximab a FOLFOX-4 para pacientes no tratados previamente con cáncer colorrectal metastásico.

R Oncol Clin 27. © 2008 por la Sociedad Americana de Oncología Clínica

INTRODUCCIÓN

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un objetivo molecular anticáncer clínicamente validado que se expresa en la mayoría de los tumores colorrectales.¹⁻⁵ Cetuximab (Erbix, desarrollado por Merck KGaA [Darmstadt, Alemania], bajo licencia de Imclone Nueva York, NY) es un anticuerpo monoclonal de inmunoglobulina G1 dirigido específicamente a EGFR con alta afinidad, inhibe competitivamente la unión del ligando endógeno y el ligando dependiente de señalizaciones bajas.^{6,7} La unión a la célula tumoral también inicia la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del anticuerpo.⁸⁻¹⁰ Estudios aleatorizados fase II y III de cáncer colorrectal metastático (mCRC)

han demostrado la eficacia y la tolerabilidad de cetuximab como monoterapia^{2,11} o en combinación con irinotecán,^{2,12} tras el fracaso de los regímenes anteriores de quimioterapia que incluyen irinotecán y/u oxaliplatino. Por otra parte, en el establecimiento de primera línea, basado en los datos prometedora de fase II,¹³ el estudio fase III de cetuximab combinado Con Irinotecan en la Terapia de Primera Línea para cáncer colorrectal metastásico (CRYSTAL) ha demostrado que la adición de cetuximab a fluorouracilo en infusión (FU) / leucovorina (LV) / irinotecán (FOLFIRI) mejora significativamente el tiempo de supervivencia libre de progresión (PFS), la tasa de respuesta, y la tasa de resección R0 en pacientes con cáncer colorrectal metastásico, en comparación con FOLFIRI solo.¹⁴

Los estudios fase II que examinan la actividad y la tolerabilidad de cetuximab en combinación con oxaliplatino y FU/LV (FOLFOX-4) han dado resultados alentadores.^{15,16} Para evaluar más a fondo esta combinación, en el estudio (OPUS) de Oxaliplatino y Cetuximab en primera línea de tratamiento de cáncer colorrectal metastático se comparó la eficacia y seguridad de cetuximab más FOLFOX-4, con FOLFOX-4 sólo como terapia de primera línea para mCRC.

La definición de los características moleculares relevantes de un tumor individual (evaluación de biomarcadores) permitirá cada vez más, la selección de pacientes con más probabilidades de beneficiarse de los tratamientos en particular.¹⁷ Un análisis reciente de subgrupos de un estudio aleatorizado fase III de la inmunoglobulina G2 anticuerpo monoclonal dirigido a EGFR, panitumumab, en pacientes con mCRC refractario a la quimioterapia sugiere una falta de actividad clínica en los pacientes cuyos tumores tenían mutaciones activadoras en el codón 12 o 13 del gen *KRAS*.¹⁸

Pequeños estudios retrospectivos en pacientes refractarios a la quimioterapia también han sugerido que las respuestas a cetuximab se limitan a los pacientes con cáncer colorrectal metastático (aproximadamente el 55% a 70%) cuyos tumores son *KRAS* de tipo salvaje.¹⁹⁻²² Esta afirmación ha sido recientemente confirmada en los análisis de subgrupos de los estudios aleatorizados fase III, CRYSTAL y CO.17.^{23,24} Un análisis de subgrupos del estudio OPUS, por tanto investigó si el estado de mutación de *KRAS* fue predictivo de una respuesta clínica a cetuximab más FOLFOX-4.

PACIENTES Y MÉTODOS

Elección de Pacientes

Los pacientes fueron elegibles para su inclusión si eran ≥ 18 años de edad; tenían confirmación histológica, primera ocurrencia de mCRC no resecable, con expresión de EGFR con al menos una lesión medible radiológicamente; una esperanza de vida de ≥ 12 semanas; un Estado de Desempeño del Grupo Cooperativo Oriental de Oncología (ECOG PS) ≤ 2 , y una adecuada función hepática, renal y de médula ósea. Los pacientes fueron no elegibles si estaban embarazada, tenía un historial de exposición previa a la terapia dirigida a EGFR o quimioterapia previa (excepto el tratamiento adyuvante) para el cáncer colorrectal metastático, o con disfunción de algún órgano o metabólica severa. El estudio fue aprobado por los comités éticos pertinentes y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes proporcionaron su consentimiento de informado por escrito.

Diseño del Estudio

Este fue un estudio abierto, aleatorizado, multicéntrico, fase II que comparaba la eficacia y seguridad de cetuximab combinado con FOLFOX-4 vs FOLFOX-4 solo, en el tratamiento de primera línea de mCRC con expresión de EGFR. La expresión de EGFR se determinó utilizando un kit de inmunohistoquímica pharmDx DakoCytomation (Dako, Glostrup, Dinamarca), con una célula tumoral que se tiñera de cualquier intensidad sería el criterio mínimo requerido para confirmar la expresión. La aleatorización (1:1) se llevó a cabo mediante un procedimiento de bloques permutados estratificados, con ECOG PS (0 y 1 v 2) como factor de estratificación.

En el día 1 de un ciclo de tratamiento de 14 días, los pacientes recibieron cetuximab (dosis inicial de 400 mg/m² en infusión durante 2 horas, y 250 mg/m² semanal durante 1 hora a partir de entonces), seguido después de 1 hora por FOLFOX-4 (oxaliplatino 85 mg/m² en el día 1, infundido durante 2 horas; LV 200 mg/m² en infusión durante 2 horas, seguido por FU en 400mg/m² en bolo intravenoso, y después, 600 mg/m² en infusión durante 22 horas en los días 1 y 2) o FOLFOX-4 solo, hasta la aparición de la progresión de la enfermedad (PD) o de toxicidad inaceptable. En el caso de toxicidad inaceptable o intolerancia a FU/LV, oxaliplatino o cetuximab, el agente responsable puede ser detenido y el paciente puede continuar con la otra medicación del estudio. La evaluación radiológica de la respuesta se llevó a cabo cada 8 semanas hasta la PD o el retiro por cualquier motivo.

El objetivo primario fue evaluar si la mejor tasa de respuesta general confirmada de cetuximab más FOLFOX-4 fue superior a la de FOLFOX-4 solo. La respuesta tumoral incluyendo la progresión de la enfermedad fue evaluada por un comité de evaluación independiente de acuerdo con los criterios modificados de la OMS.

El comité de revisión independiente realizó una revisión ciega de imágenes y datos clínicos utilizando un conjunto común de criterios predefinidos. El punto de corte de los datos para el análisis primario de la respuesta se eligió en las 20 semanas posteriores del último paciente asignado aleatoriamente que inició el tratamiento del estudio (4 de agosto de 2006) para que todos los pacientes pudieran tener por lo menos dos evaluaciones de 8 semanas. Los objetivos secundarios incluyeron comparaciones de los tratamientos para el índice de cirugía curativa metastásica, la duración de la respuesta, el índice de control de la enfermedad, el tiempo PFS, el tiempo OS y la seguridad, los cuales se basaron en datos de seguimiento de un tiempo más prolongado (1 de marzo de 2007). Un análisis retrospectivo de subgrupos investigó las asociaciones entre PFS y la tasa de respuesta y el estado de mutación de *KRAS* de los tumores.

Métodos Estadísticos y Consideraciones

El análisis primario de eficacia se realizó en la población con intención de tratar (ITT), definida como todos los pacientes asignados aleatoriamente que recibieron al menos una dosis del tratamiento de estudio. Suponiendo una diferencia en la tasa de mejor respuesta confirmada de al menos 20% entre los dos tratamientos (es decir, aproximadamente el 70% con cetuximab más FOLFOX-4 y el 50% con FOLFOX-4 sólo, para el estrato con ECOG PS 0 a 1, y 66% y 45%, respectivamente, para el estrato ECOG PS 2), se espera que la relación de probabilidad de Cochran-Mantel-Haenszel (CMH)^{25,26} (OR) a través de los estratos sea de 2.33. Por lo tanto se calculó un tamaño de muestra de aproximadamente 146 pacientes por grupo como necesaria para detectar una relación de probabilidad de 2.33 a nivel $\alpha = 0.05$, con una potencia de 90%.

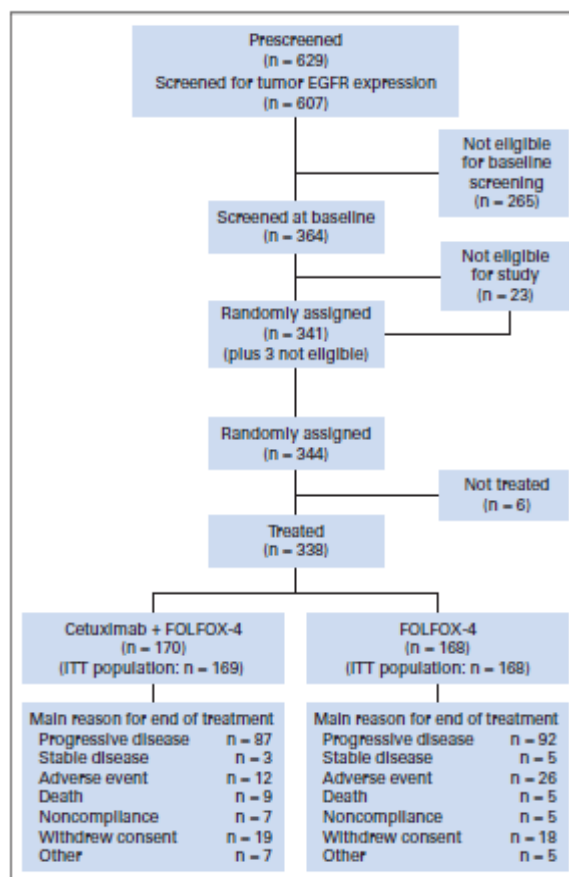


Fig 1. Disposición de los sujetos en el momento del corte de datos en Marzo 1, 2007. EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR; FOLFOX-4, oxaliplatino, leucovorina y fluorouracilo, ITT, intención de tratar

Con la excepción de la prueba de hipótesis nula de $OR = 1$ sobre la muestra completa de población, todos los análisis posteriores de eficacia fueron de exploración y los valores p de no se ajustaron a las pruebas de multiplicidad estadística. Los datos de tiempo para el evento fueron analizados utilizando el método de Kaplan-Meier.²⁷ Todos los análisis fueron repetidos por el estado de mutación de *KRAS* en aquellos pacientes ITT cuyos tumores estaban disponibles y proporcionaban una muestra evaluable de ADN (población *KRAS*).

Detección de Mutación de *KRAS*

Se extrajo el ADN del tumor de los tejidos fijados en formaldehído y embebidos en parafina, y seleccionados por la presencia de mutaciones de *KRAS* en el codón 12 y 13 utilizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica de curva sujeción y de fusión adaptada de Chen et al.²⁸ (la información completa de los métodos se enlista en el Apéndice sólo, en línea). En resumen, una reacción de PCD con un ciclador de luz de un paso (LightMix, Gly12 k-ras; TIB Molbiol, Berlín, Alemania) incorpora un oligomero de ácido nucleico bloqueado que abarca del codón 12 al

Tabla 1. Características del Paciente y de la Enfermedad al Inicio

Característica	Población ITT (n = 337)				Población <i>KRAS</i> (n = 233)				<i>KRAS</i> tipo salvaje (n = 134)				<i>KRAS</i> Mutado (n = 99)			
	FOLFOX-4 (n = 168)		Cetuximab FOLFOX-4 (n = 169)		FOLFOX-4 (n = 120)		Cetuximab FOLFOX-4 (n = 113)		FOLFOX-4 (n = 73)		Cetuximab FOLFOX-4 (n = 61)		FOLFOX-4 (n = 47)		Cetuximab FOLFOX-4 (n = 52)	
	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. of Pacientes	%	No. of Pacientes	%	No. of Pacientes	%
Sexo																
Hombre	92	55	89	53	66	55	57	50	44	60	30	49	22	47	27	52
Mujer	76	45	80	47	54	45	56	50	29	40	31	51	25	53	25	48
Edad, años																
Media	60		62		60		59		59		59		61		60	
Rango	30-82		24-82		30-82		24-82		36-82		24-74		30-75		41-82	
< 65	109	65	96	57	77	64	70	62	46	63	39	64	31	66	31	60
≥ 65	59	35	73	43	43	36	43	38	27	37	22	36	16	34	21	40
Región																
Europa del Este	93	55	97	57	71	59	70	62	45	62	38	62	26	55	32	62
Europa Occidental	49	29	45	27	49	41	43	38	28	38	23	38	21	45	20	38
Sur de Europa	25	15	27	16	0		0		0		0		0		0	
ROW	1	1	0		0		0		0		0		0		0	
ECOG PS al inicio																
0	75	45	65	39	50	42	34	30	27	37	19	31	23	49	15	29
1	76	45	89	53	56	47	70	62	37	51	37	61	19	40	33	63
2	17	10	15	9	14	12	9	8	9	12	5	8	5	11	4	8
Duración de la enfermedad, meses																
Media, CRC	2.2		2.1		2.1		2.2		2.0		2.1		2.1		2.3	
Q1-Q3	1.3-17.6		1.2-9.8		1.3-14.4		1.4-10.7		1.3-15.0		1.2-9.4		1.2-7.8		1.6-10.7	
Media, mCRC	1.5		1.4		1.6		1.4		1.6		1.3		1.4		1.6	
Q1-Q3	1.1-2.3		0.9-2.3		1.1-2.3		1.0-2.4		1.2-2.2		0.9-2.4		1.1-2.3		1.0-2.4	
Sitio del Tumor																
Colon	89	53	92	54	66	55	61	54	41	56	31	51	25	53	30	58
Recto	79	47	75	44	54	45	51	45	32	44	30	49	22	47	21	40
Colon recto	0		2	1	0		1	1	0		0		0		1	2
Sitios Metastásicos																
Hígado	146	87	149	88	108	90	101	89	65	89	54	89	43	91	47	90
Pulmón	65	39	64	38	44	37	45	40	27	37	16	26	17	36	29	56
Hueso	4	2	9	5	3	3	4	4	3	4	1	2	0		3	6
Ganglios linfáticos	45	27	41	24	32	27	25	22	19	26	15	25	13	28	10	19
Otro	27	16	25	15	17	14	17	15	12	16	9	15	5	11	8	15
Órganos con metástasis																
0	1	0.6	0		0		0		0		0		0		0	
1	69	41	74	44	52	43	50	44	31	42	32	52	21	45	18	35
2	63	38	60	36	41	34	38	34	24	33	17	28	17	36	21	40
3	18	11	22	13	15	13	16	14	12	16	9	15	3	6	7	13
4	17	10	13	8	12	10	9	8	6	8	3	5	6	13	6	12
Terapia previa†																
Cirugía	152	91	137	81	108	90	100	88	67	92	50	82	41	87	50	96
Quimioterapia adyuvante	36	21	21	12	19	16	14	12	12	16	8	13	7	15	6	12
Radioterapia	23	14	18	11	13	11	13	12	9	12	5	8	4	9	8	15

Abreviaturas: ITT, intención de tratar; FOLFOX-4, oxaliplatino, leucovorina, and fluorouracilo; ROW, resto del mundo; ECOG PS, Eastern Cooperativa Oncología Grupo performance status; CRC, cáncer colorectal; mCRC, cancer colorectal metastásico; Q1-Q3, Rango intercuartil.

Pacientes enrolados en violación del protocolo.

†Un paciente pudo haber recibido más de un tratamiento previo.

para suprimir la amplificación de la secuencia de tipo salvaje.²⁹ La hibridación post-PCR y el análisis de curva de fusión, utilizando oligonucleótidos marcados con fluorescencia incorporados en la reacción de PCR original, permitió la identificación y la discriminación de las distintas mutaciones sin sentido del codón de *KRAS* 12 y 13.

Análisis de Seguridad

La población de seguridad comprende todos los pacientes que recibieron al menos una dosis del tratamiento de estudio. Todos los eventos adversos (AEs) se reportaron al inicio o a partir del primer día de la medicación del estudio y se capturaron hasta un máximo de 6 semanas después del final de la última administración del tratamiento del estudio, fueron codificados utilizando el Diccionario Médico para Actividades Regulatorias versión 8.1 y resumidos de acuerdo a la peor gravedad por paciente según los Criterios Comunes de Toxicidad del Instituto Nacional del Cáncer versión 2.0

RESULTADOS

Datos Demográficos

Trescientos cuarenta y cuatro pacientes fueron asignados aleatoriamente (tres de ellos por error). De los pacientes elegibles, 337 recibieron el

tratamiento de estudio en 79 centros. La duración del estudio fue desde julio de 2005 hasta marzo de 2006, con 169 pacientes que recibieron cetuximab más FOLFOX-4 y 168 pacientes que recibieron FOLFOX-4 solo (Fig. 1). Las características iniciales demográficas y de la enfermedad estuvieron en general bien balanceadas entre los grupos de tratamiento (Tabla 1). El ADN adecuado para el análisis de mutación de *KRAS* fue extraído de muestras tumorales de 233 pacientes, 113 y 120 de los cuales habían recibido cetuximab más FOLFOX-4 y FOLFOX-4 solo, respectivamente. Estos pacientes constituyeron la población de *KRAS*. En general, la población con tejido disponible para el análisis de *KRAS* (n = 233) se consideró como representativa de la población ITT general (n = 337) en relación con los parámetros demográficos (Tabla 1).

Adherencia al Tratamiento

La duración media del tratamiento con cetuximab fue de 24 semanas, con un 84% de pacientes con una intensidad de dosis relativa (IDR) de $\geq 80\%$. Un número similar de pacientes en ambos brazos había tuvieron RDIs de $\geq 80\%$ para oxaliplatino (75% y el 80% de los pacientes que recibieron cetuximab más

Tabla 2. Datos de Eficacia en las Poblaciones ITT y *KRAS*

Característica	Población ITT (n = 337)				Población <i>KRAS</i> (n = 233)				<i>KRAS</i> Tipo Salvaje (n = 134)				<i>KRAS</i> Mutado (n = 99)			
	FOLFOX-4 (n = 168)		Cetuximab FOLFOX-4 (n = 169)		FOLFOX-4 (n = 120)		Cetuximab FOLFOX-4 (n = 113)		FOLFOX-4 (n = 73)		Cetuximab FOLFOX-4 (n = 61)		FOLFOX-4 (n = 47)		Cetuximab FOLFOX-4 (n = 52)	
	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%
Mejor respuesta general																
Respuesta completa	1	0.6	2	1	3	3	2	2	1	1	2	3	2	4	0	
Respuesta parcial	59	35	75	44	47	39	52	46	26	36	35	57	21	45	17	33
Enfermedad estable	76	45	67	40	47	39	46	41	30	41	19	31	17	36	27	52
Enfermedad progresiva	21	13	18	11	17	14	10	9	12	16	3	5	5	11	7	13
No evaluable	11	7	7	4	6	5	3	3	4	5	2	3	2	4	1	2
Mejor respuesta general tasa†, %																
Todos los pacientes	36		46		42		48		37		61		49		33	
95% CI	29-44		38-53		33-51		38-57		26-49		47-73		34-64		20-47	
Relación de probabilidad		1.516				1.312				2.544				0.507		
95% CI		0.975-2.355				0.779-2.208				1.238-5.227				0.223-1.150		
P (prueba CMH estratificado)		.064				.307				.011				.106		
Tasa de control de la enfermedad‡, %																
Todos los pacientes	81		85		81		89		78		92		85		85	
95% CI	74-87		79-90		73-87		81-94		67-87		82-97		72-94		72-93	
Tiempo PFS, meses																
Media	7.2		7.2		7.2		7.3		7.2		7.7		8.6		5.5	
95% CI	6.0-7.8		5.6-7.7		6.0-7.9		5.6-8.1		5.6-7.4		7.1-12.0		6.5-9.5		4.0-7.4	
Índice de riesgo		0.931				0.928				0.570				1.830		
95% CI		0.705-1.230				0.665-1.295				0.358-0.907				1.095-3.056		
P (prueba de rango-log)		.6170				.6609				.0163				.0192		
Tasas PFS, %																
3 meses	85		83		82		86		78		93		87		78	
95% CI	79-90		78-89		75-89		80-93		69-88		87-100		77-97		67-90	
6 meses	59		53		60		54		54		66		69		39	
95% CI	51-68		45-61		50-69		44-64		42-66		53-79		54-83		25-54	
9 meses	34		34		33		35		27		47		42		20	
95% CI	26-43		26-43		23-43		25-45		15-39		33-62		24-61		7-33	
12 meses	12		24		13		20		13		30		14		6	
95% CI	3-20		15-33		4-23		8-32		2-24		10-49		0-30		0-16	

NOTA. P = 0.05 para los valores en negritas.

Abreviaturas: ITT, intención de tratar; FOLFOX-4, oxaliplatino, leucovorina, and fluorouracilo; CMH, Cochran-Mantel-Haenszel; PFS, supervivencia libre de progresión.

Según la evaluación realizada por la revisión independiente. Mejor respuesta general en la población ITT estuvo basada en los datos disponibles al tiempo fijo a priori del análisis confirmatorio.

†Respuesta completa Respuesta parcial.

‡Respuesta completa respuesta parcial enfermedad estable.

FOLFOX-4 y FOLFOX-4, respectivamente) y FU (67% y 70% de los pacientes, respectivamente). Las reducciones y retrasos en la administración de cetuximab fueron principalmente debido a las reacciones de la piel, y los retrasos en la administración de quimioterapias fueron por reacciones hematológicas, gastrointestinales, o neurológicas. En la población de *KRAS*, se alcanzaron niveles comparables de exposición, el 86% de los pacientes que recibieron cetuximab tuvieron un RDI $\geq 80\%$. Los RDIs $\geq 80\%$ se reportaron también para el 73% y 81% de los pacientes tratados con oxaliplatino y el 65% y 72% de los pacientes que recibieron FU en los brazos de cetuximab más FOLFOX-4 y FOLFOX-4, respectivamente.

Eficacia

Los datos de eficacia se resumen en la Tabla 2. La mejor tasa de respuesta general confirmada en el grupo de cetuximab más FOLFOX-4 fue de 46%, y en el grupo de FOLFOX-4 solo, este valor fue de 36%. La comparación entre los dos grupos de tratamiento resultó en una OR de ECOG ajustado con PS común de 1.52 (IC 95%: 0.98 a 2.36), lo que indica un incremento en la probabilidad de una respuesta en el brazo de cetuximab más FOLFOX-4 de un 52%. Este incremento no fue estadísticamente significativo en el nivel de 5% (prueba CMH ECOG ajustado por PS, $P = .064$). Un efecto del tratamiento ligeramente mayor se observó en el grupo de participantes ($n = 153$ vs 152) con ECOG PS de 0 a 1 (OR = 1.65; 95% CI, 1.04 a 2.60; prueba CMH, $P = .032$). En cuanto a la variable secundaria de eficacia, aunque no se detectó un beneficio marcado en relación con el tiempo PFS (Tabla 2, Fig. 2 A), la adición de cetuximab con FOLFOX-4 se asoció con aproximadamente el doble de la tasa de resección R0 del 2,4% (cuatro de 168 pacientes) de FOLFOX-4 sólo a 4,7% (ocho de 169 pacientes) de cetuximab más FOLFOX-4. La duración media de la respuesta fue también mayor en el grupo de cetuximab (9.0 v 5.7 meses).

Las mutaciones de *KRAS* en los codones 12/13 (en lo sucesivo llamadas mutaciones de *KRAS*) fueron detectadas en el tejido tumoral de 99 de los 233 (42%) pacientes, 52 de los cuales recibieron cetuximab más FOLFOX-4 y 47 de los cuales recibieron FOLFOX-4 solo (Tabla 2). No se detectaron mutaciones en los tumores de 134 pacientes (58%; en lo sucesivo llamados

tumores *KRAS* de tipo salvaje), 61 de los cuales recibieron cetuximab más FOLFOX-4 y 73 de los cuales recibieron FOLFOX-4 solo. En los pacientes cuyos tumores fueron calificados como *KRAS* de tipo salvaje, la adición de cetuximab con FOLFOX-4 se asoció con una mayor posibilidad de 2.54 veces para la respuesta en comparación con FOLFOX-4 solo (61% vs 37%, OR = 2.54, IC 95%, 1.24 a 5.23; prueba CMH ECOG ajustado por PS, $P = .011$). Por el contrario, para los pacientes con mutaciones de tumores *KRAS*, la tasa de respuesta de cetuximab más FOLFOX-4 fue menor, comparado con FOLFOX-4 solo (33% v 49%, OR = 0.51, IC 95%, 0.22 a 1.15; prueba CMH ECOG ajustado por PS, $P = 0.106$). La tasa de resección R0 fue más del doble en los pacientes con tumores *KRAS* de tipo salvaje que recibieron cetuximab más FOLFOX-4 (seis de 61 pacientes; 9.8%) en comparación con aquellos que recibieron FOLFOX-4 solo (tres de 73 pacientes; 4.1%). Por el contrario, en pacientes cuyos tumores portaban mutaciones de *KRAS*, las tasas de resección R0 fueron similares en ambos grupos de tratamiento (uno en 52 y uno en 47 pacientes, respectivamente, el 1,9% y 2,1%). Sin embargo, debido al pequeño número de pacientes, estos datos deben interpretarse con precaución.

El riesgo de progresión de la enfermedad (Figuras 2A y 2B) fue similar tanto para la población ITT (cetuximab más FOLFOX-4 v FOLFOX-4 solo, índice de riesgo [HR] = 0,93; prueba rango-log, $P = .6170$) como para la población *KRAS* (HR = 0,93; prueba rango-log, $P = .6609$), agregando evidencia adicional consistente con la representatividad de la población *KRAS*. Fue evidente una marcada reducción del riesgo de progresión entre los brazos del estudio al comparar los pacientes en función de si las mutaciones de *KRAS* se detectaron en el ADN tumoral. En concreto, como se resume en la Tabla 2 y en la Figura 3, la adición de cetuximab con FOLFOX-4 se asoció con una reducción del 43% en el riesgo de progresión en pacientes con tumores *KRAS* de tipo salvaje (Fig. 3C; HR = 0,57; prueba rango-log, $p = .0163$). En los pacientes tratados con cetuximab más FOLFOX-4, el riesgo de progresión de la enfermedad fue menor para aquellos cuyos tumores eran *KRAS* de tipo salvaje, en comparación con aquellos cuyos tumores portaban mutaciones (Fig. 3A, HR = 0,45; prueba rango-log, $P = .0009$). Sin embargo, en pacientes cuyos tumores portaban mutaciones de *KRAS*, el riesgo de progresión de la enfermedad resultó ser más bajo para los que recibieron FOLFOX-4 solo, en comparación con aquellos que recibieron cetuximab más FOLFOX-4 (Fig.3D;

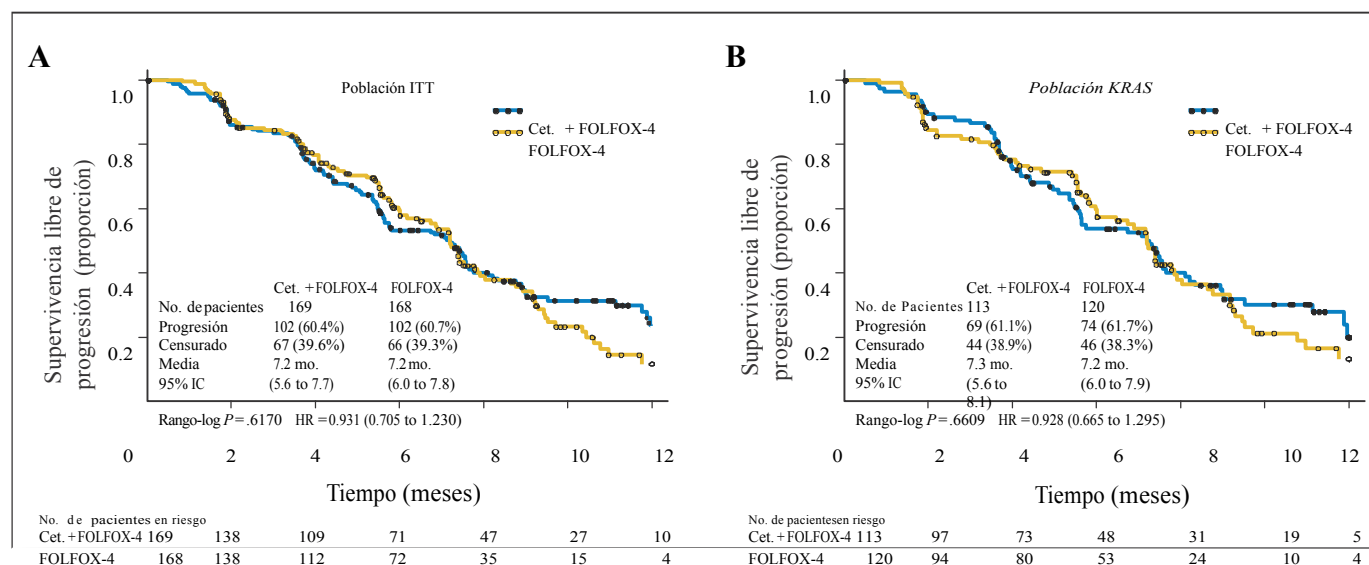


Fig 2. Gráficas de Kaplan y Meier de tiempo de supervivencia libre de progresión para los pacientes en cada brazo del estudio en (a) la población con intención de tratar (ITT) y (B) la población *KRAS*. Cet, cetuximab; FOLFOX-4, leucovorina oxaliplatino, y fluorouracilo; Mo, meses.

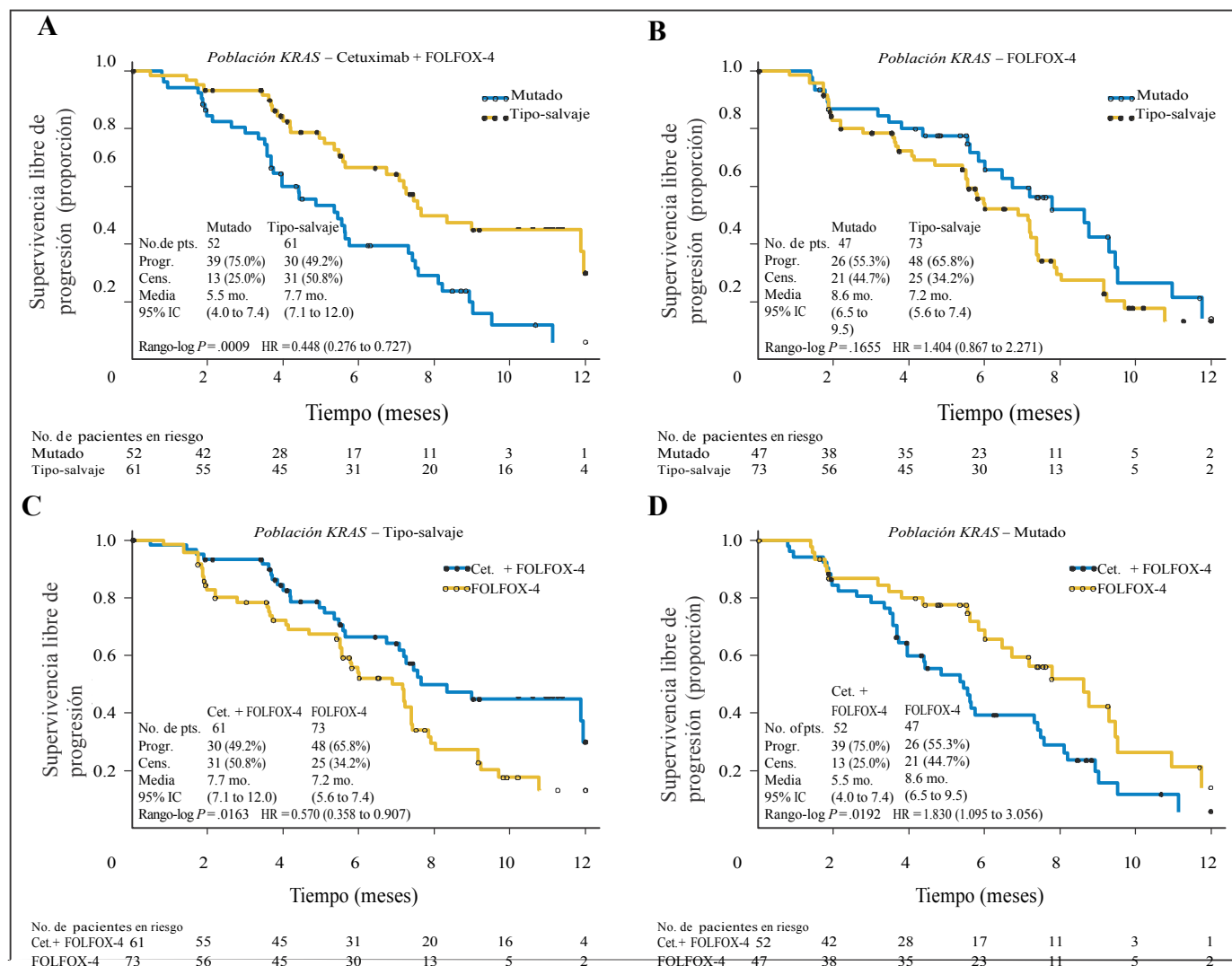


Fig 3. Gráficas de Kaplan y Meier de tiempo de supervivencia libre de progresión de acuerdo con el estado de mutación del tumor KRAS en pacientes (pts) que recibieron (A) cetuximab (Cet.) más oxaliplatino, leucovorina y fluorouracilo (FOLFOX-4) o (B) FOLFOX-4 solo y de acuerdo con el brazo de tratamiento de pts cuyos tumores fueron (C) de tipo salvaje o (D) KRAS mutado Progr., progresión; Cens., censurado; IHR, Índice de riesgo.

HR = 1,83; prueba rango-log, $P = .0192$). Para los pacientes que recibieron FOLFOX-4 solo, también fue evidente una tendencia de riesgo reducido de progresión de la enfermedad asociada con la mutación del tumor KRAS (Fig. 3B; HR = 1.40; prueba rango-log, $P = .1655$).

Seguridad

Los efectos adversos más comunes en cualquier grado fueron trastornos de la piel y del tejido subcutáneo (90%) y trastornos gastrointestinales (78%) en el grupo de cetuximab más FOLFOX-4 y trastornos gastrointestinales (73%) y mielotoxicidad (71%) en el grupo FOLFOX-4 solo. Los eventos adversos más comunes grado 3/4 fueron neutropenia (30% v 34%), erupción (11% v 0,6%) y diarrea (8% v 7%), respectivamente, para el grupo de cetuximab más FOLFOX-4 contra el grupo de FOLFOX-4 solo (Tabla 3).

En el grupo de cetuximab más FOLFOX-4, cetuximab se suspendió en 39 pacientes (23%), la quimioterapia se suspendió en 51 pacientes (30%), y ambos se suspendieron en 16 pacientes (9%), debido a eventos adversos. La quimioterapia se suspendió en 42 pacientes (25%) en el grupo FOLFOX-4 solo debido a EAs. Las razones más comunes para la interrupción de

cetuximab fueron reacciones de hipersensibilidad (4%) y rash (4%), de acuerdo con las guías preestablecidas en el protocolo, y para la interrupción de la quimioterapia en el grupo de cetuximab más FOLFOX-4, neutropenia (4%) y neuropatía (3%). En el grupo FOLFOX-4 solo, neuropatía sensorial periférica (5%), neuropatía y parestesia (4%) y neutropenia (2%) fueron las razones más comunes para la interrupción del tratamiento.

DISCUSIÓN

El fundamento de las pruebas con cetuximab en combinación con FOLFOX-4 se basan en los datos preclínicos que sugieren que cetuximab mejoró la actividad antitumoral de oxaliplatino y también en los datos prometedores de los estudios clínicos fase II.^{16, 30} La mejor tasa de respuesta general confirmada para la población ITT, según la evaluación de la revisión ciega

Tabla 3. Eventos Adversos Relevantes Grado 3 ó 4 que ocurrieron en $\geq 3\%$ de los Pacientes en Ambos Grupos

Evento adverso grado 3/4	FOLFOX-4 (n = 168)		Cetuximab + FOLFOX-4 (n = 170)	
	No. de Pacientes	%	No. de Pacientes	%
Cualquier evento grado 3/4	117	70	129	76
Neutropenia	57	34	51	30
Rash	1	0.6	19	11
Diarrea	12	7	14	8
Leucopenia	10	6	12	7
Trombocitopenia	4	2	7	4
Fatiga	5	3	7	4
Eritrodisestesia palmo-plantar	1	0.6	7	4
Neuropatía sensorial periférica	12	7	7	4
Anemia	4	2	6	4
Categorías compuestas				
Reacciones de la piel †	1	0.6	30	18
Reacciones relacionadas con la infusión‡	3	2	8	5

Abreviaturas: FOLFOX-4, oxaliplatino, leucovorina, y fluorouracilo.

*Sin reacciones grado 4.

†La categoría especial del evento adverso reacciones de la piel incluían los siguientes términos del *Diccionario Médico para Actividades Regulatorias 8.1*: acné, acné postular, celulitis, dermatitis acneiforme, piel seca, erisipela, eritema, edema facial, foliculitis, crecimiento de las pestañas, crecimiento anormal del pelo, hipertrichosis, infección de la cama del clavo, inflamación de la cama del clavo, alteraciones de las uñas, infección de las uñas, paroniquia, prurito, rash, rash eritematoso, rash folicular, rash generalizado, rash macular, rash maculopapular, rash popular, rash postular, rash con prurito, rash, exfoliación de la piel, hiperpigmentación de la piel, necrosis de la piel, síndrome de piel escaldada por estafilococos, telangiectasia, necrosis de la herida, xerosis.

‡La categoría especial del evento adverso reacciones relacionadas con la infusión incluían los siguientes términos del *Diccionario Médico para Actividades Regulatorias 8.1*: insuficiencia respiratoria aguda, apnea, asma, obstrucción bronquial, broncoespasmo, cianosis, disnea, disnea en reposo, disnea exacerbada, disnea de esfuerzo, hipoxia, ortopnea, dificultad para respirar, insuficiencia respiratoria, escalofríos, hiperpirexia, pirexia, infarto agudo de miocardio, Angina de pecho, presión arterial disminuida, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardiopulmonar, clonus, convulsión, epilepsia, hipotensión, reacción relacionada con la infusión, la pérdida de la conciencia, infarto de miocardio, isquemia miocárdica, choque, muerte súbita y síncope, que se producen en el primer día de tratamiento, y reacción anafiláctica, choque anafiláctico, reacción anafilatoide, choque anafilatoide, hipersensibilidad al medicamento e hipersensibilidad, que se producen en cualquier momento durante el tratamiento.

independiente, se incrementó en 10 puntos porcentuales por la adición de cetuximab a FOLFOX-4, en comparación con FOLFOX-4 solo (46% v 36%). A pesar de que esta diferencia mostró una tendencia fuerte y clínicamente relevante, no se pudo establecer un incremento estadísticamente significativo en la probabilidad de respuesta con la adición de cetuximab con FOLFOX-4 ($P = .064$).

Aunque no hubo diferencias aparentes en el tiempo PFS entre los brazos de tratamiento de la población ITT, cuando se realizó el análisis retrospectivo de eficacia en la población *KRAS* de acuerdo con el estado de mutación *de*, notables diferencias fueron evidentes en relación con la respuesta del tumor y el riesgo de progresión de la enfermedad. Los pacientes cuyos tumores fueron *KRAS* de tipo salvaje tuvieron un incremento clínicamente relevante en la probabilidad de respuesta (61% v 37%, OR = 2.54, $P = .011$) y disminución del riesgo de progresión de la enfermedad (HR = 0.57, $P = .016$) en el brazo de cetuximab más FOLFOX-4 en comparación con aquellos en el grupo de FOLFOX-4 solo. La observación de que los pacientes cuyos tumores tenían una mutación en *KRAS* tenían más probabilidades de obtener un beneficio clínico si eran tratados con FOLFOX-4 en vez de que con cetuximab más FOLFOX-4, fue algo inesperado (Fig. 3D). Del mismo modo, tomando en cuenta a los pacientes que recibieron FOLFOX-4 solo,

hubo una tendencia a un mejor tiempo de supervivencia libre de progresión en los pacientes cuyos tumores tenían una mutación *de KRAS* (Fig. 3B).

Queda por verse, si el mejor resultado aparente de los pacientes cuyos tumores tenían mutaciones *de KRAS* que fueron tratados con FOLFOX-4 solo, en comparación con aquellos tratados con cetuximab más FOLFOX-4, fue un hallazgo casual, o si podría tener una explicación biológica.

Teniendo en cuenta, que no se observó un efecto comparable en los grupos de pacientes equivalentes en el estudio CRYSTAL, cuando cetuximab se añadió a FOLFIRI,²³ el tipo de quimioterapia (basada en platino en comparación con la no basada en platino) puede ser un factor en cualquier interacción posible.

Es interesante observar en este contexto que el subgrupo de pacientes con genotipo en el estudio aleatorizado fase III CAIRO2 cuyos tumores tenían una mutación en el gen *KRAS* (n=196) que recibieron capecitabina/oxaliplatino + bevacizumab (n=103) tuvieron una mejor PFS que los que recibieron el mismo régimen más cetuximab (n = 93).

Los estudios OPUS y CAIRO2, plantean la posibilidad de que, en relación a los tumores con mutaciones en el gen *KRAS*, la adición de agentes dirigidos a EGFR a la quimioterapia basada en oxaliplatino, puede perjudicar la eficacia de un componente citotóxico del régimen combinado. Además, una interacción específica entre bevacizumab y cetuximab en relación con el tratamiento de tumores con mutaciones *de KRAS* no se puede excluir. Los estudios experimentales, por lo tanto justifican la exploración de estos efectos hipotéticos del tratamiento en mCRC con *KRAS mutado* con miras a la elaboración de nuevas estrategias clínicas para permitir la extensión de los beneficios de la terapia anti-EGFR en pacientes cuyos tumores tienen mutaciones *del gen KRAS*.

De acuerdo con recientes hallazgos de un estudio fase I de escalamiento de dosis de cetuximab con FOLFIRI,³² y los datos de primera línea del estudio fase III, CRYSTAL,²³ los resultados de los análisis actuales confirman los datos publicados de mCRC tratados previamente, en cuanto a la restricción de la actividad de cetuximab en pacientes cuyos tumores son *KRAS* de tipo salvaje.^{19-22,24} Los datos de *KRAS* también enfatizan el hecho de que el mayor beneficio clínico asociado con cetuximab en esencia puede ser enmascarado, o al menos subestimado, al considerar la población general de pacientes no seleccionados en los estudios aleatorios, como se ilustra por los resultados no significativos en la tasa de respuesta y el riesgo comparable de progresión de la enfermedad en la población ITT.

La combinación de cetuximab y FOLFOX-4 fue generalmente bien tolerada, y no hubo evidencia para sugerir que cetuximab aumentó la frecuencia o la gravedad de la toxicidad conocida de oxaliplatino y FU o viceversa. Además, la incidencia y la gravedad de las reacciones cutáneas, reacciones relacionadas con la infusión, y mucositis fueron consistentes con el perfil de seguridad conocido de cetuximab.

En conclusión, este estudio demostró que a un grado clínicamente significativo, la adición de cetuximab a FOLFOX-4 como tratamiento de primera línea para cáncer colorrectal metastático, aumentó la tasa de respuesta general y redujo el riesgo de progresión de la enfermedad en pacientes cuyos tumores fueron *KRAS* de tipo salvaje, en comparación con FOLFOX-4 solo. Estos datos confirman que el estado de mutación de *KRAS* es un poderoso factor predictivo en relación a la eficacia del tratamiento con cetuximab, y son una clara demostración del potencial y el aumento en la importancia del análisis de biomarcadores tumorales como componente de la selección del tratamiento en la clínica.

REVELACIONES DE LOS POSIBLES CONFLICTOS DE INTERÉS DE LOS AUTORES

Aunque todos los autores completaron la declaración de revelaciones, el autor siguiente(s) indicó un interés financiero o de otro tipo que es relevante para el tema bajo consideración en este artículo. Ciertas relaciones marcadas con una "U" son aquellas para las que no se recibió ninguna compensación; las relaciones marcadas con una "C" fueron compensadas. Para obtener una descripción detallada de las categorías de revelación, o para obtener más información acerca de los conflictos de interés de la política de la ASCO, por favor consulte la sección de Declaración de Revelación del Autor y Declaración de Revelaciones de Posibles Conflictos de Interés en la Información para Contribuyentes.

Empleo o Posición de Liderazgo: Christopher Stroh, Merck Serono (C);

Anja H. Loos, Merck Serono (C); Angela Zubel, Merck Serono (C)

Consultor o Función de Asesor: Carsten Bokemeyer, Merck Serono (C)

Propiedad de Acciones: sin Honorarios: Carsten Bokemeyer, Merck Serono, Sanofi-aventis; Joerg T. Hartmann, Merck Serono

Financiamiento de Investigación: Carsten Bokemeyer, Merck Serono; Gunter Schuch, Merck Serono; Christopher Stroh, Merck Serono

Testimonio de Experto: Ninguno **Otra Remuneración:** Serban Donea, Merck Serono, Sanofi-aventis

REFERENCIAS

- Adenis A, Aranda Aguilar E, Robin YM, et al: Expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR or HER1) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in a large scale metastatic colorectal cancer (mCRC) trial. *J Clin Oncol* 23:278s, 2005 (suppl; abstr 3630)
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-345, 2004
- Folprecht G, Lutz MP, Schoffski P, et al: Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma. *Ann Oncol* 17:450-456, 2006
- Goldstein NS, Armin M: Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: Implications for a standardized scoring system. *Cancer* 92:1331-1346, 2001
- Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, et al: Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22:1201-1208, 2004
- Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al: Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1:1311-1318, 1995
- Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, et al: Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7:301-311, 2005
- Kang X, Patel D, Ng S, et al: High affinity Fc receptor binding and potent induction of antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in vitro by anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab. *J Clin Oncol* 25:128s, 2007 (suppl; abstr 3041)
- Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, et al: Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 13:1552-1561, 2007
- Bibeau F, Crapez E, Di Fiore F, et al: Association of Fc-gamma RIIa and Fc-gamma RIIIa polymorphisms with clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients (mCRC) treated with cetuximab and irinotecan. *J Clin Oncol* 26:579s, 2008 (suppl; abstr 11004)
- Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, et al: Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 357:2040-2048, 2007
- Scheithauer W, Sobrero A, Lenz H, et al: Cetuximab plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) failing prior oxaliplatin-based therapy: The EPIC trial. Presented at 14th European Cancer Conference, September 23-27, 2007, Barcelona, Spain (abstr 3.003)
- Peeters M, Raoul J-L, Van Laethem J-L, et al: Cetuximab in combination with irinotecan/5-fluorouracil (FU)/folinic acid (FA) (FOLFIRI) in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC). Presented at 13th European Cancer Conference, October 30-November 3, 2005, Paris, France (abstr 664)
- Van Cutsem E, Bodoky G, Kyung Roh J, et al: CRYSTAL, a randomized phase III trial of cetuximab plus FOLFIRI vs FOLFIRI in first-line metastatic colorectal cancer (mCRC). Presented at 14th European Cancer Conference, September 23-27, 2007, Barcelona, Spain (abstr 3.001)
- Arnold D, Hoehler T, Ditttrich C, et al: Cetuximab in combination with weekly 5-fluorouracil/folinic acid and oxaliplatin (FUFOX) in untreated patients with advanced colorectal cancer: A phase Ib/II study of the AIO GI group. *Ann Oncol* 19:1442-1449, 2008
- Tabernero J, Van Cutsem E, Díaz-Rubio E, et al: Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25:5225-5232, 2007
- Hamilton SR: Targeted therapy of cancer: New roles for pathologists in colorectal cancer. *Mod Pathol* 21:S23-S30, 2008 (suppl 2)
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al: Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:1626-1634, 2008
- De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, et al: KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 19:508-515, 2008
- Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, et al: Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 96:1166-1169, 2007
- Lièvre A, Bachet JB, Boige V, et al: KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26:374-379, 2008
- Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al: KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66:3992-3995, 2006
- Van Cutsem E, Lang I, D'haens G, et al: KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 26:5s, 2008 (suppl; abstr 2)
- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al: K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359:1757-1765, 2008
- Mantel N, Haenszel W: Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst* 22:719-748, 1959
- Mantel N: Chi-square tests with one degree of freedom: Extensions of the Mantel-Haenszel procedure. *J Am Stat Assoc* 58:690-700, 1963
- Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:457-481, 1958
- Chen CY, Shieh SC, Wu SJ: Rapid detection of K-ras mutations in bile by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping and melting curve analysis: Comparison with restriction fragment length polymorphism analysis. *Clin Chem* 50:481-489, 2004
- Hummelshøj L, Ryder LP, Madsen HO, et al: Locked nucleic acid inhibits amplification of contaminating DNA in real-time PCR. *Biotechniques* 38:605-610, 2005
- Prewett M, Bassi R, Carrick F, et al: Cetuximab (Erbix) enhances clinical efficacy of oxaliplatin in human colon carcinoma xenografts and reverses oxaliplatin resistance. Presented at AACR-NCI-EORTC International Conference, November 14-18, 2005 Philadelphia, PA (abstr B68)
- Punt CJ, Tol J, Rodenburg CJ, et al: Randomized phase III study of capecitabine, oxaliplatin, and bevacizumab with or without cetuximab in advanced colorectal cancer (ACC), the CAIRO2 study of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). *J Clin Oncol*

CONTRIBUCIONES DEL AUTOR

Concepción y diseño: Carsten Bokemeyer, Angela Zubel

Soporte administrativo: Joerg T. Hartmann, Anja H. Loos

Provisión de material de estudio o pacientes: Carsten Bokemeyer, Igor Bondarenko, Anatoly Makhson, Joerg T. Hartmann, Jorge Aparicio, Filippo de Braud, Serban Donea, Heinz Ludwig, Gunter Schuch, Piotr Koralewski

Recopilación y colección de datos: Igor Bondarenko, Anatoly Makhson, Joerg T. Hartmann, Jorge Aparicio, Christopher Stroh, Piotr Koralewski

Análisis de datos e interpretación: Carsten Bokemeyer, Anatoly Makhson, Joerg T. Hartmann, Filippo de Braud, Christopher Stroh, Anja H. Loos

Escritura del Manuscrito: Carsten Bokemeyer, Joerg T. Hartmann, Christopher Stroh, Anja H. Loos

Aprobación Final del manuscrito: Carsten Bokemeyer, Igor Bondarenko, Anatoly Makhson, Joerg T. Hartmann, Jorge Aparicio, Filippo de Braud, Serban Donea, Heinz Ludwig, Gunter Schuch, Christopher Stroh, Anja H. Loos, Angela Zubel, Piotr Koralewski

26:180s, 2008 (suppl; abstr LBA4011)

32. Tabernero J, Cervantes A, Ciardiello F, et al:
Correlation of efficacy to KRASstatus (wt vs. mut)

in patients (pts) with metastatic colorectal cancer
(mCRC), treated with weekly (q1w) and q2w
schedules of cetuximab combined with FOLFIRI.

Presented at ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium, January 25-27, 2008, Orlando, FL
(abstr 435)

■ ■ ■

Reconocimiento

Agradecemos a los pacientes reclutados, el personal médico que contribuyo con su cuidado, y el equipo de estudio de Merck KGaA, en particular Esther Prang, Barbara Kraus, e Ilhan Celik. También queremos agradecer a los investigadores en los 87 centros que reclutaron a pacientes para la detección de la expresión de EGFR (detalladas en el Apéndice).

Apéndice

Centros Participantes

Investigadores de 87 centros en 13 países reclutaron pacientes en la fase inicial de factor de detección del receptor del factor de crecimiento epidérmico del estudio. Austria: Greil Richard (Johanns San Spital-Landeskrankenhaus, Salzburgo), Heinz Ludwig, (der Stadt Wien Wilhelminenspital, Viena), Dieter Lutz (A. O KH der Elisabethinen Linz, Linz.), Samonigg Hellmut (Medizinische Universitätsklinik, Graz), Schüller Johannes (der Stadt KH Rudolfstiftung Wien, Viena), Wöll Ewald (Krankenhaus Zams Vinzenz St, Zams); Bélgica: Filip Baert (Hartziekenhuis Heilig, Roeselare), Bols Alain (AZ Sint-Jan, Brujas), Geert D'Haens (Imeldaziekenhuis, Bonheiden), José Janssens (Sint-Elisabethziekenhuis, Turnhout), Joosens Eric (Middelheim AZ, Antwerpen), Kerger José (Godinne Mont UCL, Yvoir), Mebis Jeroen (Virga Jesse Ziekenhuis, Hasselt), Marc Peeters (UZ Gent, Gent), Eric Van Cutsem (UZ Gasthuisberg, Leuven), Francia: Dominique Béchade (Hôpital d'Instruction des Armées du Val de Grâce, París), Christophe Borg (Minjos Hôpital Jean, Besancon Cedex), Marian Delgado Gil (Groupe Hospitalier Pitié -Salpêtrière, París Cedex 13), Jean Louis Misset (Hospital Saint Louis de París), Eric Raymond (Hôpital Beaujon de Clichy), Wagner, Jean-Philippe (Sainte-Anne Clinique, Estrasburgo), Ychou Marc (CRLC Val d'Aurelle-Paul Lamarque, Montpellier Cedex 5); Alemania: Bokemeyer Carsten (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburgo-Eppendorf), Wolfgang Fischbach (Klinikum Aschaffenburg Medizinische Klinik, Aschaffenburg), Folprecht Gunnar (Universitätsklinikum Dresde, Dresden), Gieseler Frank (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel), Jörg Hartmann, T. (Universitätsklinikum Tübingen, Tübingen), Andreas Hochhaus (Universitätsklinikum Mannheim, Mannheim), Hendrik Kroning (Gemeinschaftspraxis, Magdeburgo), Rainer Lipp (Investigación Innovación Onkologie & Consulting GmbH, Hamburgo), Trarbach Tanja (SGA Universitätsklinikum der -Essen, Essen), Karin Weigang-Köhler (Nord Klinikum Nürnberg, Nürnberg); Grecia: Fountzilas George (Papageorgiou Hospital General de Tesalónica, Tesalónica), Israel: Aderka Dan (Instituto de Oncología, el MC Chaim Sheba, de Tel-Hashomer), Beny Alexander (Centro Médico Rambam, Haifa), Brenner Baruch (Centro Médico Rabin, Tiqva Petah), Arie Figer (Centro de Tel-Aviv Médico Sourasky de Tel-Aviv), Baruch Klein (Instituto de Oncología del Hospital Meir, Sapir MC, Kfar- Saba); Italia: Enrico Cortesi (Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma), María Julia Zampino (Istituto Europeo di Oncologia, de Milán), Luis Dogliotti (SCDU Oncologia Medica-Azienda Sanitaria Ospedaliera San Luigi di Orbassano, Orbassano), Margherita Girino (IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia), Alberto Zaniboni (Fondazione Istituto Poliambulanza-Ospedaliero, Brescia); Polonia: Kazimierz Drosik (Hospital Clínico, Opole), Malgorzata Foszczynska-Kloda (Onkologiczny Regionalny Szpital, Szczecin), Piotr Koralewski (Wojewódzki Szpital Specjalistyczny Chemioterapii Oddział, Cracovia), Marek Nowacki (Przewodu Klinika Nowotworów Pokarmowego im Centrum Onkologii Instytut. Marii Curie Skłodowskiej, Varsovia), Elzbieta Staroslawska (Centrum Onkologii Ziemi Chemioterapii Oddział Lubelskiej, Lublin), Szczylik Cezary (Klinika Onkologii WAM CSK, Varsovia), Marek Wojtukiewicz (Centrum Białostockie Onkologii Oddział Onkologii Klinicznej Białystok), Jerzy Zaluski (Onkologii Wielkopolska Centrum, Chemioterapii Oddział, Poznań), Portugal: Paulo Cortés (Hospital de Santa Maria, Lisboa), Francisco Pimentel (Hospital de San Sebastián, Santa María Feira da); Rumania: Cebotaru Cristina (Oncológica Institutul "Chiricuta de Iones", Cluj-Napoca), Mihai Ciocinaru (Clínica Spitalul de Urgenta Militar Central "Dr. Carol Davila," Bucarest), Serban Donea (Al Instituto Oncológico Bucuresti Trestioreanu. Bucarest), Ionas Iuliu (Spitalul Onesti Municipal, Onesti), Santa Lucia Milian (Oradea Spitalul Judetean Clínica, Oradea), Niculescu Anca (Cabinetul de Oncología Medicala "OncoMed", Timisoara), Ozana Radu (Alba Judetean Spitalul, Alba Iulia), Constantin Volovat (Centrul de Oncología Medicala, Iasi), Federación de Rusia: Akhmadulina Lilya (KLPU Dispensario de la Ciudad de Oncología, Kazan), Berdov Boris (Centro de Investigación Médica Radiológica, Obninsk), Vasily Borisov (la ciudad de Moscú Dispensario Oncología, Moscú), Rustem Khasanov (Clínica Dispensario Oncología, Kazan), Mikhail Kopp (Centro de Oncología de Samara, Samara), Anatoly Makhson (la ciudad de Moscú de Oncología del Hospital # 62, Zona de Moscú), Irina Mitashok (Dispensario Krasnodar Regional de Oncología, Krasnodar), Shelygin Yury (Centro Estatal de la Ciencia de Coloproctología, Moscú), Topuzov Escender (San Petersburgo Mechnikov Academia Estatal de Medicina Clínica de Enfermedades Quirúrgicas # 1, San Petersburgo); España: Rocio García Carbonero (Hospital Severo Ochoa, Madrid), Carlos García Girón (Hospital General Yagüe, Burgos), Ignacio Juez Martel (Hospital Josep Trueta (ICO Girona), Girona), Guillermo López-Vivanco (Hospital de Cruces, Bilbao), Mercedes Salgado Fernández (Complejo Hospitalario Ourense (Hospital Santa María Nai), Ourense), Antonio Sánchez (Hospital Universitario de Puerto de Hierro, Madrid), Isabel Sevilla (Hospital Virgen de la Victoria, Málaga), Jorge Aparicio Urtasun (Valencia, Hospital Universitario La Fe), Valenti, Vicente (Hospital Universitari de Sant Joan, Tarragona); Ucrania: Bolyukh Borys (Vinnitsa Regional de Oncología Centro de la Universidad Estatal de Medicina Vinnitsya, Vinnitsya), Igor Bondarenko (Academia Estatal de Dnipropetrovsk Médica, Hospital de la Ciudad Clínica # 4, Dnepropetrovsk), Tetyana Danylova (Centro de Oncología de Crimea republicano, Simferopol), Oleksandr Dudnichenko (Centro Regional de Oncología de Jarkov, Jarkov Academia de Posgrado Educación, Jarkov), Olena Kolesnik (Instituto de Oncología de la Academia de Ciencias Médicas de Ucrania, Kiev), Oksana Tarasova (Instituto de Radiología Médica Ucrania AMS, Jarkov), Shchepotin Igor (Centro de la Ciudad de Kiev Oncológica, Kiev), Shpyryk Yaroslav (Lviv Oncológica Médica y Centro de Diagnóstico, Lviv).

Métodos: Análisis de la Mutación de KRAS

Patología. Muestras de biopsia del tumor fijadas con formaldehído y embebidas en parafina (FFPE), como bloques de parafina o secciones de parafina de 3- a 5-µm montados en portaobjetos de vidrio, fueron enviados a la instalación central (Merck Serono, Darmstadt, Alemania) para el análisis de la mutación de KRAS. Se hacen cortes de secciones seriadas de cada bloque para el análisis patológico (3 µm) y la extracción de ADN (10 µm, almacenadas a -80 °C en espera de aislamiento). Un patólogo confirmó la presencia de células tumorales

invasivas en el tejido a través del examen de las secciones con manchas de hematoxilina y eosina. Si las células tumorales invasivas no pueden ser confirmadas en una muestra en particular, la biopsia se excluyó de los análisis posteriores.

Extracción de ADN. Para los bloques de tejido FFPE, el ADN fue extraído de tres a seis secciones de 10 µm (dependiendo del tamaño de la biopsia). Si las muestras tumorales estaban disponibles sólo como secciones montadas en portaobjetos de vidrio, la muestra completa se raspa y se transfiere a un tubo de 1.5 ml utilizando un bisturí nuevo para cada portaobjetos, para evitar la contaminación cruzada.

La parafina fue disuelta por la adición de 800 µL de xileno a cada muestra, seguido de una mezcla suave. Posteriormente, 400 µL de etanol (100% v/v) se añadieron a cada tubo. La mezcla se centrifuga durante 2 minutos a 13,000 rpm en una microcentrífuga, se retira cuidadosamente el sobrenadante y se desecha. Si es visible cualquier parafina restante, se repite la extracción de xileno y etanol. La pastilla se lavó con 1,000 µL de etanol (100% v/v) y los tubos se centrifugaron durante 2 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante nuevamente se retiró cuidadosamente y el sedimento que contiene el ADN se secó durante 10 minutos a 55°C. El ADN genómico fue aislado a partir del sedimento seco utilizando un kit DNeasy blood & tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de cada muestra de ADN extraída se determinó mediante la medición de la absorción a 260 nm utilizando un espectrómetro Nanodrop UV/VIS (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). La pureza se evaluó mediante la determinación de la relación 260/280 nm. La calidad del ADN fue evaluado por una amplificación de la reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa (qPCR) independiente de KRAS. El ADN genómico de líneas celulares también se aisló utilizando el kit DNeasy blood & tissue, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificó y se controló su calidad como para el material FFPE.

Métodos: Detección de la Mutación de KRAS por un análisis de la curva de sujeción y de fusión de qPCR mediada por un ácido nucleído bloqueado

Sujeción de qPCR mediada por un ácido nucleico. Las reacciones de PCR se realizaron en un sistema LightCycler 2.0, utilizando un programa específico de detección de la mutación de KRAS con un análisis adicional de la curva de fusión, en una amplificación de qPCR de un paso y la detección se ejecuta mediante el ensayo LightMix k-ras Gly12 (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania). La metodología fue adaptada de Chen et al.²⁸ Las reacciones de PCR incorporaban: un par de cebadores específicos-KRAS (KRAS adelante, KRAS inverso), que amplifica un fragmento genómico de 164 pares base del exón 2 de KRAS, dos sondas sensor de hibridación que cubren la región del punto de conflicto de la mutación alrededor de los codones 12 y 13; y una sonda ancla (Ancla FL), que fue marcada en el extremo 3' con fluoresceína. Las sondas sensor fueron marcadas en el extremo 5' con LC tinte rojo y el extremo 3' fueron fosforilados para prevenir la extensión. La amplificación del ADN de KRAS de tipo salvaje en la reacción de PCR fue inhibida por la temperatura estable de la unión de la secuencia del ácido nucleico bloqueado específico de KRAS de tipo salvaje (2' -4' puente de ribosa central).

El análisis de la mutación se realizó por duplicado para cada muestra del tumor. La reacción de PCR se realizó en un volumen total de 20 µL que contienen: 7.4 µL de agua calidad-PCR, 1,6 µL MgCl₂ 25 mM, 4,0 µL de reactivo/mezcla de cebadores (reactivos de parámetros específicos que contienen tanto los cebadores de PCR, un ancla, dos sondas sensor, y LNA), 2.0 sensores de mezcla maestra de qPCR (Roche Diagnostics, Penzberg, Alemania), y 5 sensores de la solución genómica de ADN (50 ng). Las reacciones de PCR que incorpora una mezcla 1:10 de ADN (1 ng) derivados de líneas de células con mutaciones de KRAS definidas y ADN (10 ng) de líneas celulares con KRAS de tipo salvaje fueron incluidos como controles positivos en cada serie. Las reacciones de PCR con 10 ng de ADN derivados de células con KRAS de tipo salvaje se realizaron como controles negativos en cada serie. Las condiciones de qPCR comprenden una incubación de preincubación de 600 segundos a 95°C seguido por 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos, 58°C durante 5 segundos, y 72°C durante 12 segundos.

Análisis de la curva de fusión. Después de que la ejecución qPCR se completó, un análisis de la curva de fusión se realizó mediante la medición de la fluorescencia de las muestras al aumentar la temperatura. Inicialmente, los productos de PCR se desnaturalizaron a 95°C. El enfriamiento posterior de la mezcla de reacción permitió que la sonda ancla y la sonda sensor específicas de mutación, recocer la secuencia genómica amplificada de KRAS, lo que resulta en un incremento de la fluorescencia, debido a la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre el ancla recocida y la tinta de la sonda sensor. La curva de fusión se evaluó mediante el calentamiento de la muestra de 40°C a 85°C, con monitorización continua de la fluorescencia en el canal 640/530-nm. A una temperatura determinada, en función de la identidad de la mutación de KRAS, la unión de la sonda sensor a la cadena de ADN se vio interrumpido. Esto dio lugar a la separación espacial de las parejas de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, y como consecuencia, una disminución de la fluorescencia. El cambio de intensidad de fluorescencia se convirtió en un pico de fusión (T_m) mediante el trazado de la derivada negativa de la señal fluorescente correspondiente a la temperatura ($-dF/dT$). El programa de análisis de la curva de fusión abarcó una preincubación de 20 segundos a 95°C, seguida de 20 segundos a 58°C, seguida de 10 segundos a 40°C, seguida de un calentamiento a 85°C a 0.3°C/segundo. Diferentes mutaciones individuales de KRAS muestran diferentes valores de T_m característico. Cada uno puede ser identificado mediante la comparación de T_m de la muestra experimental con los valores de T_m de un panel de controles positivos.