

Maciej Krzakowski¹, Beata Jagielska², Tomasz Kubiawski^{3, 4}, Barbara Radecka^{5, 6}, Maria Sasiadek⁷, Bartosz Wasąg^{8, 9}, Piotr Wysocki¹⁰

¹Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Narodowy Instytut Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie — Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

²Szpital Grochowski im. dr med. Rafała Maszta, Warszawa

³Klinika Onkologii i Immunoonkologii z Oddziałem Dziennym Terapii Onkologicznej, Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej MSWiA z Warmińsko-Mazurskim Centrum Onkologii w Olsztynie

⁴Klinika Onkologii i Chorób Piersi CMKP w Warszawie

⁵Klinika Onkologii, Instytut Nauk Medycznych, Uniwersytet Opolski w Opolu

⁶Opolskie Centrum Onkologii im. Prof. Tadeusza Koszarowskiego

⁷Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

⁸Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

⁹Laboratorium Genetyki Klinicznej, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku

¹⁰Katedra i Klinika Onkologii, Uniwersytet Jagielloński — *Collegium Medicum* w Krakowie

Leczenie chorych na zaawansowanego raka jelita grubego z mutacją w genie **BRAF^{V600E}**

Treatment of patients with *BRAF^{V600E}*-mutated advanced colorectal cancer

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. Maciej Krzakowski,
Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej,
Narodowy Instytut Onkologii
— Państwowy Instytut Badawczy
w Warszawie
ul. Wilhelma Konrada Roentgena 5
02-781 Warszawa
e-mail: maciej.krzakowski@pib-nio.pl

STRESZCZENIE

Postęp w zakresie rokowania chorych na raka jelita grubego jest między innymi związany z wprowadzaniem nowych metod systemowego leczenia ukierunkowanego molekularnie. Przykładem jest leczenie ukierunkowane chorych z mutacją *BRAF^{V600E}*. Obecne stanowisko ekspertów zostało przygotowane w celu przedstawienia uwarunkowań genetycznych i diagnostycznych oraz możliwych do wykorzystania metod leczenia chorych na zaawansowanego raka jelita grubego z mutacją w genie *BRAF^{V600E}*.

Słowa kluczowe: rak jelita grubego, zaawansowane stadium choroby, mutacja w genie *BRAF*, leczenie systemowe

ABSTRACT

An improvement in the prognosis of patients with colorectal cancer is related — among other factors — to the introduction of new methods of systemic therapies addressing molecular targets. Targeted treatment aimed at *BRAF^{V600E}* mutation is an example. The statement was prepared with the aim to present genetic determinants as well as available diagnostic and therapeutic methods in patients with *BRAF*-mutated advanced colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer, advanced stage of disease, *BRAF* mutation, systemic therapy

Copyright © 2021 Via Medica

ISSN 2450-1646

e-ISSN 2450-6567

Onkol Prakt Klin Edu 2021; 7, 6: 347–360

Wprowadzenie

Rak jelita grubego (RJG) jest trzecim najczęściej występującym nowotworem u mężczyzn i drugim u kobiet (odpowiednio 11% i 9,5% wszystkich nowotworów). W Polsce rocznie rozpoznaje się około 18 000 nowych zachorowań na raka jelita grubego. Zachorowalność i umieralność w Polsce wzrasta.

W etiologii RJG są uwzględniane przyczyny niemodyfikowalne i związane z szeroko rozumianym środowiskiem. W grupie czynników niemodyfikalnych

istotne znaczenie mają wiek oraz zespoły genetycznie uwarunkowane. Około 75% przypadków RJG ma charakter spontaniczny.

Rokowanie chorych na RJG jest nadal niezadowolające, niezależnie od niewątpliwego postępu w zakresie możliwości profilaktyki i diagnostyki. Wskaźnik przeżyć 5-letnich nie przekracza w Polsce 50%. Wspomniana sytuacja uzasadnia poszukiwanie nowych metod leczenia chorych, które obejmują — między innymi — stosowanie leków ukierunkowanych molekularnie.

Mutacja aktywująca w genie *BRAF* występuje u około 10% chorych na RJG — jest częściej obserwowana u kobiet i osób w starszym wieku oraz jest związana z mniejszym zróżnicowaniem histologicznym i większym zaawansowaniem w chwili rozpoznania. Mutacje w genie *BRAF* częściej są stwierdzane w rakach położonych po prawej stronie jelita grubego. Najważniejszą okolicznością jest gorsze rokowanie chorych z mutacją w genie *BRAF*. W ostatnim czasie doszło do istotnej ewolucji w zakresie możliwości leczenia chorych z omawianym zaburzeniem genetycznym.

Obecne opracowanie zawiera stanowisko w zakresie możliwości optymalnego postępowania diagnostyczno-terapeutycznego u chorych na zaawansowanego RJG z mutacją w genie *BRAF*.

Genetyczne podłoże raka jelita grubego ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia mutacji w genie *BRAF*

Podczas oceny znaczenia klinicznego zmian genetycznych w nowotworach należy wyróżnić zmiany genetyczne w komórkach nowotworowych, które determinują przebieg transformacji nowotworowej i przebieg kliniczny choroby (w tym odpowiedź na leczenie) oraz model występowania choroby (sporadyczny, rodzinny lub dziedziczny). Niezależnie od modelu rozwoju, komórki nowotworowe mają własny genom, charakteryzujący się specyficznymi cechami odmiennymi od genomu konstytucjonalnego chorego.

Około 5% raków jelita grubego (RJG) rozwija się na podłożu predyspozycji dziedzicznej autosomalnie, dominująco (rzadziej — autosomalnie recesywnie), determinującej zwiększone ryzyko zachorowania na RJG i uwarunkowanej germinálną mutacją w genach supresorowych lub genach mutatorowych [1, 2]. Do tych zespołów zalicza się:

- rodzinną polipowatość gruczolakowatą — uwarunkowaną mutacjami genu *APC*, dziedziczną autosomalnie, dominująco (forma klasyczna zespołu oraz formy łagodne, znane jako zespoły Turcota i Gardnera);
- dziedziczny autosomalnie i recesywnie zespół polipowatości związanej z mutacjami genu *MUTYH* (*MAP*, *MUTYH adenomatous polyposis*), który jest genem naprawy DNA kodującym białko kluczowe w procesie naprawy DNA przez usuwanie pojedynczych zasad (*BER*, *base excision repair*);
- dziedziczne autosomalnie, dominująco zespoły RJG rozwijające się na podłożu polipowatości hamartomatycznej — zespół Peutza-Jeghersa (uwarunkowany mutacjami genu *STK11*), zespół Cowden (mutacje genu *PTEN*), zespół dziedzicznej mieszanej polipowatości (mutacje genu *CRAC1*) i młodzieńcza

polipowatość jelita grubego (rozwijająca się na podłożu mutacji genów *BMPRIA* i *SMAD4*).

Spośród zespołów dziedzicznej i autosomalnie dominującej predyspozycji do RJG, jedynie w zespole Lyncha (HNPCC, *hereditary non-polyposis colorectal cancer*) nowotwór rozwija się w jelicie bez polipowatości. Nowotwór jest uwarunkowany mutacjami genów mutatorowych (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* oraz *EPCAM*, kodujących białka naprawy DNA przez usuwanie źle sparowanych zasad) [3].

Około 15% przypadków zachorowań na RJG występuje rodzinie i jest dziedziczone wieloczynnikowo (współdziałanie czynników środowiskowych, potencjalnie rakotwórczych oraz genetycznych, które zwiększają wrażliwość osobniczą), a pozostałe około 75% stanowi chorobę sporadyczną [4]. Chorzy na RJG — klasyfikowanym jako nowotwór sporadyczny — nie mają żadnych obciążeń rodzinnych w tym kierunku, choć zachorowanie na RJG oznacza dla krewnych pierwszego stopnia zwiększenie ryzyka zachorowania o około 2% powyżej ryzyka populacyjnego.

Etiologia genetyczna raka jelita grubego

Etiologia genetyczna RJG jest wysoce heterogenna. Analiza zmian genetycznych w komórkach RJG pozwoliła na wyodrębnienie trzech głównych ścieżek transformacji nowotworowej, które obejmują:

1. Zmiany charakteryzujące się niestabilnością chromosomową (CIN, *chromosomal instability*), obserwowaną w około 85% RJG; Kluczowym zdarzeniem molekularnym w wymienionych wyżej zmianach są mutacje genu supresorowego *APC*, które współpracują z mutacjami genów *KRAS*, *PI3KCA*, *SMAD4* i *TP53*. Utrata stabilności chromosomowej prowadzi do kumulacji w komórkach nowotworowych aberracji chromosomowych (często mikroaberracji), które mogą prowadzić do zmiany ekspresji genów leżących w miejscach złamań chromosomów, amplifikacji i delecji fragmentów genomu. Zjawisko utraty heterozygotyczności (LOH, *loss of heterozygosity*) ma kluczowe znaczenie dla transformacji nowotworowej (nadekspresja onkogenów lub utrata funkcji genów supresorowych).
2. Zmiany charakteryzujące się niestabilnością mikrosatelitarną (MSI, *microsatellite instability*); Niestabilność mikrosatelitarna jest konsekwencją utraty funkcji genów mutatorowych i cechą charakterystyczną HNPCC, ale obecna jest też w około 15% sporadycznych raków jelita grubego. Zjawisko MSI polega na somatycznym i wysoce zmiennym zwielokrotnieniu (rzadziej zmniejszeniu) liczby powtórzeń krótkich sekwencji złożonych z kilku nukleotydów (mikrosatelity). Zjawisko to, jeśli wystąpi w regionie regulatorowym, prowadzi do zmiany ekspresji genów, często o kluczo-

wym znaczeniu w transformacji nowotworowej (geny supresorowe, mutatorowe lub onkogeny).

3. Zmiany charakteryzujące się niestabilnością metylacyjną (CIMP, *CpG island methylator phenotype*); Metylacja wysp CpG jest powszechnym mechanizmem epigenetycznej regulacji ekspresji genów, odgrywającym kluczową rolę w różnicowaniu biologicznych funkcji komórek organizmu. Komórki nowotworowe charakteryzują się szczególnym wzorem metylacji — hipermetylacji (inaktywacji) ulegają wybiórczo regiony promotorowe genów supresorowych i mutatorowych, podczas gdy obniżeniu ulega poziom globalnej metylacji w komórce, co prowadzi do aktywacji protoonkogenów i zmniejszenia stabilności chromosomowej komórek. Dla nowotworów o wysokiej CIMP charakterystyczna jest obecność mutacji genu *BRAF* i nieobecność mutacji genów *TP53*.

Klasyfikacja molekularna raka jelita grubego

Rak jelita grubego jest pojęciem obejmującym nowotwory o zróżnicowanej etiologii genetycznej oraz odmiennych cechach biologicznych determinujących przebieg kliniczny choroby i odpowiedź na leczenie. Zmienność przebiegu klinicznego choroby oraz odmiennosc odpowiedzi na stosowane leczenie są niewątpliwie wynikiem heterogenności genetycznej. Międzynarodowe Konsorcjum do spraw Klasyfikacji Raka Jelita Grubego (*Colorectal Cancer Subtyping Consortium*) w 2015 roku opracowało holistyczną klasyfikację molekularną RJG, opartą na specyficznym wzorze ekspresji genów (*Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer*), dzielącą RJG na 4 podgrupy o określonej charakterystyce klinicznej:

1. CMS1 (*Consensus Molecular Subtype I*); Występuje u około 14% chorych z RJG i charakteryzuje się wysoką częstością mutacji, MSI, CIMP oraz wysoką immunogennością. Cechuje się obecnością mutacji genów *BRAF* i *TGFBR2* oraz niską liczbą somatycznych zmian liczby kopii (SCNA, *somatic copy number aberration*). Występuje głównie u osób starszych i kobiet oraz charakteryzuje się późnym początkiem, lokalizacją w proksymalnym odcinku jelita grubego, wysokim stopniem złośliwości i gorszym rokowaniem.
2. CMS2 (*Canonical*); Występuje u około 37% chorych z RJG, charakteryzuje się niestabilnością chromosomową oraz aktywacją ścieżek sygnałowych WNT i MYC, mutacjami genów *APC* i *TP53*. Zmiany najczęściej zlokalizowane są w dystalnym odcinku jelita i mają lepsze rokowanie.
3. CMS3 (*Metabolic*); Występuje u około 13% chorych z RJG, charakteryzuje się dysregulacją metaboliczną, stabilnością mikrosatelitarną i metylacyjną, umiarkowaną CIN oraz mutacjami genów *APC* i *RAS*.

4. CMS4 (*Mesenchymal*);

Występuje u około 23% chorych z RJG, charakteryzuje się dominującą aktywacją genu kodującego transformujący czynnik wzrostu (*TGFβ*, *transforming growth factor β*), naciekaniem podścieliska i naczyńogenezą, stabilnością mikrosatelitarną i metylacyjną, wysoką liczbą somatycznych zmian liczby kopii (SCNA). Nowotwory są zwykle bardziej zaawansowane klinicznie, a rokowanie chorych jest gorsze.

Guzy o mieszanej charakterystyce występują u około 13% chorych z rozpoznaniem RJG i stanowią prawdopodobnie typ przejściowy między powyższymi grupami [5, 6].

Znaczenie mutacji genu *BRAF* w raku jelita grubego

Heterogenność genetyczna w RJG jest niewątpliwie jedną z głównych przyczyn niepowodzeń leczenia. Poprawienie rokowania może być związane z postępowaniem personalizowanym w oparciu o znajomość zmian molekularnych oraz prowadzącym do hamowania proliferacji, migracji komórek i angiogenezy.

Głównym celem leczenia ukierunkowanego w RJG jest szlak rozpoczynający się od genu *EGFR* aktywującego z kolei ścieżkę genów położonych poniżej i biorących udział w inicjacji i progresji transformacji nowotworowej (*RAS-RAF-MAPK/MEK-ERK*) oraz ścieżkę *PI3K/PIP2/PIP3/AKT/mTOR*, biorącą udział głównie w regulacji proliferacji, migracji komórek, angiogenezy i apoptozy [7]. Do określenia rokowania i strategii terapeutycznej rekomendowana jest obecnie ocena mutacji genów rodziny *RAS* (pan-*RAS*), mutacji *BRAF* oraz ocena stabilności mikrosatelitarnej [8]. U około 30–50% chorych są obecne mutacje genów *RAS* [9, 10], a u około 10% występują mutacje genu *BRAF*. Wymienione zaburzenia najczęściej wykluczają się (w komórkach raka występują mutacje genów *RAS* lub *BRAF*) [11]. Najczęstszą mutacją *BRAF* jest, należący do klasy I mutacji *BRAF* (aktywujące kinazy), wariant V600E (obecny u około 90% zaawansowanych RJG z mutacją *BRAF*), a rzadziej stwierdza się mutacje w kodonach 464, 469, 597 lub 601 (klasa II mutacji *BRAF* — również aktywujące kinazy) i mutacje w kodonach 287, 459, 466, 467, 469, 581, 594, 595 i 596 (klasa III mutacji — nie wykazują aktywności kinazy, nie działają na ścieżce zależnej od *RAS* i pozostają zależne od ścieżki *ERK*) [7]. Mutacje *BRAF* — inne niż V600E (*BRAF non-V600E*) — występują u około 2% chorych na zaawansowane RJG z mutacją *BRAF* — obserwowany jest wówczas odmienny przebieg kliniczny choroby (chorzy młodszy i częściej mężczyźni, częściej nowotwory o mniejszym stopniu złośliwości i lewostronnej lokalizacji; mediana przeżycia jest wyższa niż chorych zarówno z mutacją *BRAFV600E*, jak i bez mutacji *BRAF*) [12].

Odmienność molekularna i kliniczna RJG z mutacjami genu *BRAF* jest podstawą do wyodrębnienia typu CMS1. Oprócz omówionych powyżej charakterystycznych cech klinicznych typ CMS1 charakteryzuje się specyficznym przebiegiem procesu przerzutowania w porównaniu z nowotworami bez mutacji *BRAF* — najczęściej przerzuty są stwierdzane w otrzewnej lub odległych węzłach chłonnych i rzadziej w płucach [13]. Wspomniana lokalizacja przerzutów, utrudniająca zabieg ich usunięcia, jest jedną z przyczyn gorszego rokowania (mediana przeżycia — 10,4 wobec 34,7 miesiąca). Badania nad przebiegiem choroby u osób z przerzutami RJG charakteryzującymi się mutacją genu *BRAF* i odmienną stabilnością mikrosatelitarną (MSS/*BRAF* wobec MSI/*BRAF*) wykazały, że wariant *BRAFV600E* jest samodzielnym markerem molekularnym złego rokowania. U chorych na zaawansowanego RJG MSI jest negatywnym czynnikiem rokowniczym, zależnym od obecności mutacji *BRAF* [13].

Odmienność molekularna i kliniczna przerzutów RJG charakteryzujących się mutacjami genu *BRAF* sprawiła, że dla chorych została opracowana metoda celowanego leczenia i prowadzone są dalsze badania nad jej optymalizacją [11, 14]. Nawet najbardziej precyzyjnie dobrana terapia celowana, oparta na zmianach molekularnych w komórkach raka, ma ograniczoną w czasie skuteczność ze względu na niestabilność genetyczną nowotworów z powodu oporności na leczenie w związku z uzyskaniem przewagi proliferacyjnej przez odporne kłony komórkowe. Wspomniane zjawisko jest szczególnie nasilone u chorych z mutacjami *BRAF*, MSI i CIMP [14].

Diagnostyka molekularna chorych na raka jelita grubego — perspektywa diagnostyki

Materiał do badań

Badania molekularne u chorych z rozpoznaniem RJG wykonuje się głównie z wykorzystaniem DNA wyizolowanego z materiału tkankowego utrwalonego w formalinie i zatopionego w parafinie. Przed przystąpieniem do analiz molekularnych konieczne jest przeprowadzenie oceny patomorfologicznej w celu wybrania materiału odpowiedniego pod względem ilości i jakości oraz określenia zawartości komórek nowotworowych [15]. Wspomniany proces jest istotny, ponieważ materiał tkankowy zły jakościowo lub zawierający zbyt małą liczbę komórek nowotworowych może być przyczyną uzyskania niediagnostycznego lub nieprawdziwie ujemnego wyniku analizy molekularnej [16, 17]. Ocenę zawartości komórek nowotworowych w materiale tkankowym przeprowadza się z wykorzystaniem preparatu wybarwionego hematoksyliną i eozyną. Wymagana minimalna frakcja

komórek nowotworowych w porównaniu z komórkami prawidłowymi będzie zależał od metody genotypowania. Wykazano, że w przypadku metod o małej czułości (np. sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera) wykorzystanie materiału zawierającego mniej niż 30% komórek nowotworowych może prowadzić do uzyskania nieprawdziwie ujemnych wyników [18]. W materiale o małej zawartości komórek nowotworowych przed przystąpieniem do izolacji DNA i dalszych analiz molekularnych konieczne może być przeprowadzenie makro- lub mikrodysekcji [19].

Do identyfikacji wariantów somatycznych, charakterystycznych dla komórek nowotworowych, w genach *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* można wykorzystać krążące nowotworowe DNA (ctDNA, *circulating tumour DNA*) — uzyskanie rzetelnych wyników wymaga użycia odpowiednich próbek oraz bezwzględne przestrzeganie instrukcji dotyczącej pobierania, transportu i późniejszej preparatyki materiału [19].

U wybranych chorych z rozpoznaniem RJG wskazane może być przeprowadzenie badań mających na celu identyfikację wariantów germinalnych, obecnych we wszystkich komórkach chorego, w genach *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* oraz *PMS2* [19]. Do badań tych wykorzystuje się DNA wyizolowany z krwi żyłnej pobranej na podstawowy antykoagulant, czyli wersenian dwusodowy (EDTA, *ethylenediaminetetraacetic acid*).

Diagnostyka molekularna

Diagnostyka molekularna chorych na RJG powinna być prowadzona w medycznych laboratoriach diagnostycznych lub pracowniach molekularnych zakładów patomorfologii. Wymienione ośrodki powinny posiadać wykwalifikowany personel, udokumentowane doświadczenie w prowadzeniu analiz molekularnych oraz systematycznie uczestniczyć w zewnętrznych kontrolach jakości. Wykorzystywane testy diagnostyczne muszą charakteryzować się odpowiednią wydajnością (czułością i specyficznością diagnostyczną), powtarzalnością oraz odtwarzalnością. Wynik analizy genów *KRAS*, *NRAS* i *BRAF* powinien zostać przekazany do lekarza kierującego w ciągu maksymalnie 7 dni roboczych od momentu otrzymania próbki przez laboratorium.

Analiza genów *RAS*

Mutacje genów *KRAS* i *NRAS* pojawiają się na wczesnym etapie procesu nowotworzenia i prowadzą do konstytutywnej aktywacji szlaków zależnych od kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) i kinazy 3-fosfoinozydowej (PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*) [20]. Liczne badania wykazały, że mutacje genów *KRAS* i *NRAS* są identyfikowane odpowiednio u 40% i 4% chorych

na RJG, przy czym zdecydowana większość wariantów genetycznych jest wykrywana w kodonach G12, G13 i Q61 (95%) [21].

Rutynowa diagnostyka molekularna powinna pozwolić na wykrycie wariantów genetycznych zlokalizowanych w kodonach 12., 13., 59., 61., 117. i 146. oraz 12., 13., 59., 61. i 117. — odpowiednio — genów *KRAS* i *NRAS*. Powszechnie do analizy eksonów 2., 3., 4. tych genów stosuje się technikę reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR, *quantitative polymerase chain reaction*). Wykorzystywane jest również sekwencjonowanie kolejnej generacji (NGS, *next generation sequencing*) oraz coraz rzadziej sekwencjonowanie bezpośrednie metodą Sangera.

Analiza stanu genu *BRAF*

Warianty mutacji w genie *BRAF* wykrywa się u około 8–12% chorych z rozpoznaniem zaawansowanego RJG [22]. U ponad 90% chorych identyfikowana jest mutacja punktowa w kodonie V600 powodująca zamianę waliny na kwas glutaminowy (p.V600E) [22]. Wykrycie mutacji w genie *BRAF* może być pomocne nie tylko w podjęciu decyzji dotyczących sposobu leczenia, ale pozwala również na odróżnienie guzów sporadycznych od dziedzicznie uwarunkowanych. Badania wykazały, że mutacje w genie *BRAF* występują często w guzach sporadycznych, w których stwierdzono wysoką MSI (MSI-H) (63,5%), ale rzadko są wykrywane w tkance nowotworowej pochodzącej osób z zespołem Lyncha (1,4%) [23].

Analizy molekularne powinny umożliwić wykrycie przynajmniej wariantów zlokalizowanych w kodonie V600. Analogicznie do genów *KRAS* i *NRAS*, badania genu *BRAF* mogą być prowadzone przy użyciu techniki qPCR, NGS lub sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sangera.

Identyfikacja defektów systemu naprawy DNA (dMMR)

Coraz częściej u chorych na RJG wykonuje się badania mające na celu identyfikację zaburzeń systemu naprawy nieprawidłowo sparowanych nukleotydów DNA (dMMR, *mismatch repair deficient*) [19]. Zaburzenia o typie dMMR prowadzą do MSI i są diagnozowane u około 15% chorych [23]. Przeprowadzenie wymienionych badań umożliwia nie tylko rozpoznanie nowotworów dziedzicznych, ale może również wpływać na leczenie [19, 23].

Do wykrycia zaburzeń systemu MMR wykorzystuje się badanie MSI oparte na analizie markerów mikrosatelitarnych DNA lub wynikach badań immunohistochemicznych i molekularnych pozwalających na ocenę ekspresji oraz analizę sekwencji genów *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*.

Badanie MSI polega na analizie profili allelicznych markerów mikrosatelitarnych DNA w tkance nowotworowej. Do przeprowadzenia badania może być konieczne wykorzystanie tkanki prawidłowej (materiał referencyjny). Analizy są wykonywane z wykorzystaniem metody PCR lub NGS [19, 23].

Badania immunohistochemiczne pozwalają na ocenę ekspresji białek MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. W tkance nowotworu z aktywnym systemem naprawy nieprawidłowo sparowanych nukleotydów DNA obserwuje się ekspresję wszystkich wymienionych wyżej białek. Brak natomiast ekspresji jakiegokolwiek spośród wspomnianych białek może wskazywać obecność mutacji inaktywującej w genie kodującym określony produkt białkowy i upośledzenie aktywności systemu MMR [23].

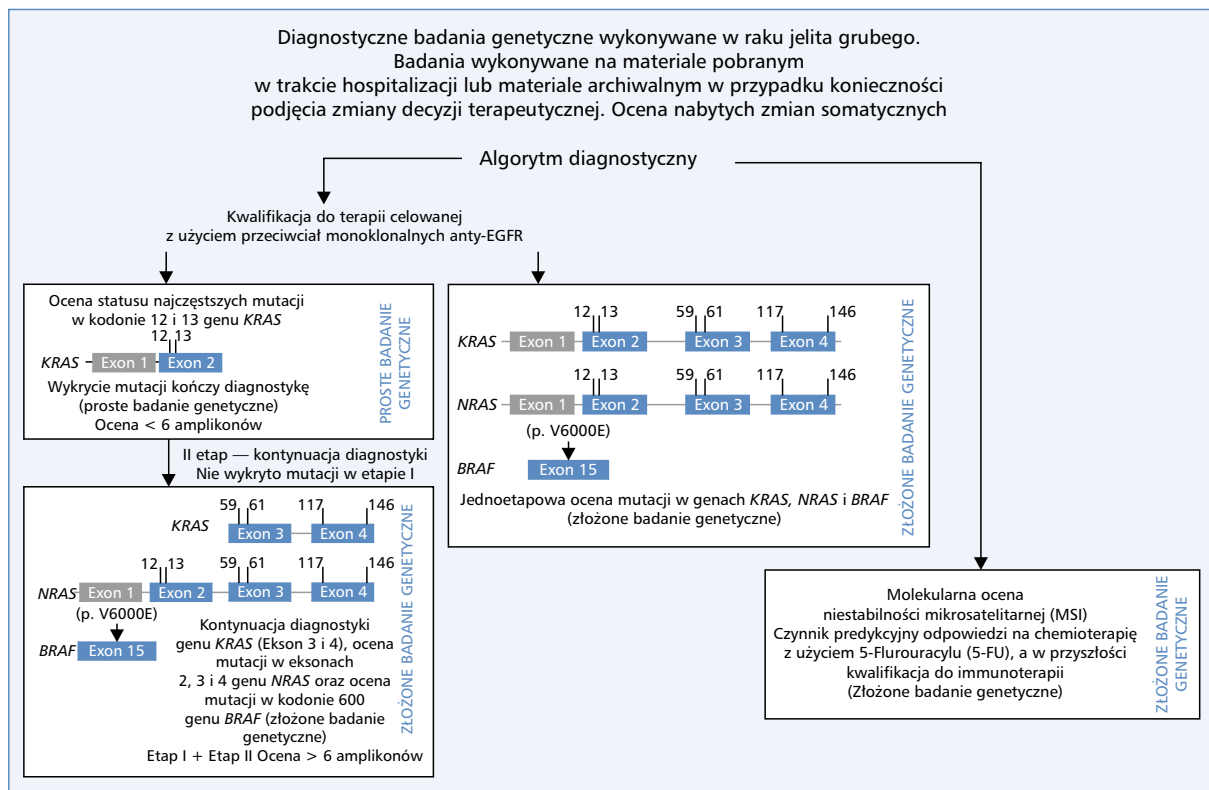
U chorych z podejrzeniem dziedzicznego RJG bez polipowatości (zespół Lyncha) możliwe jest wykonanie analizy sekwencji kodującej genów *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*. Badanie to przeprowadzone z wykorzystaniem krwi obwodowej oraz metody NGS pozwala na identyfikację patogennych wariantów germinalnych w obrębie wskazanych genów [23].

Diagnostyka molekularna chorych na raka jelita grubego — perspektywa onkologa

U większości chorych na RJG pierwszym etapem postępowania jest leczenie chirurgiczne. Kolejnym etapem jest systemowe leczenie uzupełniające. W przypadku nawrotu choroby — w zależności od sytuacji klinicznej — stosowane jest leczenie systemowe pierwszej linii. Leczenie uzupełniające nie stanowi „pierwszej linii leczenia” — wymienione określenie odnosi się do pierwszego zastosowania chemioterapii samodzielnej lub skojarzonej z lekami ukierunkowanymi w zaawansowanym stadium choroby. W przypadku dalszej progresji mówimy o leczeniu drugiej i kolejnej linii.

Istotnym elementem mającym wpływ na wskaźnik przeżyć całkowitych jest dostęp do leczenia w postaci zaawansowanych metod celowanych, który jest uwarunkowany między innymi dostępnością diagnostyki genetycznej. W zaawansowanym RJG stosuje się przeciwciała monoklonalne. Koniecznym warunkiem włączenia leków ukierunkowanych jest wykonanie badań oceniających stan genów *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*. W zależności od przyjętego przez laboratoria genetyczne schematu diagnostycznego badania mogą być rozliczane jako proste lub złożone. W pewnych sytuacjach klinicznych coraz większe znaczenie ma ocena MSI.

Strategia diagnostyczna jest zazwyczaj podejmowana przez diagnostę na podstawie obowiązujących standardów w laboratorium. Laboratorium oznaczające mutacje może wykonywać diagnostykę z uwzględnieniem dwóch



Rycina 1. Algorytm diagnostyczny wykonywanych badań genetycznych w nowotworach jelita grubego

wariantów merytorycznych i jednocześnie rozliczeniowych przeprowadzenia analizy molekularnej (ryc. 1).

W pierwszym wariancie ocenie podlega fragment genu *KRAS* (kodony 12. i 13.), w którym najczęściej występują mutacje. W sytuacji potwierdzenia obecności mutacji diagnostyka jest zakończona. Badanie powinno być rozliczone jako proste badanie genetyczne. Przy braku mutacji diagnostyka jest kontynuowana dalej i jest poszerzana o ocenę pozostałych fragmentów genów *KRAS*, *NRAS* i *BRAF*. W tym wypadku badanie jest rozliczane jako złożone badanie genetyczne.

Drugi wariant wykonywanej diagnostyki w zaawansowanym RJG zakłada jednoczesne wykonanie oceny obecności mutacji w genach *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*. W tej sytuacji powinno być rozliczone złożone badanie genetyczne w chorobach nowotworowych. Stan genów *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* jest najczęściej oceniany z wykorzystaniem bezpośredniego sekwencjonowania metodą Sangera lub qPCR. Kategoria badań genetycznych, czyli „proste badanie genetyczne”, zakłada wykonanie oznaczeń genetycznych metodą sekwencjonowania Sangera, to znaczy zsekwencjonowanie 1–6 amplikonów lub zastosowanie prostego testu diagnostycznego (z reguły qPCR). Dotyczy to sytuacji, kiedy mutacje wykrywane są w genie *KRAS* bez konieczności rozszerzania badania na pozostałe geny (*NRAS/BRAF*). Kategoria złożone badanie genetyczne zakłada wykonywanie oznaczeń genetycznych metodą Sangera, to znaczy zsekwencjo-

nowaniem od 6–40 amplikonów lub wykonanie analizy z użyciem reakcji PCR, w tym przypadku użyciem jej modyfikacji, czyli reakcji qPCR oceniającej zmiany w dużym szerszym zakresie niż miało to miejsce w prostym badaniu genetycznym.

W praktyce najczęściej wykorzystywanymi metodami oceny stanu genów *KRAS/ NRAS/ BRAF* są:

1. sekwencjonowanie: dideoksy, pirosekwencjonowanie — czułość metody 10–20%, czas analizy od 5 do 10 dni;
2. metody oparte na PCR — czułość 1–5%, czas analizy poniżej 5 dni roboczych;
3. NGS — czułość 0,1–10%, czas analizy około 10 dni lub więcej.

Nie ma wątpliwości, że kontrola jakości mająca na celu kompleksowe sprawdzenie procedury diagnostycznej od otrzymania materiału, oceny zawartości komórek nowotworowych w preparacie, izolacji kwasów nukleinowych (DNA/RNA), przeprowadzenia oceny wariantów genetycznych aż do przygotowania raportu (wyniku) dla klinicysty/patomorfologa/chorego pozwala na utrzymanie wysokiej jakości pracy laboratorium i daje szansę na przekazanie wiarygodnych oraz przydatnych klinicznie wyników. Niestety, udział w systemie kontroli jakości jest dość kosztowny. Zasadne jest, aby uzyskały takie wsparcie systemowe — przykładowo — z Ministerstwa Zdrowia. Z drugiej strony udział w kontroli jakości powinien być standardem obowiązującym wszystkie

laboratoria genetyczne. Nie ma wątpliwości, że wysoka jakość wyników badań przekłada się bezpośrednio na prawidłową kwalifikację chorych do innowacyjnych terapii, obniża w rezultacie jej koszty i zwiększa dostępność do terapii [24–26].

Rokownicze znaczenie mutacji *BRAF*^{V600E} u chorych na raka jelita grubego

Mutacja *V600E* genu *BRAF* występuje u 8–12% chorych na RJG i jest negatywnym czynnikiem prognostycznym [27–30] z uwagi na agresywność fenotypu. Nowotwory z mutacją genu *BRAF* cechuje również większa częstość rozsiewu do otrzewnej i narządów mięsnych (np. wątroba i płuca). U części chorych mutacji *BRAF* towarzyszyć może obecność mutacji w *PIK3CA* (13% chorych) oraz *PTEN* (22% chorych) [31–33].

Wpływ mutacji *BRAF* na rokowanie jest odmienny w zależności od klinicznego zaawansowania nowotworu. W jednym z retrospektywnych badań obecność mutacji w genie *BRAF* była niezależnym czynnikiem prognostycznym dla czasu przeżycia całkowitego (OS, *overall survival*) i wolnego od choroby (DFS, *disease-free survival*) u chorych na RJG w stopniu II i III zaawansowania klinicznego [34]. Niezależną wartość prognostyczną mutacji potwierdzono również w retrospektywnej analizie obejmującej wyniki badań PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00, przy czym nie potwierdzono w niej negatywnego wpływu mutacji na częstość nawrotów po radykalnym leczeniu chirurgicznym [35, 36].

Wpływ mutacji *BRAF*^{V600E} na rokowanie jest ściśle powiązany z obecnością MSI oraz poprawnym funkcjonowaniem systemu MMR. Obecność insercji lub delecji w sekwencjach mikrosatelitarnych determinuje niestabilność genomową. Guzy z nagromadzeniem zmian w sekwencjach mikrosatelitarnych — tzw. wysoką MSI (MSI-H, *microsatellite instability high*) częściej zlokalizowane są w odcinku proksymalnym jelita grubego i cechują się słabym zróżnicowaniem histologicznym oraz masywnym naciekaniem podścieliska przez komórki limfocytarne [37]. Chorzy, u których obecność mutacji *BRAF* współistnieje z MSI, cechują się lepszym rokowaniem w porównaniu z osobami bez niestabilności (MSS, *microsatellite stability*), stąd też dominującym jest pogląd, że obecność MSI-H znosi niekorzystny wpływ mutacji *BRAF*^{V600E} na rokowanie [36, 38, 39]. Obecność MSI stanowi korzystny rokowniczo czynnik u chorych na RJG wyłącznie w stopniu II i III zaawansowania klinicznego. Jak wykazali Blaker i wsp., w grupie chorych z MSI-H obecność mutacji *BRAF*^{V600E} nie wpływa istotnie na OS w stosunku do chorych z prawidłowym stanem *BRAF* i MSS [40]. Chorzy z mutacją w genie *BRAF* lub MSS mieli natomiast istotnie skrócony OS oraz czas przeżycia zależny od choroby i czas wolny od nawrotu choroby

w porównaniu do chorych z obecnością mutacji w genie *BRAF* lub MSI. Obecność mutacji *BRAF* wpływała również na czas przeżycia zależny od choroby (DFS, *disease-specific survival*) u chorych MSS w stopniu III i IV zaawansowania klinicznego, ale nie miała wpływu na rokowanie u chorych w stopniu II zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej. Wyjaśnieniem jest równoważenie onkogenego efektu mutacji i wtórnego powstawania agresywnego fenotypu przez silną stymulację układu immunologicznego oraz aktywację odpowiedzi skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym będącej wynikiem MSI.

Kombinacja cechy prawidłowego stanu genu *BRAF* i MSS występuje z równą częstością we wszystkich stopniach zaawansowania RJG w przeciwieństwie do zmutowanego genu *BRAF* lub *MSS* rozpoznawanego głównie u chorych z zaawansowanym nowotworem. Nowotwory cechujące się obecnością MSI-H, bez względu na status genu *BRAF*, stwierdzane są głównie w nowotworach zaawansowanych miejscowo, co tłumaczy opisany wcześniej brak wpływu mutacji *BRAF* na rokowanie u chorych w stopniu III zaawansowania klinicznego. Odsetek chorych z mutacją *BRAF* lub *MSS* zwiększa się wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej (1,9% w stopniu I do 8% w stopniu IV). W grupie chorych z rozpoznaniem RJG w III stopniu zaawansowania mutacja w genie *BRAF* lub *MSS* łączy się z istotnym skróceniem czasu do nawrotu choroby oraz czasu przeżycia po rozpoznaniu nawrocie. Podobnej zależności nie wykazano w grupie chorych z MSI [41]. U chorych z MSS w stopniu III zaawansowania klinicznego wpływ mutacji *BRAF* na rokowanie był niezależny od liczby zajętych węzłów chłonnych oraz rodzaju zastosowanej chemioterapii adiuwantowej [40]. W przypadku nowotworów w I lub II stopniu zaawansowania klinicznego, u których mutacji *BRAF* nie towarzyszy MSI, nie obserwuje się agresywnego przebiegu choroby nowotworowej i skrócenia przeżycia całkowitego [36]. Rokowanie w tej grupie chorych ulega istotnemu pogorszeniu w przypadku wystąpienia nawrotu choroby, co jest konsekwencją gorszej odpowiedzi na zastosowaną chemioterapię [41, 42]. Gorsze rokowanie w przypadku nawrotu choroby dotyczy również chorych w stopniu III zaawansowania klinicznego. Mimo potwierdzenia — między innymi w badaniu CALGB89803 — negatywnego wpływu na przeżycie całkowite chorych w stopniu III z mutacją *BRAF* [43], oznaczanie tego zaburzenia nie ma charakteru negatywnego czynnika prognostycznego nawrotu choroby po leczeniu radykalnym. Analiza zbiorcza wyników badań NSABP-C07 i NSABD-C08 wykazała natomiast, że obecność mutacji *BRAF* miała istotnie niekorzystny czas przeżycia po nawrocie choroby [44].

Wartość rokownicza mutacji w genie *BRAF* u chorych z rozpoznaniem zaawansowanego RJG poddanych

resekcji chirurgicznej zmian przerzutowych zlokalizowanych w narządach miękkich jest niejednoznaczna, co wynika z ograniczonej liczby chorych objętych analizami. Metastazektomie są wykonywane u nie więcej niż 1–4% chorych z mutacją *BRAF* w IV stopniu zaawansowania. W grupie chorych poddanych resekcji zmian przerzutowych z wątroby obecność mutacji *BRAF* była negatywnym czynnikiem rokowniczym dla przeżycia całkowitego. Podobne wyniki zaprezentowali Schirripa i wsp., oceniający wartość prognostyczną mutacji w genach *RAS* i *BRAF* u chorych z rozsianym RJG poddanych resekcji chirurgicznej zmian w wątrobie. Odsetek chorych z mutacją w analizowanej populacji wyniósł 4%. Ryzyko nawrotu u chorych z mutacją w genie *BRAF* było istotnie większe od obserwowanego dla wszystkich chorych objętych badaniem i zależało od stopnia zaawansowania zmian pozawątrobowych, wystąpienia przerzutów synchronicznych oraz możliwości uzyskania radykalności wycięcia przerzutów. Obecność mutacji w genie *BRAF* związana była również z istotnym skróceniem OS chorych (22,6 wobec 63,0 miesiąca dla wszystkich chorych objętych badaniem) oraz zwiększeniem ryzyka zgonu. Czynniki istotnie wpływającymi na wskaźniki przeżycia chorych były stopień sprawności ogólnoustrojowej, obecność zmian pozawątrobowych, prawostronna lokalizacja guza pierwotnego oraz brak doszczętności chirurgicznej. Analiza molekularna wykazała u większości chorych współistnienie mutacji genu *BRAF* z nieobecnością MSI [45].

Nieobecność MSI w komórkach nowotworowych u chorych poddanych metastazektomii zmian w wątrobie jest zjawiskiem stosunkowo częstym, choć trudno jest jednoznacznie określić wpływ na rokowanie. Umeda i wsp., analizując grupę 100 chorych z synchronicznymi lub metachronicznymi przerzutami do wątroby poddanych metastazektomii, nie stwierdzili u żadnego z nich współistnienia mutacji *BRAF* i MSI [46]. Obecność mutacji *BRAF* — podobnie jak w innych analizach — wiązała się z gorszym rokowaniem. Około 1/3 chorych z mutacją genu *BRAF* pozostawało przy życiu po roku od wykonanej resekcji zmian przerzutowych (około 94% dla chorych z prawidłowym stanem genu *BRAF*). Nie odnotowano natomiast przeżyć 3-letnich, które były udziałem 77% chorych bez mutacji genu *BRAF*. Co ważniejsze, u 64% chorych z prawidłowym stanem genu *BRAF* nie stwierdzono nawrotu choroby w pierwszym roku od wykonania metastazektomii w przeciwieństwie do chorych z mutacją, którzy wszyscy doświadczyli nawrotu choroby w okresie krótszym niż rok od resekcji zmian przerzutowych. Nieco inne dane dotyczące czasu przeżycia chorych pochodzą z pracy Teng i wsp., którzy ocenili wartość rokowniczą mutacji *BRAF* u chorych z zaawansowanym RJG poddanych resekcji chirurgicznej zmian przerzutowych w wątrobie [47]. Na podstawie przeprowadzonych analiz wykazali

oni, podobnie jak Schirripa i wsp., skrócenie mediany OS u chorych z mutacją w genie *BRAF*, ale wartości median były istotnie gorsze od raportowanych przez Schirripa i wsp. [45]. Obserwacja cytowana nie podważa negatywnego znaczenia predykcyjnego mutacji *BRAF* w tej grupie chorych, lecz może być wynikiem prowadzenia analiz statystycznych w małych liczebnie populacjach. Obecność mutacji *BRAF* oraz wykazanie jej negatywnego wpływu na rokowanie u chorych poddanych metastazektomii zmian w wątrobie nie powinny być zasadniczym parametrem decydującym o kwalifikacji chorego do takiego postępowania [35]. Analiza danych z Mayo Clinic przedstawiona przez Johnson i wsp. wskazuje na wydłużenie mediany OS oraz czasu przeżycia wolnego od progresji choroby (PFS, *progression-free survival*) chorych z mutacją w genie *BRAF* poddanych doszczętniej resekcji zmian przerzutowych w porównaniu z osobami bez mutacji leczonymi wyłącznie zachowawczo (mediany OS i PFS — odpowiednio — 29,1 i 22,7 miesiąca oraz 13,6 i 6,2 miesiąca). Co ważniejsze, wykonana przez autorów ocena wpływu różnych czynników na czas przeżycia chorych z mutacją *BRAF* (wiek, płeć, lokalizacja guza pierwotnego, stosowana chemioterapia, obecności synchronicznych lub metachronicznych zmian przerzutowych) wskazała jednoznacznie na wartość metastazektomii w leczeniu tej grupy chorych [48]. Mediana PFS po wykonanej metastazektomii wyniosła 9,7 miesiąca, a czynnikami wpływającymi na OS były rozsiew choroby podstawowej do otrzewnej oraz współistnienie mutacji *BRAF*^{V600E} z MSI (mediany — odpowiednio — 19,6 miesiąca wobec 23,8 miesiąca dla *BRAF*^{V600E}/MSS).

Przegląd metod leczenia chorych na zaawansowanego raka jelita grubego z mutacją *BRAF*^{V600E}

Chemioterapia, leki biologiczne i skojarzenia

Standardowa chemioterapia u chorych na zaawansowanego RJG obejmuje połączenie fluoropirymidyny z irynotekaniem lub oksaliplatyną. Wtórne analizy podgrup w wielu badaniach klinicznych z randomizacją wskazują na brak korzyści terapeutycznych z konwencjonalnej dwulekowej chemioterapii u chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} [49]. Dane z badań retrospektywnych wskazują, że mediana PFS dla pierwszych trzech linii konwencjonalnej chemioterapii wynosi — odpowiednio — 6,3, 2,5 i 2,6 miesiąca [50]. Wiele chorych nie otrzymuje kolejnych (poza pierwszą) linii leczenia z powodu dynamicznej progresji i pogorszenia stanu sprawności. Uzasadnione jest poszukiwanie bardziej intensywnych strategii, którymi są — przykładowo — trójlekowa chemioterapia FOLFOXIRI lub skojarzenie

chemioterapii z przeciwciałami anti-EGFR lub lekami antyangiogennymi.

Schemat FOLFOXIRI w skojarzeniu z bewacyzumabem zastosowany w leczeniu pierwszej linii w badaniu II fazy pozwolił u chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} uzyskać mediany PFS i OS o wartości odpowiednio 11,8 miesiąca i 24,1 miesiąca [51]. W badaniu III fazy TRIBE wykazano poprawę przeżycia przy zastosowaniu schematu FOLFOXIRI z bewacyzumabem w porównaniu z dwulekową chemioterapią FOLFIRI z bewacyzumabem. W podgrupie chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} przewaga intensywniejszego leczenia była klinicznie znacząca, ale statystycznie nieznamienista, co prawdopodobnie było związane z małą (28) liczbą chorych (mediany OS i PFS — odpowiednio — 19,0 wobec 10,7 miesiąca i 7,5 wobec 5,5) [52]. Badanie TRIBE-2, w którym stosowano chemioterapię FOLFOXIRI z bewacyzumabem lub FOLFOX i następnie FOLFIRI także w połączeniu z bewacyzumabem, potwierdziło korzyść w zakresie wskaźników obiektywnych odpowiedzi w całej populacji, natomiast w podgrupie 66 chorych z mutacją *BRAF* nie wykazano znaczącej poprawy [53].

Niedawno przeprowadzona metaanaliza obejmująca 5 badań z randomizacją porównujących FOLFOXIRI z bewacyzumabem do schematów dwulekowych z bewacyzumabem nie wykazała w analizie podgrup żadnej przewagi schematu trójlekowego u chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} [54].

W analizie zbiorczej badań AVF2107g i AGITG MAX, w których stosowano bewacyzumab dołączony do różnych schematów chemioterapii, stan genu *BRAF* miał znaczenie prognostyczne. Nie przewidywał wyniku leczenia bewacyzumabem, chociaż dane wykazały liczbową poprawę przeżycia pod wpływem leczenia antyangiogenne [55, 56].

Badano także inne leki antyangiogenne, ponieważ dane z badań przedklinicznych wskazują, iż mutacja *BRAF* może modulować odpowiedź nowotworu na takie leczenie. W badaniu VELOUR oceniono wpływ dodania afliberceptu do chemioterapii FOLFIRI w leczeniu drugiej linii. W analizie przeżycia stratyfikowanego według biomarkerów prognostycznych w podgrupie z mutacją *BRAF* odnotowano poprawę OS w porównaniu z populacją bez mutacji, jednak różnica nie była statystycznie znamienista [57]. Podobne wyniki uzyskano w przypadku ramucyrumabu dodanego do chemioterapii FOLFIRI w badaniu RAISE [58]. Korzyść ze stosowania leków antyangiogennych nie została zatem statystycznie udowodniona w tej populacji chorych. Trudność w udowodnieniu może jednak wynikać z małej liczebności podgrup chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} (36 w badaniu VELOUR i 41 w badaniu RAISE). Leczenie antyangiogenne nie może przełamać negatywnego wpływu prognostycznego mutacji *BRAF*^{V600E}, jednak odnotowane w powyższych badaniach wskaźniki ryzyka

sugerują, że ma ono pewną wartość w tej szczególnej populacji chorych.

W odniesieniu do przeciwciał skierowanych przeciw receptorowi dla naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) dostępne dane są sprzeczne. Dodanie panitumumabu do chemioterapii FOLFOX (badanie PRIME) lub FOLFIRI (badanie PICCOLO) nie wykazało korzyści klinicznych, a nawet odnotowano negatywny wpływ skojarzenia chemioterapii z leczeniem anti-EGFR na przeżycie chorych z mutacją *BRAF* w badaniu PICCOLO [59, 60].

Przeprowadzono także zbiorczą analizę danych uzyskanych w badaniach z randomizacją CRYSTAL i OPUS oceniających dodanie cetuksymabu do chemioterapii FOLFIRI lub FOLFOX w leczeniu pierwszej linii chorych bez mutacji w kodonie 12. i 13. eksonu 2. genu *KRAS*. Wykazano poprawę pod względem wskaźników odpowiedzi i przeżycia w podgrupie chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} na skutek zastosowania skojarzonego leczenia, ale obserwowane różnice nie były statystycznie znamienne [61]. Wyniki powinny być interpretowane z dużą ostrożnością z uwagi na bardzo małą liczebność podgrupy chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} (59 chorych w badaniu CRYSTAL i 11 chorych w badaniu OPUS). Autorzy tej analizy zbiorczej sugerowali, że mutacja *BRAF*^{V600E} nie wydaje się czynnikiem predyktorynym oporności na terapię anti-EGFR tylko niekorzystnym czynnikiem rokowniczym.

W celu wyjaśnienia predyktoryjnej roli mutacji *BRAF*^{V600E} u chorych leczonych przeciwciałami anti-EGFR przeprowadzono dwie metaanalizy badań klinicznych II i III fazy z zastosowaniem cetuksymabu lub panitumumabu samodzielnie lub w połączeniu z chemioterapią w pierwszej, drugiej lub kolejnej linii [62, 63]. Pierwsza metaanaliza wykazała, że przeciwciała anti-EGFR nie poprawiały znacząco przeżycia u chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} w porównaniu do standardowej chemioterapii lub najlepszego leczenia wspomagającego. Druga metaanaliza również nie wykazała znaczącej poprawy w zakresie wskaźników przeżycia. Podczas porównywania czasu przeżycia całkowitego między podgrupą z mutacją *BRAF*^{V600E} i prawidłowym stanem genu, test interakcji nie był istotny statystycznie — autorzy uważają, że mutacja *BRAF*^{V600E} nie powinna ograniczać możliwości zastosowania przeciwciał anti-EGFR.

Metaanalizy powyższe nie dostarczają zatem dostatecznych dowodów pozwalających ustalić zależność między leczeniem anti-EGFR (monoterapia lub w skojarzeniu z chemioterapią) i stanem *BRAF* dla wskaźników przeżycia. Obie analizy podlegają przy tym pewnym ograniczeniom, które obejmują dużą różnorodność populacji chorych, schematów chemioterapii i linii leczenia. Kwestia znaczenia predyktoryjnego mutacji *BRAF*^{V600E} powinna być natomiast oceniona w badaniach prospektywnych. Należy podkreślić, że

zalecenia ESMO (*European Society of Medical Oncology*) i NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) nie rekomendują stosowania przeciwciał anti-EGFR bez jednoczesnego blokowania kinazy BRAF w tej populacji chorych [64, 65].

Podjęto również próbę porównania aktywności terapii antyangiogennej i anti-EGFR, kojarzącej bewacyzumab lub cetuksymab z trójlekową chemioterapią FOLFOXIRI w badaniu II fazy z randomizacją FIRE 4.5 [66]. Pierwszorzędowy punkt końcowy (założono względną poprawę wskaźnika odpowiedzi obiektywnych o 37,5% pod wpływem cetuksymabu) nie został osiągnięty. Odnotowano wyraźną przewagę liczbową leczenia z bewacyzumabem zarówno w odniesieniu do wskaźnika odpowiedzi (60% wobec 49%, $p = 0,33$) i mediany PFS (10 wobec 6 miesięcy; $p = 0,01$), co szczególnie dotyczyło chorych z prawostronną lokalizacją pierwotnego guza — różnica nie była jednak statystycznie znamienne. Dane dotyczące czasu przeżycia ogółem są niedojrzałe, ale w chwili analizy mediany nie różniły się statystycznie.

Inhibitory kinazy BRAF

W ostatniej dekadzie inhibitory kinazy BRAF (wemurafenib, dabrafenib i encorafenib) — stosowane w monoterapii lub w skojarzeniu z inhibitorami kinazy MEK — poprawiły wyniki leczenia chorych na czerniaki skóry i błon śluzowych z mutacją $BRAF^{V600E}$ oraz wykazały obiecującą aktywność w niedrobnokomórkowym raku płuca z obecnością wymienionej mutacji. W badaniach przedklinicznych odnotowano, iż wemurafenib stosowany w monoterapii hamuje proliferację komórek i wzrastanie nowotworu w liniach komórkowych RJG z mutacją $BRAF^{V600E}$ [67]. Wyniki badania II fazy oceniającego aktywność wemurafenibu u leczonych uprzednio chorych na przerzutowego RJG z mutacją $BRAF^{V600E}$ okazały się rozczarowujące. Spośród 21 chorych tylko jeden osiągnął częściową odpowiedź, u siedmiu odnotowano stabilizację choroby z medianą PFS i OS — odpowiednio — 7,7 miesiąca i 2,1 miesiąca [68].

Oceny farmakokinetyczne sugerują, że rozbieżne odpowiedzi na inhibitory kinazy BRAF w czerniaku i RJG wynikają z różnic w podstawowej biologii guza. Komórki RJG w odróżnieniu od czerniaka mają pochodzenie nabłonkowe i wykazują ekspresję EGFR. Przypuszcza się, że brak odpowiedzi na monoterapię inhibitorem kinazy BRAF wynika przynajmniej częściowo z aktywacji zwrotnej EGFR, powodującej reaktywację szlaku sygnałowego kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK, *mitogen activated protein kinase*) [67, 69]. Skojarzenie inhibitorów kinazy BRAF oraz EGFR pozwala hamować przekazywanie sygnału szlakiem MAPK, co przekłada się na większą aktywność leczenia [70]. Obecne kierunki badań nad zastosowaniem leków molekularnie

ukierunkowanych w leczeniu chorych na RJG z mutacją $BRAF^{V600E}$ obejmują skojarzenie inhibitorów BRAF, EGFR i MEK.

Wyniki pierwszego w historii badania fazy III BE-ACON — oceniającego takie postępowanie w grupie uprzednio leczonych chorych — ustanowiły nowy standard postępowania w zaawansowanym RJG z mutacją $BRAF^{V600E}$. Leczenie okazało się na tyle wartościowe, że podjęto próby zastosowania u chorych wcześniej niepoddawanych leczeniu. W badaniu II fazy AN-CHOR CRC skojarzenie zawierające encorafenib, binimetynib i cetuksymab wykazało znaczną aktywność w leczeniu pierwszej linii. Oszacowany przez badacza i potwierdzony w ocenie niezależnych ekspertów odsetek obiektywnych odpowiedzi (pierwszorzędowy punkt końcowy) wyniósł 47,8% [95% przedział ufności (CI) 37,3–58,5], a odsetek kontroli choroby osiągnął 88%. Wartości wskaźników przeżycia były umiarkowanie zachęcające (mediany PFS i OS — odpowiednio — 5,8 miesiąca i 17,2 miesiąca) [71]. Skojarzenie encorafenibu z cetuksymabem stosowane wyłącznie lub w połączeniu z chemioterapią jest obecnie oceniane w badaniu III fazy BREAKWATER [72].

Inhibitory punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej

U około 15% chorych na raka jelita grubego (4–20% zależnie od stopnia klinicznego zaawansowania) występuje MSI-H. Ten szczególny fenotyp, będący wyrazem upośledzenia mechanizmów dMMR, może być związany z dziedzicznym niedoborem aktywności genów naprawczych w zespole Lyncha lub jest wynikiem sporadycznie występującego wyłączenia funkcji genu (najczęściej w mechanizmie epigenetycznym), co ma miejsce znacznie częściej. W rakach ze sporadyczną MSI mutacja $BRAF^{V600E}$ występuje kilkakrotnie częściej niż w rakach o fenotypie stabilnym (MSS), natomiast prawie nigdy mutacja $BRAF^{V600E}$ nie jest obecna w rakach powstałych na podłożu zespołu Lyncha [49, 73, 74]. Z kolei wśród raków z mutacją $BRAF^{V600E}$ fenotyp MSI występuje nawet w 40% przypadków. W populacyjnej kohorcie 1253 chorych zidentyfikowano 193 przypadki z MSI-H, wśród których 52% miało także mutację $BRAF^{V600E}$, natomiast 55% chorych z mutacją $BRAF^{V600E}$ miało fenotyp MSI-H [75].

Przyczyny współwystępowania sporadycznego MSI-H z mutacją $BRAF^{V600E}$ nie są do końca poznane. Niestabilność genomu towarzysząca upośledzeniu mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA tłumaczy zwiększoną częstotliwość mutacji ogółem (w tym również mutacji $BRAF^{V600E}$). Większość raków jelita grubego z mutacją $BRAF^{V600E}$ rozwija się na podłożu polipów ząbkowanych, w których obserwuje się metylację promotora i wyciszenie kluczowych genów supresorowych. Sugeruje się,

że fenotyp MSI-H może łagodzić niekorzystny wpływ rokowniczy mutacji *BRAF*^{V600E} szczególnie we wczesnym stadium choroby [76]. Raki o fenotypie MSI-H z mutacją *BRAF*^{V600E} mają mniej agresywny przebieg kliniczny i lepsze OS w porównaniu z rakami MSS z mutacją *BRAF*^{V600E} [49].

Biorąc pod uwagę częste współistnienie MSI-H z mutacją *BRAF*^{V600E}, uważa się, że inhibitory punktów kontrolnych odpowiedzi immunologicznej (np. pembrolizumab lub niwolumab) mogą być wartościowym leczeniem w omawianej populacji chorych. W badaniu II fazy CHECKMATE-142 oceniano leczenie niwolumabem w skojarzeniu lub nie z ipilimumabem u chorych na RJG z cechą MSI-H/dMMR. W kohorcie chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} uzyskano 25% i 55% obiektywnych odpowiedzi pod wpływem leczenia niwolumabem lub podczas immunoterapii skojarzonej oraz obserwowano możliwość trwałej kontroli choroby, a wyniki te są znacząco lepsze niż uzyskiwane pod wpływem chemioterapii [77, 78]. Dalsza obserwacja wykazała w grupie chorych z mutacją *BRAF*^{V600E} otrzymujących skojarzoną immunoterapię zwiększenie odsetka odpowiedzi obiektywnych do 70% (wynik wyższy o kilka punktów procentowych w porównaniu z podgrupą bez mutacji *BRAF*^{V600E}) [79].

W badaniu klinicznym KEYNOTE-177 pembrolizumab stosowany w leczeniu pierwszej linii chorych na zaawansowanego RJG z MSI-H był równie aktywny u chorych z i bez mutacji *BRAF*^{V600E} [80].

Obecnie nie ma dowodów, pozwalających przyjąć, że bardziej intensywna immunoterapia jest aktywniejsza u chorych z mutacją *BRAF*^{V600E}, co w przyszłości będzie przedmiotem badań.

Jak dotąd, nie przeprowadzono badań bezpośrednio porównujących immunoterapię z leczeniem ukierunkowanym na kinazę BRAF. Niektórzy eksperci uważają, że — z uwagi na potencjał trwałej kontroli choroby pod wpływem immunoterapii — stosowanie inhibitorów immunologicznych punktów kontrolnych może być leczeniem pierwszego wyboru u chorych na RJG MSI-H z mutacją *BRAF*^{V600E}. Należy jednak pamiętać o braku bezpośrednich dowodów na słuszność takiego postępowania. Mimo wspólnej cechy molekularnej kliniczny profil takiego chorego bywa bardzo zróżnicowany. Wymieniony profil może być w przyszłości wskazówką wyboru właściwego leczenia lub odpowiedniej sekwencji metod.

Nowe kierunki badań nad leczeniem systemowym

Obecnie prowadzonych jest wiele badań poszczególnych faz oceniających stosowanie leków molekularnie ukierunkowanych (anty-BRAF, anty-MEK, anty-EGFR) w różnych skojarzeniach. Nowym kierunkiem badań jest skojarzenie wymienionych leków z inhibitorami szlaku Wnt/beta-katenina lub inhibitorami kinazy PI3K.

Leczenie chirurgiczne chorych z przerzutami

Rak jelita grubego jest nowotworem, który w przypadku obecności ograniczonej liczby przerzutów jest możliwy do wyleczenia [81]. Korzyści z chirurgicznego leczenia są uwarunkowane starannym doбором chorych. Z uwagi na niekorzystne znaczenie rokownicze mutacji *BRAF*^{V600E}, istotne jest pytanie o wpływ wspomnianej nieprawidłowości genetycznej na decyzje o leczeniu chirurgicznym.

W jednoośrodkowym retrospektywnym badaniu z udziałem 92 chorych wykazano, że obecność mutacji *BRAF*^{V600E} była związana z rzadszym występowaniem choroby ograniczonej do wątroby (41% wobec 63%; $p < 0,01$), a u chorych z mutacją rzadziej możliwa była resekcja przerzutów (41% wobec 26%; $p < 0,01$) [82]. Spośród poddanych metastazektomii, chorzy z mutacją *BRAF*^{V600E} w porównaniu z pozostałymi osiągnęli krótsze przeżycie wolne od nawrotu (mediana — 7 wobec 11 miesięcy, $p = 0,084$) i gorsze wskaźniki 2-letnich OS (61% wobec 86%; $p = 0,003$). W grupie chorych poddanych resekcji z zamiarem wyleczenia nawrót choroby wystąpił u 90% chorych z mutacją *BRAF*^{V600E}. Nie ma wyników badań prospektywnych dotyczących tego zagadnienia, ale — z uwagi na charakterystykę rozsiewu raka z mutacją *BRAF*^{V600E} oraz wysokie ryzyko nawrotu — resekcja przerzutów w tej populacji może być rozważana tylko u bardzo starannie wybranych chorych z przerzutami ograniczonymi do wątroby, u których wcześniej uzyskano trwałą kontrolę choroby w odpowiedzi na leczenie systemowe.

Metody leczenia ukierunkowanego molekularnie u chorych na raka jelita grubego z mutacją w genie *BRAF*^{V600E}

Odkrycie istotnej roli mutacji *BRAF*^{V600E} w kształtowaniu agresywnego fenotypu komórek RJG pozwoliło na zidentyfikowanie celu molekularnego dla leczenia systemowego. W odróżnieniu od komórek czerniaka, w których samodzielna blokada zmutowanej kinazy BRAF lub równoległa blokada bezpośrednio powiązanych ze sobą kinaz BRAF i MEK pozwala na osiągnięcie kontroli procesu nowotworowego, w przypadku RJG nie obserwowano takich efektów [83, 84]. Fakt ten związany jest z funkcjonowaniem w komórkach nowotworów nabłonkowych pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego między kinazą BRAF a domeną wewnątrzkomórkową receptora EGFR [67]. Tym samym, zablokowanie kinazy BRAF prowadzi do nadmiernej aktywności sygnalizacyjnej EGFR, który przez równoległe szlaki transdukcji sygnału, na przykład PI3K-AKT-mTOR, stymuluje złośliwą biologię komórki nowotworowej.

Konsekwencją powyższych obserwacji było rozpoczęcie badań nad aktywnością przeciwnowotworową równoległej blokady kinazy BRAF oraz receptora EGFR. W otwartym, randomizowanym badaniu II fazy SWOG S1406 porównano skojarzenie irynotekanu, cetuksymabu i wemurafenibu (ramię eksperymentalne) z irynotekaniem i cetuksymabem (ramię kontrolne) w grupie 160 — wcześniej leczonych — chorych na przerzutowego RJG z mutacją *BRAF*^{V600E}. Terapia trójlekowa zwiększyła kilkukrotnie odsetek obiektywnych odpowiedzi i kontroli choroby (odpowiednio w ramieniu eksperymentalnym i kontrolnym — 17% wobec 4% oraz 65% wobec 21%). Zastosowanie wemurafenibu wiązało się ze znaczącą redukcją względnego ryzyka progresji lub zgonu o 50% przy medianach PFS wynoszących odpowiednio 4,2 miesiąca i 2,0 miesiące. U 42% chorych z ramienia kontrolnego w momencie progresji zastosowano schemat trójlekowy, co wpłynęło na brak różnicy badania w zakresie OS.

Równoległe do badania SWOG S1406 toczyło się badanie III fazy BEACON obejmujące 665 chorych, po niepowodzeniu pierwszej i drugiej linii chemioterapii. Chorych przydzielano losowo, w stosunku 1 : 1 : 1, do trzech ramion otrzymujących odpowiednio: (1) enkorafenib (inhibitor BRAF), binimetynib (inhibitor MEK) oraz cetuksymab — ramię eksperymentalne pierwsze, (2) enkorafenib i cetuksymab — ramię eksperymentalne drugie, oraz (3) chemioterapię z wyboru lekarza (cetuksymab + irynotekan lub cetuksymab + FOLFIRI) — ramię kontrolne. W badaniu nie stosowano procedury *cross-over*. Najbardziej aktualne wyniki — po medianie obserwacji wynoszącej prawie 14 miesięcy — wykazały znaczącą poprawę OS w obu ramionach eksperymentalnych w porównaniu z grupą kontrolną [85] — mediana w obu ramionach eksperymentalnych wynosiła 9,3 miesiąca wobec 5,9 miesiąca w grupie kontrolnej. Strategie terapeutyczne wykorzystujące enkorafenib umożliwiły znaczącą redukcję ryzyka zgonu o 40% (schemat trójlekowy) i 39% (schemat dwulekowy). Odsetek przeżyć 6-miesięcznych wynosił 71% dla terapii trójlekowej oraz 65% dla dwulekowej i nie różniły się istotnie między ramionami eksperymentalnymi, a w ramieniu kontrolnym odsetek przeżyć 6-miesięcznych wynosił 47%. Mediany PFS wynosiły 4,3 miesiąca (terapia trójlekowa), 4,2 miesiąca (terapia dwulekowa) oraz 1,5 miesiąca (ramię kontrolne) [86]. Terapia trójlekowa zmniejszyła względne ryzyko progresji lub zgonu o 62%, a dwulekowa o 60%. Odsetek obiektywnych odpowiedzi i stabilizacji choroby wynosił 26% i 42% (terapia trójlekowa), 20% i 54% (terapia dwulekowa) oraz 2% i 29% (ramię kontrolne), a progresję przy pierwszej ocenie stwierdzono odpowiednio u 10%, 7% i 34% chorych. Najczęstsze działania niepożądane obserwowane we wszystkich ramionach badania BEACON obejmowały biegunkę, wysypkę trądzikopodobną, nudności, wy-

mioty i zmęczenie, ale były one zdecydowanie najmniej nasilone w ramieniu z terapią dwulekową. W analizach jakości życia chorych uczestniczących w badaniu BEACON opartym na formularzach QLQ C30 i FACT-C wykazano znaczącą poprawę w ramionach eksperymentalnych, przy czym oba te ramiona nie różniły się między sobą [87].

Podsumowanie

Nowe możliwości leczenia systemowego chorych na RJG niewątpliwie poprawiają rokowanie. Wprowadzenie leczenia anty-BRAF i immunoterapii zwiększyło spektrum możliwości i mieści się w koncepcji personalizowanego postępowania przeciwnowotworowego. Obie — wymienione wyżej — możliwości leczenia zostały uwzględnione w wytycznych ESMO i NCCN.

Piśmiennictwo

- Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004; 23(38): 6445–6470, doi: [10.1038/sj.onc.1207714](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207714), indexed in Pubmed: [15322516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15322516/).
- Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol*. 2005; 23(2): 276–292, doi: [10.1200/JCO.2005.10.042](https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.042), indexed in Pubmed: [15637391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15637391/).
- Stjepanovic N, Moreira L, Carneiro F, et al. ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019; 30(10): 1558–1571, doi: [10.1093/annonc/mdz233](https://doi.org/10.1093/annonc/mdz233), indexed in Pubmed: [31378807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31378807/).
- McCartan D, Chatterjee S. Hereditary and familial cancer. *Surgery (Oxford)*. 2018; 36(3): 145–150, doi: [10.1016/j.mpsur.2017.12.003](https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.12.003).
- 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](https://doi.org/10.1038/nm.3967), indexed in Pubmed: [26457759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26457759/).
- Inamura K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(1), doi: [10.3390/cancers10010026](https://doi.org/10.3390/cancers10010026), indexed in Pubmed: [29361689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29361689/).
- Tie J, Desai J. Targeting BRAF mutant metastatic colorectal cancer: clinical implications and emerging therapeutic strategies. *Target Oncol*. 2015; 10(2): 179–188, doi: [10.1007/s11523-014-0330-0](https://doi.org/10.1007/s11523-014-0330-0), indexed in Pubmed: [25119972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25119972/).
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx (21.03.2020).
- Sveen A, Kopetz S, Lothe RA. Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020; 17(1): 11–32, doi: [10.1038/s41571-019-0241-1](https://doi.org/10.1038/s41571-019-0241-1), indexed in Pubmed: [31289352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31289352/).
- Siddiqui AD, Piperdi B. KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17(4): 1168–1176, doi: [10.1245/s10434-009-0811-z](https://doi.org/10.1245/s10434-009-0811-z), indexed in Pubmed: [19936839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19936839/).
- Xie YH, Chen YX, Fang JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2020; 5(1): 22, doi: [10.1038/s41392-020-0116-z](https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z), indexed in Pubmed: [32296018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32296018/).
- Jones J, Renfro L, Al-Shamsi H, et al. Non-V600BRAF 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](https://doi.org/10.1200/jco.2016.71.4394).
- Tran B, Kopetz S, Tie J, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011; 117(20): 4623–4632, doi: [10.1002/cncr.26086](https://doi.org/10.1002/cncr.26086), indexed in Pubmed: [21456008](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21456008/).
- 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](https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.06.001), indexed in Pubmed: [25069797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25069797/).
- van Krieken JH, Jung A, Kirchner T, et al. KRAS mutation testing for predicting response to anti-EGFR therapy for colorectal carcinoma:

- proposal for an European quality assurance program. *Virchows Arch.* 2008; 453(5): 417–431, doi: [10.1007/s00428-008-0665-y](https://doi.org/10.1007/s00428-008-0665-y), indexed in Pubmed: [18802721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18802721/).
16. Dijkstra JR, Heideman DAM, Meijer GA, et al. KRAS mutation analysis on low percentage of colon cancer cells: the importance of quality assurance. *Virchows Arch.* 2013; 462(1): 39–46, doi: [10.1007/s00428-012-1356-2](https://doi.org/10.1007/s00428-012-1356-2), indexed in Pubmed: [23242173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23242173/).
 17. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn.* 2010; 12(4): 425–432, doi: [10.2353/jmol dx.2010.090188](https://doi.org/10.2353/jmol dx.2010.090188), indexed in Pubmed: [20431034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20431034/).
 18. Tol J, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, et al. High sensitivity of both sequencing and real-time PCR analysis of KRAS mutations in colorectal cancer tissue. *J Cell Mol Med.* 2010; 14(8): 2122–2131, doi: [10.1111/j.1582-4934.2009.00788.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00788.x), indexed in Pubmed: [19453520](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19453520/).
 19. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016; 27(8): 1386–1422, doi: [10.1093/annonc/mdw235](https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235), indexed in Pubmed: [27380959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27380959/).
 20. Ebi H, Corcoran RB, Singh A, et al. Receptor tyrosine kinases exert dominant control over PI3K signaling in human KRAS mutant colorectal cancers. *J Clin Invest.* 2011; 121(11): 4311–4321, doi: [10.1172/JCI57909](https://doi.org/10.1172/JCI57909), indexed in Pubmed: [21985784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21985784/).
 21. Dienstmann R, Connor K, Byrne AT, et al. COLOSSUS Consortium. Precision Therapy in RAS Mutant Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2020; 158(4): 806–811, doi: [10.1053/j.gastro.2019.12.051](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.12.051), indexed in Pubmed: [31972237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31972237/).
 22. Margonis GA, Buettner S, Andreatos N, et al. Association of BRAF Mutations With Survival and Recurrence in Surgically Treated Patients With Metastatic Colorectal Liver Cancer. *JAMA Surg.* 2018; 153(7): e180996, doi: [10.1001/jamasurg.2018.0996](https://doi.org/10.1001/jamasurg.2018.0996), indexed in Pubmed: [29799910](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29799910/).
 23. Ma H, Brosens LAA, Offerhaus GJ, et al. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology.* 2018; 50(1): 49–59, doi: [10.1016/j.pathol.2017.09.004](https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.004), indexed in Pubmed: [29169633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29169633/).
 24. Praca zbiorowa. Optymalizacja diagnostyki patomorfologicznej i molekularnej oraz leczenia raka płuc ICD10-C34. 2020.
 25. Praca zbiorowa. Wpływ zmiany finansowania badań diagnostycznych genetycznych na dostępność do terapii innowacyjnych. 2020.
 26. EQA colon 2017.
 27. French AJ, Sargent DJ, Burgart LJ, et al. Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(11): 3408–3415, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-07-1489](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1489), indexed in Pubmed: [18519771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18519771/).
 28. Kalady MF, DeJulius KL, Sanchez JA, et al. BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *Dis Colon Rectum.* 2012; 55(2): 128–133, doi: [10.1097/DCR.0b013e31823c08b3](https://doi.org/10.1097/DCR.0b013e31823c08b3), indexed in Pubmed: [2228154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2228154/).
 29. Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut.* 2009; 58(1): 90–96, doi: [10.1136/gut.2008.155473](https://doi.org/10.1136/gut.2008.155473), indexed in Pubmed: [18832519](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18832519/).
 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](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0404), indexed in Pubmed: [16024606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16024606/).
 31. Chen D, Huang JF, Liu K, et al. BRAFV600E mutation and its association with clinicopathological features of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2014; 9(3): e90607, doi: [10.1371/journal.pone.0090607](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090607), indexed in Pubmed: [24594804](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24594804/).
 32. Ogino S, Noshio K, Kirkner GJ, et al. PIK3CA mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27(9): 1477–1484, doi: [10.1200/JCO.2008.18.6544](https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.6544), indexed in Pubmed: [19237633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19237633/).
 33. Zarkavelis G, Boussios S, Papadaki A, et al. Current and future biomarkers in colorectal cancer. *Ann Gastroenterol.* 2017; 30(6): 613–621, doi: [10.20524/aog.2017.0191](https://doi.org/10.20524/aog.2017.0191), indexed in Pubmed: [29118555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29118555/).
 34. Fariña-Sarasqueta A, van Lijschoten 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](https://doi.org/10.1093/annonc/mdq258), indexed in Pubmed: [20501503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20501503/).
 35. Nakayama I, Hirota T, Shinozaki E. Mutation in Colorectal Cancers: From Prognostic Marker to Targetable Mutation. *Cancers (Basel).* 2020; 12(11), doi: [10.3390/cancers12113236](https://doi.org/10.3390/cancers12113236), indexed in Pubmed: [33152998](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33152998/).
 36. 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](https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.3452), indexed in Pubmed: [20008640](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20008640/).
 37. Ashktorab H, Ahuja S, Kannan L, et al. A meta-analysis of MSI frequency and race in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(23): 34546–34557, doi: [10.18632/oncotarget.8945](https://doi.org/10.18632/oncotarget.8945), indexed in Pubmed: [27120810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27120810/).
 38. Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, et al. BRAF mutation status and survival after colorectal cancer diagnosis according to patient and tumor characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012; 21(10): 1792–1798, doi: [10.1158/1055-9965.EPI-12-0674](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0674), indexed in Pubmed: [22899730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22899730/).
 39. 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](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.09.038), indexed in Pubmed: [25280443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25280443/).
 40. Bläker H, Alwers E, Arnold A, et al. The Association Between Mutations in BRAF and Colorectal Cancer-Specific Survival Depends on Microsatellite Status and Tumor Stage. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019; 17(3): 455–462.e6, doi: [10.1016/j.cgh.2018.04.015](https://doi.org/10.1016/j.cgh.2018.04.015), indexed in Pubmed: [29660527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29660527/).
 41. 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](https://doi.org/10.1093/jnci/djw272), indexed in Pubmed: [28040692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28040692/).
 42. Sinicrope FA, Shi Q, Allegra CJ, et al. Association of DNA Mismatch Repair and Mutations in BRAF and KRAS With Survival After Recurrence in Stage III Colon Cancers: A Secondary Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol.* 2017; 3(4): 472–480, doi: [10.1001/jama-oncol.2016.5469](https://doi.org/10.1001/jama-oncol.2016.5469), indexed in Pubmed: [28006055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28006055/).
 43. Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(3): 890–900, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-11-2246](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2246), indexed in Pubmed: [22147942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22147942/).
 44. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, et al. Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(23): 6531–6541, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-12-0605](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0605), indexed in Pubmed: [23045248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23045248/).
 45. 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](https://doi.org/10.1038/bjc.2015.142), indexed in Pubmed: [25942399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25942399/).
 46. Kubota N, Taniguchi F, Nyuya A, et al. Poor prognosis of KRAS or BRAF mutant colorectal liver metastasis without microsatellite instability. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2013; 20(2): 223–233, doi: [10.1007/s00534-012-0531-9](https://doi.org/10.1007/s00534-012-0531-9), indexed in Pubmed: [23010994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23010994/).
 47. Teng HW, Huang YC, Lin JK, et al. BRAF mutation is a prognostic biomarker for colorectal liver metastasectomy. *J Surg Oncol.* 2012; 106(2): 123–129, doi: [10.1002/jso.23063](https://doi.org/10.1002/jso.23063), indexed in Pubmed: [22331825](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22331825/).
 48. Johnson B, Jin Z, Truty MJ, et al. Impact of Metastasectomy in the Multimodality Approach for V600E Metastatic Colorectal Cancer: The Mayo Clinic Experience. *Oncologist.* 2018; 23(1): 128–134, doi: [10.1634/theoncologist.2017-0230](https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0230), indexed in Pubmed: [28904173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28904173/).
 49. 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](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0332), indexed in Pubmed: [25139339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25139339/).
 50. 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](https://doi.org/10.1016/j.clcc.2014.06.001), indexed in Pubmed: [25069797](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25069797/).
 51. 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](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.08.024), indexed in Pubmed: [24138831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24138831/).
 52. 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(13): 1306–1315, doi: [10.1016/S1470-2045\(15\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00122-9), indexed in Pubmed: [26338525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26338525/).
 53. Cremolini C, Antoniotti C, Rossini D, et al. Upfront FOLFOXIRI plus bevacizumab and reintroduction after progression versus mFOLFOX6 plus bevacizumab followed by FOLFIRI plus bevacizumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (TRIBE2): a multi-centre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* 2020; 21(4): 497–507.
 54. Cremolini C, Antoniotti C, Stein A, et al. FOLFOXIRI/bevacizumab (bev) versus doublets/bev as initial therapy of unresectable metastatic colorectal cancer (mCRC): A meta-analysis of individual patient data

- (IPD) from five randomized trials. *J Clin Oncol.* 2020; 38(15_suppl): 4015–4015, doi: [10.1200/jco.2020.38.15_suppl.4015](https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.4015).
55. Ince WL, Jubb AM, Holden SN, et al. Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(13): 981–989, doi: [10.1093/jnci/dji174](https://doi.org/10.1093/jnci/dji174), indexed in Pubmed: [15998951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15998951/).
 56. Price TJ, Hardingham JE, Lee CK, et al. Impact of KRAS and BRAF Gene Mutation Status on Outcomes From the Phase III AGITG MAX Trial of Capecitabine Alone or in Combination With Bevacizumab and Mitomycin in Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29(19): 2675–2682, doi: [10.1200/JCO.2010.34.5520](https://doi.org/10.1200/JCO.2010.34.5520), indexed in Pubmed: [21646616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21646616/).
 57. Wirapati P, Pomella V, Vandenbosch B, et al. Velour trial biomarkers update: Impact of RAS, BRAF, and sidedness on aflibercept activity. *J Clin Oncol.* 2017; 35(15_suppl): 3538–3538, doi: [10.1200/jco.2017.35.15_suppl.3538](https://doi.org/10.1200/jco.2017.35.15_suppl.3538).
 58. Yoshino T, Obermannova R, Bodoky G, et al. Are BRAF mutated metastatic colorectal cancer (mCRC) tumors more responsive to VEGFR-2 blockage? Analysis of patient outcomes by RAS/RAF mutation status in the RAISE study—A global, randomized, double-blind, phase III study. *J Clin Oncol.* 2018; 36(4_suppl): 622–622, doi: [10.1200/jco.2018.36.4_suppl.622](https://doi.org/10.1200/jco.2018.36.4_suppl.622).
 59. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2014; 25(7): 1346–1355, doi: [10.1093/annonc/mdu141](https://doi.org/10.1093/annonc/mdu141), indexed in Pubmed: [24718886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24718886/).
 60. 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](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70163-3), indexed in Pubmed: [23725851](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23725851/).
 61. 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 randomized clinical trials. *Eur J Cancer.* 2012; 48(10): 1466–1475, doi: [10.1016/j.ejca.2012.02.057](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.057), indexed in Pubmed: [22446022](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22446022/).
 62. Pietrantonio F, Petrelli F, Coiu A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer.* 2015; 51(5): 587–594, doi: [10.1016/j.ejca.2015.01.054](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.01.054), indexed in Pubmed: [25673558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25673558/).
 63. Rowland A, Dias MM, Wiese MD, et al. Meta-analysis of BRAF mutation as a predictive biomarker of benefit from anti-EGFR monoclonal antibody therapy for RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2015; 112(12): 1888–1894, doi: [10.1038/bjc.2015.173](https://doi.org/10.1038/bjc.2015.173), indexed in Pubmed: [25989278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25989278/).
 64. Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, et al. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS. *Ann Oncol.* 2018; 29(1): 44–70, doi: [10.1093/annonc/mdx738](https://doi.org/10.1093/annonc/mdx738), indexed in Pubmed: [29155929](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29155929/).
 65. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). Colon Cancer. Version 2. 2021.
 66. Stintzing S, Heinrich K, Tougeron D, et al. Randomized study to investigate FOLFOXIRI plus either bevacizumab or cetuximab as first-line treatment of BRAF V600E-mutant mCRC: The phase-II FIRE-4.5 study (AIO KRK-0116). *J Clin Oncol.* 2021; 39(15_suppl): 3502–3502, doi: [10.1200/jco.2021.39.15_suppl.3502](https://doi.org/10.1200/jco.2021.39.15_suppl.3502).
 67. Yang H, Higgins B, Kolinsky K, et al. Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer. *Cancer Res.* 2012; 72(3): 779–789, doi: [10.1158/0008-5472.CAN-11-2941](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2941), indexed in Pubmed: [22180495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22180495/).
 68. 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](https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.2497), indexed in Pubmed: [26460303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26460303/).
 69. 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](https://doi.org/10.1038/nature10868), indexed in Pubmed: [22281684](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22281684/).
 70. 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](https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0341), indexed in Pubmed: [22448344](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22448344/).
 71. Grothey A, Tabernero J, Taieb J, et al. LBA-5 ANCHOR CRC: a single-arm, phase 2 study of encorafenib, binimetinib plus cetuximab in previously untreated BRAF V600E-mutant metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2020; 31: S242–S243, doi: [10.1016/j.annonc.2020.04.080](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.04.080).
 72. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT 04607421.
 73. 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](https://doi.org/10.1038/bjc.2015.160), indexed in Pubmed: [25973534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25973534/).
 74. 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](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2011-100714), indexed in Pubmed: [22368298](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22368298/).
 75. 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](https://doi.org/10.1093/jnci/djt173), indexed in Pubmed: [23878352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23878352/).
 76. Saridaki Z, Souglakos J, Georgoulas V. Prognostic and predictive significance of MSI in stages II/III colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(22): 6809–6814, doi: [10.3748/wjg.v20.i22.6809](https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6809), indexed in Pubmed: [24944470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24944470/).
 77. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017; 18(9): 1182–1191, doi: [10.1016/S1470-2045\(17\)30422-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30422-9), indexed in Pubmed: [28734759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28734759/).
 78. Overman MJ, Lonardi S, Wong KaY, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2018; 36(8): 773–779, doi: [10.1200/JCO.2017.76.9901](https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.9901), indexed in Pubmed: [29355075](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29355075/).
 79. André T, Lonardi S, Wong K, et al. SO-27 Nivolumab plus low-dose ipilimumab in previously treated patients with microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: 4-year follow-up from CheckMate 142. *Ann Oncol.* 2021; 32: S213–S214, doi: [10.1016/j.annonc.2021.05.051](https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.05.051).
 80. André T, Shiu KK, Kim TW, et al. KEYNOTE-177 Investigators. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2020; 383(23): 2207–2218, doi: [10.1056/NEJMoa2017699](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2017699), indexed in Pubmed: [33264544](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33264544/).
 81. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, et al. EORTC Gastro-Intestinal Tract Cancer Group, Cancer Research UK, Arbeitsgruppe Lebermetastasen und-tumoren in der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft Onkologie (ALM-CAO), Australasian Gastro-Intestinal Trials Group (AGITG), Fédération Francophone de Cancérologie Digestive (FFCD). Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013; 14(12): 1208–1215, doi: [10.1016/S1470-2045\(13\)70447-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70447-9), indexed in Pubmed: [24120480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24120480/).
 82. 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/ncr.28729](https://doi.org/10.1002/ncr.28729), indexed in Pubmed: [24737664](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24737664/).
 83. Corcoran RB, Atreya CE, Falchook GS, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition With Dabrafenib and Trametinib in BRAF V600-Mutant Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2015; 33(34): 4023–4031, doi: [10.1200/JCO.2015.63.2471](https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.2471), indexed in Pubmed: [26392102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26392102/).
 84. 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](https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.2497), indexed in Pubmed: [26460303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26460303/).
 85. Kopetz S, Grothey A, Cutsem EV, et al. Encorafenib plus cetuximab with or without binimetinib for BRAF V600E metastatic colorectal cancer: Updated survival results from a randomized, three-arm, phase III study versus choice of either irinotecan or FOLFIRI plus cetuximab (BEACON CRC). *J Clin Oncol.* 2020; 38(15_suppl): 4001–4001, doi: [10.1200/jco.2020.38.15_suppl.4001](https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.15_suppl.4001).
 86. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2019; 381(17): 1632–1643, doi: [10.1056/NEJMoa1908075](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908075), indexed in Pubmed: [31566309](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31566309/).
 87. Kopetz S, Grothey A, Cutsem EV, et al. Encorafenib plus cetuximab with or without binimetinib for BRAF V600E-mutant metastatic colorectal cancer: Quality-of-life results from a randomized, three-arm, phase III study versus the choice of either irinotecan or FOLFIRI plus cetuximab (BEACON CRC). *J Clin Oncol.* 2020; 38(4_suppl): 8–8, doi: [10.1200/jco.2020.38.4_suppl.8](https://doi.org/10.1200/jco.2020.38.4_suppl.8).