

BRAF – nowy cel terapeutyczny w raku jelita grubego

BRAF – a new therapeutic target in colorectal cancer

Paweł M. Potocki, Piotr J. Wysocki

Katedra i Klinika Onkologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Streszczenie

Mutacja *BRAF V600E*, o ugruntowanej już roli w leczeniu przerzutowego czerniaka, w ostatnich latach była intensywnie badana u chorych na przerzutowego raka jelita grubego. Występuje w około 10% przypadków tego nowotworu. Dowiedziono, iż jest negatywnym czynnikiem rokowniczym, chociaż nowsze prace wskazują na złożoną zależność tego efektu od stanu genów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA typu „mismatch”. Niezależnie od faktu, iż znaczenie predykcyjne mutacji *BRAF V600E* dla chemioterapii oraz leczenia celowanego pozostaje przedmiotem kontrowersji, konieczność odmiennego podejścia do leczenia systemowego pacjentów z tej grupy jest podnoszona w wytycznych międzynarodowych towarzystw naukowych. Badane są liczne opcje terapii: od intensyfikacji klasycznych schematów chemioterapii podawanych w pierwszej linii, po innowacyjne kombinacje leków celowanych mające na celu zniesienie efektu mutacji *BRAF V600E* na aktywację osiowych, dla karcynogenezy, szlaków transdukcji sygnału. Niniejsza praca przeglądowa ma na celu przybliżenie tego złożonego tematu onkologom zajmującym się na co dzień leczeniem nowotworów przewodu pokarmowego.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, BRAF, V600E, FOLFOXIRI

Przedrukowano za zgodą z: *Onkologia w Praktyce Klinicznej – Edukacja* 2018; 4 (2): 94–103

(Artykuł jest tłumaczeniem pracy z: Potocki PM, Wysocki PJ. BRAF – a new therapeutic target in colorectal cancer. *Oncol Clin Pract* 2018; 14; DOI: 10.5603/OCP.2018.0013)

Wstęp

Rak jelita grubego jest rozpoznawany co roku u około 1,4 miliona pacjentów na świecie, w tym u ponad 18 tys. w Polsce [1, 2]. Z uwagi na niezadowalające wskaźniki przeżyć 5-letnich (< 60% w Europie, < 50% w Polsce) – istnieje ogromne zapotrzebowanie na rozwój nowych, bardziej efektywnych opcji terapeutycznych.

Przez ostatnie trzy dekady obserwowano początek i intensywny rozwój onkologii spersonalizowanej. Wraz z lepszym zrozumieniem mechanizmów stojących za wzrostem nowotworu, jego inwazyjnym charakterem oraz złożonymi interakcjami z mikrośrodowiskiem zaczęto coraz lepiej dopasowywać nowe opcje terapeutyczne do unikalnego profilu danego chorego. Rozwój wiedzy o czynnikach

prognostycznych pozwolił przewidywać dynamikę choroby i odpowiednio dostosowywać intensywność leczenia. Rosnący zasób biomarkerów predykcyjnych potencjalnie zmniejsza możliwość niepowodzenia terapii.

Te i inne postępy pozwoliły na wydłużenie mediany przeżycia pacjentów z zaawansowanym rakiem jelita grubego z 16 miesięcy oferowanych przez dublet cytotoksyczny 10 lat temu [3] do ponad 30, jeśli użyje się współczesnych strategii leczenia skojarzonego, w tym ukierunkowanego na receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epithelial growth factor*) i naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) [4]. Poprawa wyników nie dotyczy jednak wszystkich chorych w równym stopniu. Zidentyfikowane grupy chorych o szczególnie złym rokowaniu, podobnie jak w innych nowotworach, przyciągają uwagę badaczy.

Znaczenie roli kinazy protoonkogennej BRAF (*type B rapid accelerated fibrosarcoma*) w karcynogenezie ugruntowały opublikowane w 2002 roku prace zespołu *Cancer Genome Project* [5]. Jej deregulacja, powszechna w różnych nowotworach, a najczęstsza w czerniaku, raku jelita grubego i glejakach, była przedmiotem intensywnych badań. BRAF funkcjonuje głównie jako kinaza o charakterze regulatorowym – będąca jednym z przekaźników sygnału z błonowych receptorów dla czynników wzrostu. W szczególności wchodzi ona w skład sygnałowego szlaku kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK, *mitogen activated protein kinase*, inaczej RAS-RAF-MEK-ERK), będąc jednym z przekaźników tego osiowego, dla regulacji aktywności proliferacyjnej komórek nabłonkowych, szlaku (ryc. 1). Gen BRAF może podlegać szeregowi mutacji aktywujących. Spośród nich, zwłaszcza te występujące w kodonie 600, zostały powiązane z silną aktywacją szlaku MAPK, który, jak wiadomo, napędza procesy kluczowe dla karcynogenezy: proliferację, inwazję i angiogenezę. Rozwój cząsteczek celowanych przeciwko zmutowanej kinazie BRAF (wemurafenib, dabrafenib), jak również przeciwko kinazie MEK aktywowanej bezpośrednio przez BRAF (trametynib, kobimetynib) doprowadził do istotnej poprawy rokowania chorych na przerzutowego czerniaka z mutacją BRAF V600. Spektakularne efekty hamowania BRAF w czerniaku zwróciły uwagę onkologów na inne nowotwory cechujące się wysoką częstością występowania tej mutacji. Pod tym względem jednym z najbardziej obiecujących wydawał się przerzutowy rak jelita grubego (mCRC, *metastatic colorectal cancer*).

Dowiedziano o negatywnym wpływie mutacji BRAF V600 na rokowanie chorych na raka jelita grubego i powiązanie jej występowanie z potencjalną opornością na niektóre formy leczenia systemowego. Pojawiły się również dane dotyczące możliwości intensyfikacji terapii, jak również prób interwencji przyczynowych – skutecznych w tej źle rokującej grupie chorych. W miarę przekładania nowych odkryć na praktykę kliniczną BRAF zyskuje na znaczeniu jako kolejny czynnik kształtujący optymalną strategię terapeutyczną.

Niniejszy artykuł ma na celu podsumowanie aktualnej wiedzy i przybliżenie onkologom leczącym pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego potencjału klinicznego BRAF.

Rola w karcynogenezie

Sekwencja gruczolak–gruczolakorak, uznawana obecnie za klasyczną drogę karcynogenezy raka jelita grubego, jest zapoczątkowywana przez *knock-out* genu APC i rozwój niestabilności chromosomalnej. Inne zmiany, takie jak *knock-out* TP53 oraz aktywacja KRAS czy BRAF, mają miejsce w kolejnych etapach [6].

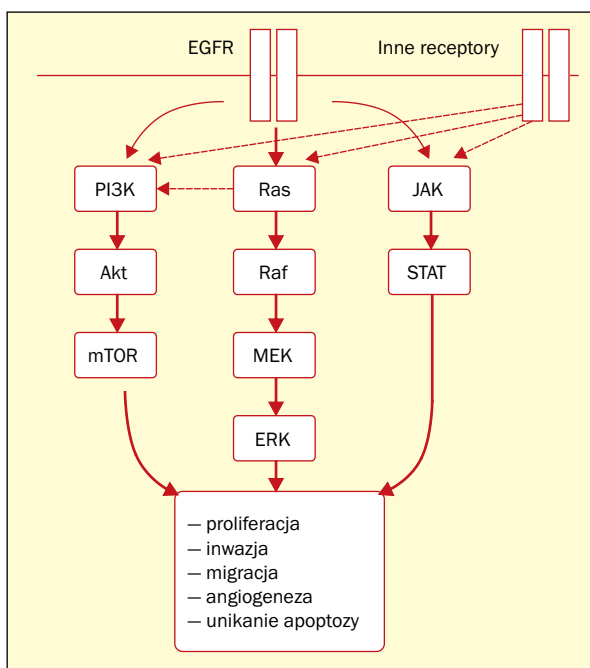
Alternatywna ścieżka karcynogenezy została zaproponowana na podstawie analizy genomu gruczolakoraków

zabkwonanych, w przypadku których wykazano, że polipy zabkwonane są dla nich zmianami prekursorowymi. Wykazano, iż hiperaktywacja BRAF, jak również nabycie fenotypu metylatora wysp CpG (*CpG island methylator phenotype* CIMP) są wczesnymi etapami ich patogenezy [7]. Później występujące mutacje dezaktywujące CDKN2A (p16) i TP53 oraz aktywacja szlaku WNT/β-keniny prowadzą do powstania gruczolakoraka o charakterystycznych cechach.

Znaczenie szlaku MAPK w patofizjologii raka jelita grubego jest powszechnie uznana. Zlokalizowany w chromosomie 7 gen BRAF koduje jedną z trzech białkowych kinaz serynowo-treoninowych rodziny RAF (pozostałe dwie to ARAF i CRAF). Najlepiej opisaną konsekwencją aktywacji kinazy jest zależna od MAPK stymulacja wzrostu i proliferacji. Opisano jednak także regulowaną przez białka z rodziny RAF aktywację równoległych szlaków regulatorowych, skutkującą wystąpieniem osiowych dla nowotworzenia cech: zwiększeniem ruchliwości i rozwojem oporności na mechanizmy indukujące śmierć komórki [8].

Występowanie i wartość prognostyczna

Mutacje BRAF występują w około 15% wszystkich ludzkich nowotworów [5] i w około 10% przypadków mCRC (tab. 1) [9–13]. Najczęstsza z mutacji lokalizuje się w eksonie 15 genu, powodując substytucję małej hydrofobowej



Rycina 1. Uproszczony schemat sygnalizacji w trzech najważniejszych dla biologii nowotworów nabłonkowych szlakach regulujących procesy wzrostu i różnicowania

Tabela 1. Częstość występowania mutacji BRAF w dużych badaniach klinicznych

Publikacja (n)	Badanie/baza danych	BRAF V600E	BRAF nonV600E
Seymour i wsp. (2013) [9] (n = 696)	PICCOLO	9,1% (n = 63)	N/A
Venderbosch i wsp. (2014) [10] (n = 3063)	CAIRO, CAIRO2, COIN, FOCUS	8,2% (n = 250)	N/A
Modest i wsp. (2016) [11] (n = 1239)	FIRE-1, FIRE-3, AIOKRK0207, AIOKRK0604, R091	6,0% (n = 74)	N/A
Cremolini i wsp. (2015) [12] (n = 629)	Dedykowana baza danych z ośrodków włoskich	12,2% (n = 77)	1,6% (n = 10)
Jones i wsp. (2017) [13] (n = 9643)	Mayo Clinic, MD Anderson, Foundation Medicine	7,9% (n = 757)	2,2% (n = 208)
Ogółem (n = 15 270)		8,7% (n = 1221)	2,1% (n = 218)

Tabela 2. Różnica parametrów skuteczności leczenia i przeżycia w zależności od statusu mutacji BRAF

Nazwa badania	Mediana PFS (miesiące)		Mediana OS (miesiące)	
	BRAF WT	BRAFmut	BRAF WT	BRAFmut
Modest i wsp. (2016) [11] (n = 1239)	10,3	7,4	26,9	11,7
Analiza zbiorcza FIRE-1; FIRE-3; AIO-KRK0604; AIO-KRK 0207; R091	(p < 0,001)		(p < 0,001)	
Pierwsza linia, różne schematy cytotoksyczne ± bewacyzumab				
Venderbosch i wsp. (2014) [10] (n = 3063)	7,7	6,2	17,2	11,4
Analiza zbiorcza CAIRO; CAIRO2; COIN; FOCUS	(p < 0,001)		(p < 0,001)	
Pierwsza linia, różne schematy cytotoksyczne ± bewacyzumab				

waliny przez większy, polarny kwas glutaminowy w kodonie 600 (V600E). Będąc jej rezultatem zmieniona konformacja kinazy cechuje się aktywnością około 10 razy silniejszą w porównaniu z typem dzikim [5]. Warto zauważyć, że w mCRC mutacja ta prawie nigdy nie współistnieje z mutacjami KRAS i NRAS, może natomiast współistnieć z mutacjami w genie PIK3CA (katalitycznej podjednostki alfa kinazy fosfatydyloinozytolu).

Charakterystyczne cechy kliniczne i patologiczne raka jelita grubego związanego z mutacją BRAF V600E to: częstsze występowanie u kobiet, starszy wiek przy rozpoznaniu, proksymalna (prawostronna) lokalizacja guza pierwotnego, wyższy stopień zaawansowania, skłonność do rozsiewu śródtrzewnowego, częściej obserwowany fenotyp śluzowy, niższy stopień zróżnicowania oraz często współwystępująca niestabilność mikrosatelitarna (MSI, *microsatellite instability*) [14].

Dane z większości dużych badań klinicznych wskazują na negatywną wartość prognostyczną mutacji BRAF V600E we wszystkich stadiach choroby.

Wyniki analizy danych z badania *Pan European Trial in Adjuvant Colon Cancer* (PETACC-3), jak również z badań kohortowych [15–17] obejmujących chorych poddanych resekcji o założeniu radykalnym wskazują, iż obecność

mutacji BRAF negatywnie wpływa na całkowity czas przeżycia (OS, *overall survival*), ale nie na czas wolny od nawrotu (RFS, *relapse-free survival*).

Podobnie negatywne znaczenie rokownicze mutacji BRAF obserwuje się w chorobie przerzutowej (tab. 2). Analiza zbiorcza danych z dużych badań klinicznych rekrutujących pacjentów z nieleczonym systemowo mCRC (CAIRO 1 i 2, COIN, FOCUS; n = 3063) wykazała istotny wpływ mutacji BRAF na medianę OS: 11,4 vs. 17,2 miesiąca HR 1,91 (1,66–2,19), p = 0,001 oraz medianę czasu wolnego od progresji (PFS, *progression-free survival*): 6,2 vs. 7,7 miesiąca HR 1,34 (1,17–1,54), p < 0,001 [10]. Podobna analiza danych badań grupy AIO (n = 1239) wykazała również negatywny wpływ mutacji BRAF na OS: 11,7 vs. 26,9 miesiąca HR 2,99 (2,1–4,25), p < 0,001 oraz mPFS: 7,4 vs. 10,3 miesiąca HR 2,19 (1,59–3,02), p < 0,001 [11].

Wreszcie, opublikowana w grudniu 2016 roku analiza zbiorcza badań FOCUS, COIN i PICCOLO (n = 2071) wykazała istotne negatywne znaczenie rokownicze mutacji BRAF: mediany OS 10,8 vs. 16,4 miesiąca HR 1,49 (1,23–1,80), p < 0,001, bez wpływu na PFS [18]. Odsetek kontroli choroby (DCR, *disease control rate*) w pierwszej linii leczenia nie różnił się istotnie między rakami z mutacją lub bez mutacji BRAF: dla badania

Tabela 3. Częstość występowania mutacji *BRAF V600E* oraz względne ryzyko (RR) jej wystąpienia w rakach MSI w porównaniu z rakami MSS

Publikacja Stopień zaawansowania	<i>BRAF V600E</i> mut spośród MSS	<i>BRAF V600E</i> mut spośród MSI	RR	MSI spośród <i>BRAF V600E</i> mut
Lochhead i wsp. (2013) [25]; CS I-IV	7,6% (81/1060)	52,3% (101/193)	6,88	55,5% (101/182)
Venderbosch i wsp. (2014) [10]; CS IV	6,8% (197/2910)	34,6% (53/153)	5,09	21,2% (53/250)
Seppälä i wsp. (2015) [26]; CS I-IV	5,4% (34/634)	57,7% (60/104)	10,69	63,8% (60/94)
Nakaji i wsp. (2017) [27]; CS I-III	5,4% (23/428)	40,9% (18/44)	7,57	43,9% (18/41)
Taieb i wsp. (2017) [28]; CS III	7,1% (279/3934)	42,1% (201/477)	5,93	41,9% (201/480)
Ogółem	6,8% (614/8966)	44,6% (433/971)	6,56	41,4% (433/1047)

MSS (*microsatellite stable*) – stabilność mikrosatelitarna; MSI (*microsatellite instability*) – niestabilność mikrosatelitarna

FOCUS HR = 1,01 (0,36–2,84), $p = 0,97$; dla badania COIN HR = 0,76 (0,49–1,20), $p = 0,24$. Istotnie, na korzyść chorych z prawidłowym genem *BRAF*, różniły się natomiast wskaźniki przeżycia po progresji: dla badania FOCUS HR = 1,65 (1,03–2,67), $p = 0,038$; dla badania COIN HR = 1,72 (1,35–2,19), $p < 0,001$. Na tej podstawie wysunięto wniosek, iż to nie oporność na leczenie cytotoksyczne, lecz dynamiczna, objawowa progresja, występująca w trakcie lub po pierwszej linii leczenia, przyczynia się do gorszego rokowania.

Negatywny wpływ mutacji *BRAF* na rokowanie obserwuje się również u pacjentów poddawanych chirurgicznemu leczeniu choroby oligometastatycznej. Resekcje przerzutów są wykonywane u nich rzadziej, a PFS i OS po takich zabiegach są istotnie gorsze niż w populacji ogólnej [19–21]. Nowsze doniesienia jednak pokazują, iż mimo tego negatywnego efektu chorzy z mutacją leczenia w doświadczonych zespołach wielodyscyplinarnych rokują lepiej, jeśli są poddawani resekcjom przerzutów [22, 23].

Mutacja *BRAF V600E* wchodzi również w skład bardziej złożonych modeli rokowniczych. W najnowszej klasyfikacji molekularnej CRC jest ona jednym z wyznaczników podtypu CMS1 – immunologicznego podtypu CRC, związanego z aktywacją układu odpornościowego. CMS1 w porównaniu z innymi podtypami CRC wiąże się z najgorszym rokowaniem w chorobie przerzutowej (choć nie z największym odsetkiem nawrotów w chorobie wczesnej), może jednak być potencjalnie najbardziej wrażliwy na immunoterapię inhibitorami punktów kontrolnych [24].

Podsumowując, agresywna dynamika raka z mutacją *BRAF V600E* powoduje, iż mediana przeżycia w tej podgrupie jest około połowę niższa niż w populacji ogólnej, a z uwagi na agresywną progresję mniej niż połowa chorych jest poddawana leczeniu systemowemu ≥ 2 linii [18].

Związek *BRAF* z MSI

Upośledzenie mechanizmów uszkodzeń DNA typu „mismatch” (*dMMR, deficiency of mismatch repair*) prowadzi do niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) – to jest akumulacji

mutacji o charakterze wtrąceń lub delecji krótkich sekwencji nukleotydów (mikrosatelit) cechujących się zmniejszoną siłą wiązania polimerazy DNA. Proces ten może być związany z dziedzicznym niedoborem aktywności jednego z genów odpowiedzialnych za ten typ naprawy (*MLH1, MSH2, MSH6, PMS2*), co jest istotą patogenezy zespołu Lyncha (inaczej HNPCC, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*). Częstszą jednak przyczyną MSI jest sporadycznie występujące wyłączenie funkcji genu (najczęściej w mechanizmie epigenetycznym).

Zauważono, iż w rakach z MSI spowodowaną sporadycznie występującą dysfunkcją MMR, mutacja *BRAF V600E* występuje kilkakrotnie częściej (tab. 3) niż w rakach MSS (*microsatellite stable*) [10, 25–28], prawie nigdy natomiast mutacja *BRAF V600E* nie występuje w rakach powstałych w przebiegu zespołu Lyncha [29]. Z przytaczanych w tabeli 3 analiz wynika, iż nawet 42% wszystkich mutacji *BRAF V600E* w raku jelita grubego współistnieje z niestabilnością mikrosatelitarną, chociaż, jeśli ograniczy się analizę tylko do nowotworów w stadium rozsiewu, współczynnik ten spada do około 20% (tab. 3).

Natura związku mutacji *BRAF* z występowaniem MSI jest przedmiotem kontrowersji. Niestabilność genomu towarzysząca niedoborowi MMR wydaje się prostym wytłumaczeniem zwiększonej częstotliwości mutacji w ogóle, a więc również mutacji *BRAF*. Hipoteza ta jednak nie tłumaczy obserwowanej, mniejszej częstości występowania mutacji *RAS* w tej populacji, ani też wspomnianego powyżej niewystępowania mutacji *BRAF* w rakach na tle HNPCC.

Kilku autorów zauważyło, iż negatywny efekt rokowniczy mutacji *BRAF V600E* na czas przeżycia całkowitego jest mniejszy lub wręcz zupełnie zanika w przypadku jej współistnienia z niestabilnością mikrosatelitarną [25, 28, 30, 31]. Jest to zgodne z przytaczanym wcześniej, rzadszym współwystępowaniem mutacji *BRAF V600E* z MSI w chorobie rozsianej w stosunku do populacji ogólnej (świadczyłoby to, że za obserwowany negatywny wpływ mutacji *BRAF V600E* na parametry przeżycia w rozsiewie są odpowiedzialne przede wszystkim raki bez niestabil-

ności mikrosatelitarnej). Przyczyna tej zależności wciąż nie jest jasna, warto jednak zauważyć, iż w pracach eksplorujących ten temat niedostatecznie byli reprezentowani chorzy rozpoznani w stopniu IV, a status biomarkerów (RAS, BRAF, MSI) oznaczano u nich najczęściej w guzie pierwotnym – nie brano więc pod uwagę heterogenności fenotypu nowotworu w przestrzeni (przerzut vs. guz pierwotny) i w czasie (pacjenci nieleczeni vs. zmiany odporne na leczenie systemowe).

Związek BRAF i MSI jest skomplikowany i nie do końca poznany. Opracowania dotyczące wieloparametrowej klasyfikacji molekularnej CRC wskazują, iż zaburzenia te zdają się wiązać z różnymi konsekwencjami w zależności od tego, czy występują razem, czy oddzielnie, a także od tego, czy występują w chorobie miejscowej czy przerzutowej [24, 31]. Zagadnienie to nabiera coraz większego znaczenia, zwłaszcza w kontekście niedawno opisanego związku między MSI a wrażliwością mCRC na terapię inhibitorami punktu kontrolnego i w konsekwencji rejestracji pembrolizumabu i niwolumabu w tym wskazaniu.

Wartość predykcyjna

Wartość predykcyjna mutacji *BRAF V600E* dla chemioterapii cytotoksycznej pozostaje kontrowersyjna. W badaniu retrospektywnym wykazano dla chorych z mutacją równoważność oksaliplatyny i iryrotekanu podawanych w ramach pierwszej linii leczenia [32]. Ponadto wydaje się, że parametry oceniające odpowiedź na leczenie systemowe pierwszej linii (PFS, DCA czy odsetek odpowiedzi obiektywnych – ORR) nie różnią się istotnie w przypadku raków z tą mutacją w stosunku do populacji ogólnej [10, 18].

Dyskusyjny pozostaje też wpływ mutacji *BRAF V600E* na skuteczność terapii skierowanej przeciwko EGFR (cetuksymab, panitumumab). Mutacje aktywujące *KRAS* i *NRAS* są znanym negatywnym czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na leki z tej grupy. Zaproponowano, iż mutacja aktywująca *BRAF* – białka, będącego kolejnym po RAS, przekaźnikiem sygnału w tym szlaku – będzie również wiązać się z opornością na przeciwciała anti-EGFR. U chorych wcześniej leczonych efekt ten zaobserwowano dla obu przeciwciał retrospektywnie [33–35], a następnie dla panitumumabu w prospektywnym badaniu PICCOLO [9]. Co ciekawe, istotnej statystycznie wartości predykcyjnej mutacji *BRAF* nie udało się zaobserwować w badaniach nad rolą przeciwciał anti-EGFR w skojarzonych schematach chemioterapii I linii: FIRE-3; AGITG C0.17; NORDIC-VII, CRYSTAL, OPUS [4, 36–38].

W metaanalizie z 2015 roku autorstwa Pietrantonio i wsp. analizowano dane z 10 badań klinicznych oceniających wpływ leków anti-EGFR na rokowanie: 6 badań w pierwszej linii; 2 badania w drugiej linii i 2 badania w ko-

lejnych liniach. W populacji z mutacją *BRAF* w porównaniu z populacją bez niej pokazano brak korzystnego wpływu z dodania cetuksymabu czy panitumumabu do standardowego leczenia (chemioterapii lub leczenia objawowego), zarówno w kategoriach PFS (HR = 0,88; 95% CI 0,67–1,14; $p = 0,33$), jak i OS (HR = 0,91; 95% CI 0,62–1,34; $p = 0,63$).

Jednak w opublikowanej w tym samym roku metaanalizie autorstwa Rowland i wsp. analizowano dane z 8 badań klinicznych oceniających wpływ leków anti-EGFR na rokowanie: 4 badania w pierwszej linii; 1 badanie w drugiej linii i 3 badania w kolejnych liniach – wszystkie z nich analizowano również w metaanalizie wspomnianej powyżej. Autorzy tej publikacji wyłączyli z analizy badania, w których komparator zawierał bewacyzumab oraz użyli innej metodologii analizy statystycznej. Doszli oni do konkluzji, iż na podstawie tych danych nie można dowieść braku korzyści z terapii anti-EGFR u chorych z mutacją *BRAF* w porównaniu z chorymi bez niej, ponieważ znaleźli wyłącznie nieistotne statystycznie różnice między nimi: dla PFS odpowiednio HR 0,86 (95% CI 0,61–1,21) vs. 0,81 (95% CI 0,70–0,95), dla OS odpowiednio HR 0,97 (95% CI 0,67–1,41) vs. 0,62 (95% CI 0,50–0,77).

Odmienność mutacji *BRAF* innych niż *V600E*

Do niedawna kliniczna wiedza na temat roli, jaką aktywacja *BRAF* odgrywa w biologii mCRC, ograniczała się do najlepiej poznanej mutacji – *V600E*. Pierwsze opisy rzadziej występujących mutacji opublikowano w 2015 roku [12], jednak na lepszą ich charakterystykę pozwoliła dopiero opublikowana niedawno przez Jonesa i wsp. analiza sekwencji genomów niespełna 10 tys. raków, pochodzących z amerykańskich baz danych [13]. Częstość występowania mutacji *BRAF* innych niż *V600E* przedstawiono w tabeli 1.

W pracy tej, spośród 208 przypadków tego typu mutacji, 112 wiązało się z obniżeniem, a 44 ze wzrostem aktywności kinazy. Znaczenie biologiczne pozostałych 52 mutacji nie zostało określone. Dla 101 przypadków autorzy dysponowali danymi klinicznymi. Na podstawie ich analizy wykazano znacznie rzadsze występowanie opisywanych wyżej cech kliniczno-patologicznych raków z mutacją *BRAF V600E* w grupie chorych z mutacjami innymi niż *V600E*.

W szczególności, mutacje *BRAF* inne niż *V600E* wiązały się z lepszym rokowaniem nie tylko w porównaniu z populacją chorych z rakami z mutacją *V600E*, lecz także z ogólną populacją chorych (mediana OS odpowiednio 60,7 vs. 11,4 vs. 43,0 miesiąca, $p < 0,001$). Fakt ten łatwo wytłumaczyć zmniejszoną aktywnością kinazy, jednak przytaczany przez autorów przegląd badań przedklinicznych wskazuje na większą złożoność mechanizmu biologicznego oraz również na potencjalne nowe cele terapeutyczne.

Intensyfikacja chemioterapii w pierwszej linii

Wykazano, iż ekspozycja na wszystkie aktywne w mCRC leki (5-FU, oksaliplatynę, irynotekan) wiąże się z dłuższym przeżyciem [39]. Ponieważ chorzy z mutacją *BRAF* mają istotnie mniejszą szansę na otrzymanie drugiej i kolejnych linii [18], strategią dającą nadzieję na poprawę ich rokowania może być intensyfikacja schematu pierwszoliniowego.

W przeprowadzonym przez grecką grupę HORG pierwszym badaniu oceniającym schemat FOLFOXIRI o niskiej intensywności (irynotekan 150 mg/m² d1; oksaliplatyna 60 mg/m² d1; leukoworyna 200 mg/m² d1, fluorouracyl 400 mg/m² bolus i 600 mg/m² w infuzji 22 h d1–2; całość powtarzana co 2 tygodnie) nie wykazano jego przewagi w porównaniu ze schematem FOLFIRI [40].

Przeciwnie, w przeprowadzonym niemal równocześnie przez włoską grupę badawczą GONO badaniu III fazy dowiedziono skuteczności bardziej agresywnej (klasycznej) wersji schematu FOLFOXIRI (irynotekan 165 mg/m² d1; oksaliplatyna 85 mg/m² d1; leukoworyna 200 mg/m² d1, fluorouracyl 3,200 mg/m² w infuzji 48 h od d1; całość powtarzana co 2 tygodnie) w porównaniu ze standardowym FOLFIRI, u chorych na CRC z nieresekcyjnymi, niezależnie od stanu genów *RAS* i *BRAF*. W grupie eksperymentalnej wystąpiło istotnie więcej epizodów neurotoksyczności i neutropenii w stopniu nasilenia G3–4 według CTCAE (choć częstość gorączki neutropenicznej była < 10% i nie różniła się istotnie między ramionami). Istotnie lepsze były: ORR (66% vs. 31%; $p = 0,0002$); PFS (mediana – 9,8 vs. 6,9 miesiąca, $p = 0,0006$) i OS (mediana – 22,6 vs. 16,7 miesiąca, $p = 0,032$) [41]. Ta właśnie wersja schematu jest dotychczas najlepiej zbadana.

W jednoramiennym badaniu II fazy oceniającym klasyczny schemat FOLFOXIRI w połączeniu z bewacyzumabem (BEV) w populacji chorych na mCRC wykazano aktywność takiego skojarzenia niezależnie od stanu genu *BRAF* [42]. Autorzy tego badania przeprowadzili następnie badanie II fazy oceniające odpowiedź na ten schemat chemioterapii wyłącznie w populacji chorych z mutacją *BRAF*. Łączna analiza obu badań wykazała następujące parametry skuteczności schematu FOLFOXIRI u pacjentów ($n = 25$) z mutacją *BRAF V600E*: ORR 72%; DCR 88%; mediana PFS i OS odpowiednio: 11,8 miesiąca oraz 24,1 miesiąca [43]. Choć porównanie takie wiąże się z oczywistymi ograniczeniami, to zestawienie wyników tej analizy z przytaczanymi wcześniej parametrami przeżycia chorych na raka jelita grubego z mutacją *BRAF V600E* leczonych w innych badaniach toczących się w podobnym okresie (mediana PFS rzędu 7 miesięcy i mediana OS rzędu 12 miesięcy) wydaje się świadczyć o wyraźnej aktywności schematu FOLFOXIRI w tej subpopulacji.

Grupa GONO przeprowadziła także badanie III fazy (TRIBE) porównujące skuteczność FOLFOXIRI vs. FOLFIRI,

oba schematy z dodatkiem bewacyzumabu, u 508 wcześniej nieleczonych chorych na mCRC. Bewacyzumab podawano w dawce 5 mg/kg mc., schemat FOLFOXIRI – jak w poprzednich badaniach grupy, natomiast schemat FOLFIRI – w jego agresywniejszej postaci [irynotekan – 180 mg/m² d1; leukoworyna – 200 mg/m² d1; fluorouracyl – 400 mg/m² (bolus) i 2400 mg/m² (wlew 46 h)]. Po 12 cyklach wszyscy chorzy otrzymywali leczenie podtrzymujące fluorouracylem z bewacyzumabem. Chorzy w ramieniu aktywnym doświadczyli istotnie wyższej częstości neutropenii, biegunki i neurotoksyczności. Częstość występowania gorączki neutropenicznej utrzymywała się poniżej 10% i nie różniła się istotnie między ramionami. W badaniu wykazano istotną przewagę FOLFOXIRI + BEV w zakresie ORR 65% vs. 53% ($p = 0,013$); OS 29,8 vs. 25,8 miesiąca ($p = 0,03$); PFS 12,3 vs. 9,7 miesiąca ($p = 0,006$) w ogólnej populacji. W wieloczynnikowej analizie podgrup nie wykazano istotnych różnic pomiędzy badanymi schematami u chorych z mutacją *RAS* czy *BRAF*, z trendem w kierunku wyższej aktywności schematu 4-lekowego w populacji z mutacją *BRAF* [44].

Niestety, dotychczas nie przeprowadzono prospektywnego badania klinicznego porównującego FOLFOXIRI z tym samym schematem w skojarzeniu z bewacyzumabem. Najlepszym dostępnym opracowaniem eksplorującym ten temat jest zbiorcza analiza badań grupy GONO, wykazująca korzyść z dodania bewacyzumabu, zarówno w analizie jedno-, jak i wieloczynnikowej, w postaci lepszego OS 29,8 vs. 23,6 miesiąca ($p = 0,014$) oraz PFS 12,3 vs. 10,0 miesiąca ($p = 0,013$), jednak nie w zakresie ORR 65,1% vs. 55,7% ($p = 0,280$) [45].

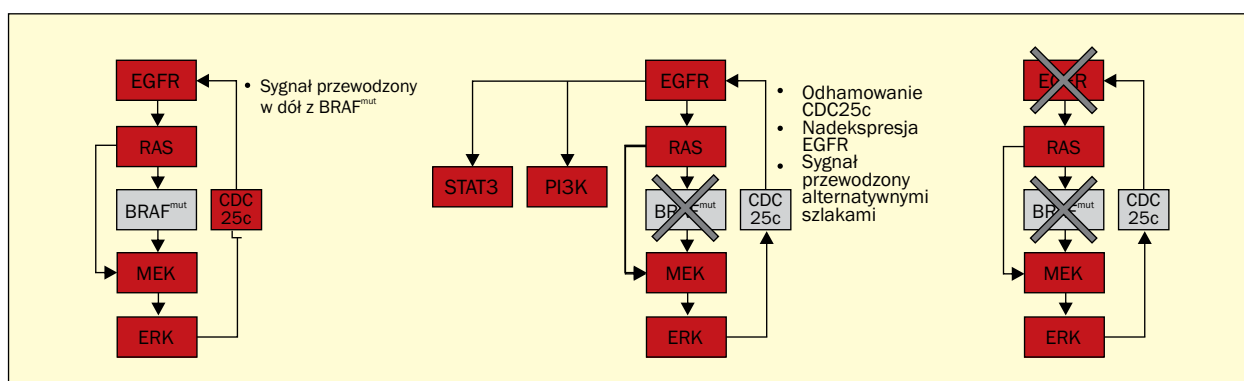
Całościowo kombinacja FOLFOXIRI + bewacyzumab wydaje się aktywnym schematem u chorych na mCRC z mutacją *BRAF* (tab. 4), przy czym należy pamiętać, że do wszystkich badań nad tym schematem rekrutowano jedynie chorych stosunkowo młodych i w dobrym stanie sprawności. Choć brakuje potwierdzenia tych obserwacji w prospektywnych badaniach, schemat FOLFOXIRI + bewacyzumab jest wymieniany jako opcja terapeutyczna u chorych na mCRC z mutacją *BRAF* w międzynarodowych wytycznych, a wielu ekspertów uważa go za standard postępowania w mCRC o tym profilu molekularnym.

Istotnym z punktu widzenia praktyka zagadnieniem jest wybór terapii drugiej linii po progresji na schemacie FOLFOXIRI ± BEV. Oczywistym wyborem może być tutaj powrót do schematu pierwszoliniowego. Strategia ta jednak, mimo że jest szeroko stosowana, wydaje się uzasadniona ze względu na wystąpienie długiego interwału do progresji, co w przypadku mCRC z mutacją *BRAF* jest raczej wyjątkiem niż regułą. Z tego powodu są opracowywane nowe strategie skojarzonego leczenia systemowego, oparte na zastosowaniu leczenia ukierunkowanego na kluczowy mechanizm molekularny – aktywowany zmutowaną kinazą *BRAF* szlak MAPK.

Tabela 4. Porównanie parametrów aktywności schematu FOLFOXIRI w badaniach grupy GONO

Nazwa badania Interwencja vs. komparator	Odsetek odpowiedzi		Mediana PFS (miesiące)		Mediana OS (miesiące)	
	Interwencja	Komparator	Interwencja	Komparator	Interwencja	Komparator
GONO Falcone i wsp. [41] (n = 244)	66%	41%	9,8	6,9	22,6	16,7
	(p = 0,0002)		(p = 0,0006)		(p = 0,032)	
FOLFOXIRI vs. FOLFIRI						
TRIBE (n = 508) [44]	65%	53%	12,3	9,7	29,8	25,8
FOLFOXIRI + bewacyzumab vs. FOLFIRI + bewacyzumab	(p = 0,013)		(p = 0,006)		(p = 0,03)	
GONO Loupakis i wsp. [43] BRAFmut (n = 25)	72%	ND	11,8	ND	24,1	ND
II faza analiza zbiorcza	ND		ND		ND	
FOLFOXIRI + bewacyzumab						
TRIBE BRAFmut (n = 28) [44]	56%	42%	7,5	5,5	19,0	10,7
FOLFOXIRI + bewacyzumab vs. FOLFIRI + bewacyzumab	ND		ND		ND	

PFS (progression-free survival) – czas wolny od progresji; OS (overall survival) – całkowity czas przeżycia

**Rycina 2.** Oporność na blokadę BRAF przez zwrotną aktywację sygnalizacji z EGFR

Strategie blokowania BRAF w mCRC

Od momentu odkrycia roli BRAF jako czynnika napędzającego wzrost nowotworów badano liczne inhibitory tej kinazy. Dwa obecnie dopuszczone do obrotu leki to wemurafenib (Zelboraf, Roche) i dabrafenib (Tafinlar, Novartis) – oba zostały zarejestrowane w leczeniu zaawansowanego czerniaka z mutacją *BRAF V600*. Rozwijane są również kolejne inhibitory BRAF: LGX818 (enkorafenib; Novartis), CEP-32496 (Ambit Biosciences Corporation), XL281 (Exelixis), HM95573 (Hanmi), ASN003 (BRAF + PI3K, Asana Biosciences), LXH254 (pan-RAF, Novartis). Z uwagi na bardzo wysoką aktywność inhibitorów BRAF w terapii czerniaka zainicjowano liczne badania oceniające skuteczność tych leków w terapii innych nowotworów z takim samym zaburzeniem molekularnym. W 2015 roku Kopetz i wsp. zaprezentowali dane z badania II fazy nad monoterapią anty BRAF

u wcześniej leczonych chorych na mCRC z mutacją *V600E* [46]. Aktywność tej strategii okazała się mało zachęcająca, z ORR na poziomie 5% i medianą PFS wynoszącą 2,1 miesiąca. Ze względu na to, że podobne badania publikowane przez innych autorów przynosiły podobne rezultaty [47, 48] skupiono się na poszukiwaniu mechanizmów oporności.

Zauważono, że blokada BRAF skutkuje reaktywacją szlaku MAPK w mechanizmie zależnym od EGFR (ryc. 2) [49, 50] oraz że blokada tego ostatniego może potencjalnie tę oporność przełamywać.

Kilka badań eksplorowało skojarzenie inhibitora BRAF z blokadą EGFR, wykazując obiecującą aktywność [51, 52]. Kolejne badania eksplorowały dodanie inhibitora MEK, inhibitora PI3K lub leku cytotoksycznego do podwójnej blokady. W badaniu II fazy SWOG 1406 obejmującym wcześniej leczonych chorych na mCRC z mutacją *BRAF V600* oceniano korzyść z dodania inhibitora BRAF do skojarzenia cetuksy-

Tabela 5. Toczące się badania kliniczne w BRAFmut mCRC, bez opublikowanych wyników

Badane terapie	Faza	Numer NIH
Enkorafenib (antagonista BRAF) + binimetynib (antagonista MEK)	I/II	NCT01543698
Enkorafenib + cetuksymab ± binimetynib	III	NCT02928224
Wemurafenib + cetuksymab + irinotekan	I	NCT01787500
Dabrafenib, trametynib, panitumumab – różne kombinacje	II	NCT01750918
Wemurafenib + cetuksymab + 5-fluorouracyl	II	NCT02291289
Daktolisib (antagonista PI3K) + binimetynib	I	NCT01337765
Buparlisib (antagonista PI3K) + binimetynib	I	NCT01363232
LGK974 (antagonista beta-kateniny) ± PDR001 (przeciwciało anti-PD-1)	I	NCT01351103
Irynotekan + AZD1775 (antagonista Wee1)	I	NCT02906059

mabu z irynotekaniem. W populacji 106 zrandomizowanych chorych wykazano znamienne zmniejszenie względnego ryzyka progresji o 58% (HR = 0,42 95% CI 0,26–0,66) przy medianach PFS wynoszących 4,4 miesiąca (IRI + CET + WEM) vs. 2,0 miesiąca (IRI + CET). Odsetek objektywnych odpowiedzi w ramieniu eksperymentalnym wzrastał z 4% do 16%, a kontroli choroby z 22% do 67%. Działania niepożądane w stopniu nasilenia G3/4 według CTCAE występowały częściej w ramieniu eksperymentalnym – neutropenia (28% vs. 7%), niedokrwistość (13% vs. 0%) oraz nudności (15% vs. 0%) [53–55]. Wraz z gromadzeniem danych na temat wielopoziomowej interakcji BRAF z równoległymi ścieżkami sygnałowymi nowe badania kliniczne eksplorują skojarzenie inhibicji BRAF z innymi lekami (tab. 5).

Podsumowanie

Mutacja *BRAF V600E* jest niezależnym negatywnym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego, chociaż obecność innych zaburzeń, a w szczególności MSI, wydaje się modulować ten mechanizm. Negatywny efekt tego zaburzenia utrzymuje się zarówno w chorobie miejscowo zaawansowanej, jak i przerzutowej. Wydaje się on wynikać przede wszystkim z agresywnej dynamiki choroby i gwałtownie postępują-

cych nawrotów po leczeniu pierwszej linii, a raczej nie jest wynikiem oporności na leczenie cytotoksyczne. Niedawno opisane, rzadziej występujące mutacje *BRAF* (poza kodonem V600), nie wiążą się z pogorszeniem rokowania.

Wartość predykcyjna mutacji *BRAF V600E* jest przedmiotem kontrowersji. Mutacja może się wiązać z opornością na leczenie inhibitorami EGFR, jednak dane na ten temat nie są zgodne, co sugeruje potencjalnie istnienie heterogenności w tym zakresie. Intensyfikacja chemioterapii pierwszej linii do schematu FOLFOXIRI + BEV wydaje się skuteczną strategią terapeutyczną u chorych z mutacją *BRAF V600E*, jednak dowody na to nie pochodzą z badań prospektywnych. Zidentyfikowane znaczenia mutacji *BRAF* w biologii nowotworów, w tym raka jelita grubego, pozwoliły na zaprojektowanie terapii ukierunkowanych molekularnie o charakterze przyczynowym – znoszących negatywny efekt nadmiernej aktywności kinazy BRAF i szlaku MAPK.

Konflikt interesów

Paweł Potocki otrzymywał honoraria i granty podrózne od firm Amgen, Merck, Roche.

Piotr Wysocki otrzymywał honoraria i granty podrózne od firm Roche, Merck, Amgen, Novartis.

Abstract

The *BRAF V600E* mutation playing an important role in treatment of metastatic melanoma has been recently intensively studied in patients suffering from metastatic colorectal cancer. Occurring in approximately 10% of cases it has been proven to be a negative prognostic factor. Newer studies point to a complex link between this effect and status of mechanisms responsible for mismatch DNA repair. Although the predictive effect of *BRAF V600E* mutation in regard to cytotoxic chemotherapy and targeted therapies remains a subject of controversy, a need for an individualized approach to systemic treatment of this subpopulation is pointed by guidelines international scientific societies. Numerous therapeutic options are being investigated: from intensification of first-line cytotoxic chemotherapy to innovative targeted combinations aimed at negating the activating effect of *BRAF V600E* mutation on signal transducing pathways pivotal for carcinogenesis. The following review aims to familiarize oncologists involved in treatment of gastrointestinal cancers with this complex subject.

Key words: colorectal cancer, BRAF, V600E, FOLFOXIRI

Piśmiennictwo

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136(5): E359–E386, doi: 10.1002/ijc.29210, indexed in Pubmed: 25220842.
2. Didkowska J, Wojciechowska U, Olasek P. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2015 roku Cancer in Poland in 2015. *Cancer*, 2017. [Online]. Available: <http://onkologia.org.pl/raporty/>. [Accessed: 02-Jan. 2018].
3. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, et al. FOCUS Trial Investigators, National Cancer Research Institute Colorectal Clinical Studies Group. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007; 370(9582): 143–152, doi: 10.1016/S0140-6736(07)61087-3, indexed in Pubmed: 17630037.
4. Stintzing S, Modest D, Rossius L, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2016; 17(10): 1426–1434, doi: 10.1016/s1470-2045(16)30269-8.
5. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892): 949–954, doi: 10.1038/nature00766, indexed in Pubmed: 12068308.
6. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6: 479–507, doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130235, indexed in Pubmed: 21090969.
7. Rad R, Cadiñanos J, Rad L, et al. A genetic progression model of Braf(V600E)-induced intestinal tumorigenesis reveals targets for therapeutic intervention. *Cancer Cell*. 2013; 24(1): 15–29, doi: 10.1016/j.ccr.2013.05.014, indexed in Pubmed: 23845441.
8. Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, et al. Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer*. 2011; 2(3): 232–260, doi: 10.1177/1947601911407323, indexed in Pubmed: 21779496.
9. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, et al. Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial. *Lancet Oncol*. 2013; 14(8): 749–759, doi: 10.1016/S1470-2045(13)70163-3, indexed in Pubmed: 23725851.
10. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(20): 5322–5330, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0332, indexed in Pubmed: 25139339.
11. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol*. 2016; 27(9): 1746–1753, doi: 10.1093/annonc/mdw261, indexed in Pubmed: 27358379.
12. Cremolini C, Di Bartolomeo M, Amatu A, et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann Oncol*. 2015; 26(10): 2092–2097, doi: 10.1093/annonc/mdv290, indexed in Pubmed: 26153495.
13. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, et al. BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2017; 35(23): 2624–2630, doi: 10.1200/JCO.2016.71.4394, indexed in Pubmed: 28486044.
14. Clancy C, Burke JP, Kalady MF, et al. BRAF mutation is associated with distinct clinicopathological characteristics in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2013; 15(12): e711–e718, doi: 10.1111/codi.12427, indexed in Pubmed: 24112392.
15. Fariña-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Moerland E, et al. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients. *Ann Oncol*. 2010; 21(12): 2396–2402, doi: 10.1093/annonc/mdq258, indexed in Pubmed: 20501503.
16. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol*. 2010; 28(3): 466–474, doi: 10.1200/JCO.2009.23.3452, indexed in Pubmed: 20008640.
17. Kadowaki S, Kakuta M, Takahashi S, et al. Prognostic value of KRAS and BRAF mutations in curatively resected colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(4): 1275–1283, doi: 10.3748/wjg.v21.i4.1275, indexed in Pubmed: 25632202.
18. Seligmann JF, Fisher D, Smith CG, et al. Investigating the poor outcomes of BRAF -mutant advanced colorectal cancer: Analysis from 2530 patients in randomised clinical trials. *Annals of Oncology*. 2016; mdw645, doi: 10.1093/annonc/mdw645.
19. Yaeger R, Cercek A, Chou JF, et al. BRAF mutation predicts for poor outcomes after metastasectomy in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2014; 120(15): 2316–2324, doi: 10.1002/cncr.28729, indexed in Pubmed: 24737664.
20. Renaud S, Romain B, Falcoz PE, et al. KRAS and BRAF mutations are prognostic biomarkers in patients undergoing lung metastasectomy of colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015; 112(4): 720–728, doi: 10.1038/bjc.2014.499, indexed in Pubmed: 25688918.
21. Schirripa M, Bergamo F, Cremolini C, et al. BRAF and RAS mutations as prognostic factors in metastatic colorectal cancer patients undergoing liver resection. *Br J Cancer*. 2015; 112(12): 1921–1928, doi: 10.1038/bjc.2015.142, indexed in Pubmed: 25942399.
22. Mori Y, Nagasaka T, Tanioka H, et al. P-346Ovarian metastasectomy in colorectal cancer may improve the clinical outcomes of patients with metastatic colorectal cancer regardless of BRAF or KRAS mutational profiles. *Annals of Oncology*. 2017; 28(suppl_3), doi: 10.1093/annonc/mdx261.342.
23. Johnson B, Jin Z, Truty M, et al. Impact of Metastasectomy in the Multimodality Approach for BRAFV600E Metastatic Colorectal Cancer: The Mayo Clinic Experience. *The Oncologist*. 2017; 23(1): 128–134, doi: 10.1634/theoncologist.2017-0230.
24. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015; 21(11): 1350–1356, doi: 10.1038/nm.3967, indexed in Pubmed: 26457759.
25. Lochhead P, Kuchiba A, Imamura Yu, et al. Microsatellite instability and BRAF mutation testing in colorectal cancer prognostication. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(15): 1151–1156, doi: 10.1093/jnci/djt173, indexed in Pubmed: 23878352.
26. Seppälä TT, Böhm JP, Friman M, et al. Combination of microsatellite instability and BRAF mutation status for subtyping colorectal cancer. *Br*

- J Cancer. 2015; 112(12): 1966–1975, doi: 10.1038/bjc.2015.160, indexed in Pubmed: 25973534.
27. Nakaji Yu, Oki E, Nakanishi R, et al. Prognostic value of BRAF V600E mutation and microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2017; 143(1): 151–160, doi: 10.1007/s00432-016-2275-4, indexed in Pubmed: 27672042.
 28. Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, et al. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017; 109(5), doi: 10.1093/jnci/djw272, indexed in Pubmed: 28040692.
 29. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, et al. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet.* 2012; 49(3): 151–157, doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100714, indexed in Pubmed: 22368298.
 30. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res.* 2005; 65(14): 6063–6069, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0404, indexed in Pubmed: 16024606.
 31. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015; 148(1): 77–87.e2, doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.038, indexed in Pubmed: 25280443.
 32. Morris V, Overman MJ, Jiang ZQ, et al. Progression-free survival remains poor over sequential lines of systemic therapy in patients with BRAF-mutated colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2014; 13(3): 164–171, doi: 10.1016/j.clcc.2014.06.001, indexed in Pubmed: 25069797.
 33. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(35): 5705–5712, doi: 10.1200/JCO.2008.18.0786, indexed in Pubmed: 19001320.
 34. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009; 101(4): 715–721, doi: 10.1038/sj.bjc.6605177, indexed in Pubmed: 19603018.
 35. Roock WDe, Claes B, Bernasconi D, 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. *The Lancet Oncology.* 2010; 11(8): 753–762, doi: 10.1016/s1470-2045(10)70130-3.
 36. Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, et al. NCIC Clinical Trials Group and the Australasian Gastro-Intestinal Trials Group. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer — results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(3): 744–753, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0606, indexed in Pubmed: 24218517.
 37. Tveit KM, Guren T, Glimelius B, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol.* 2012; 30(15): 1755–1762, doi: 10.1200/JCO.2011.38.0915, indexed in Pubmed: 22473155.
 38. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer.* 2012; 48(10): 1466–1475, doi: 10.1016/j.ejca.2012.02.057, indexed in Pubmed: 22446022.
 39. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, et al. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol.* 2004; 22(7): 1209–1214, doi: 10.1200/JCO.2004.11.037, indexed in Pubmed: 15051767.
 40. Souglakos J, Androulakis N, Syrigos K, et al. FOLFOXIRI (folinic acid, 5-fluorouracil, oxaliplatin and irinotecan) vs FOLFIRI (folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan) as first-line treatment in metastatic colorectal cancer (MCC): a multicentre randomised phase III trial from the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Br J Cancer.* 2006; 94(6): 798–805, doi: 10.1038/sj.bjc.6603011, indexed in Pubmed: 16508637.
 41. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Gruppo Oncologico Nord Ovest. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol.* 2007; 25(13): 1670–1676, doi: 10.1200/JCO.2006.09.0928, indexed in Pubmed: 17470860.
 42. Masi G, Loupakis F, Salvatore L, et al. Bevacizumab with FOLFOXIRI (irinotecan, oxaliplatin, fluorouracil, and folinate) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a phase 2 trial. *The Lancet Oncology.* 2010; 11(9): 845–852, doi: 10.1016/s1470-2045(10)70175-3.
 43. Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2014; 50(1): 57–63, doi: 10.1016/j.ejca.2013.08.024, indexed in Pubmed: 24138831.
 44. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol.* 2015; 16: 1306–1315P. doi:10.1016/S1470-2045(15)00122-9.
 45. Cremolini C, Loupakis F, Masi G, et al. FOLFOXIRI or FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: a propensity score-adjusted analysis from two randomized clinical trials. *Ann Oncol.* 2016; 27(5): 843–849, doi: 10.1093/annonc/mdw052, indexed in Pubmed: 26861604.
 46. Kopetz S, Desai J, Chan E, et al. Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-Mutated Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2015; 33(34): 4032–4038, doi: 10.1200/JCO.2015.63.2497, indexed in Pubmed: 26460303.
 47. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med.* 2015; 373(8): 726–736, doi: 10.1056/NEJMoa1502309, indexed in Pubmed: 26287849.
 48. Gomez-Roca CA, Delord J, Robert C, et al. Encorafenib (lgx818), an oral braf inhibitor, in patients (PTS) with BRAF V600E metastatic colorectal cancer (mCRC): results of dose expansion in an open-label, phase 1 study. *Ann Oncol.* 2014; 25(suppl_4): iv182–iv183, doi: 10.1093/annonc/mdu333.38.
 49. Prahallad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature.* 2012; 483(7387): 100–103, doi: 10.1038/nature10868, indexed in Pubmed: 22281684.
 50. Corcoran RB, Ebi H, Turke AB, et al. EGFR-mediated re-activation of MAPK signaling contributes to insensitivity of BRAF mutant colorectal cancers

- to RAF inhibition with vemurafenib. *Cancer Discov.* 2012; 2(3): 227–235, doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0341, indexed in Pubmed: 22448344.
51. Yaeger R, Cercek A, O'Reilly EM, et al. Pilot trial of combined BRAF and EGFR inhibition in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(6): 1313–1320, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2779, indexed in Pubmed: 25589621.
52. Desai J, Markman B, Ananda S, et al. A phase I/II trial of combined BRAF and EGFR inhibition in patients (pts) with BRAF V600E mutated (BRAFM) metastatic colorectal (mCRC): The EVICT (Erlotinib and Vemurafenib in Combination Trial) study. *J. Clin Oncol.* May 2017, vol. 35, no. 15_suppl, p. (suppl.3557): 3557P, doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_.
53. van Geel RM, Tabernero J, Elez E, et al. A Phase Ib Dose-Escalation Study of Encorafenib and Cetuximab with or without Alpelisib in Metastatic-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2017; 7(6): 610–619, doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0795, indexed in Pubmed: 28363909.
54. Corcoran RB, André T, Yoshino T, et al. Efficacy and circulating tumor DNA (ctDNA) analysis of the BRAF inhibitor dabrafenib (D), MEK inhibitor trametinib (T), and anti-EGFR antibody panitumumab (P) in patients (pts) with BRAF V600E-mutated (BRAFM) metastatic colorectal cancer (mCRC). *Annals of Oncology.* 2016; 27(suppl_6), doi: 10.1093/annonc/mdw370.04.
55. Kopetz S, McDonough S, Morris V, et al. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG 1406). *Journal of Clinical Oncology.* 2017; 35(4_suppl): 520–520, doi: 10.1200/jco.2017.35.4_suppl.520.