

# KRAS突變的臨床意義與分子檢測

張寧瑀<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>國泰綜合醫院分子醫學科，台北，台灣

<sup>2</sup>社團法人台灣分子醫學會，台北，台灣

## 摘要

表皮生長因子接受器 (epidermal growth factor receptor; EGFR) 的基因突變出現在多種的癌症，因此EGFR成為腫瘤標靶治療 (targeted therapy) 的選項之一。EGFR酪氨酸激酶 (tyrosine kinase) 小分子抑制劑或單株抗體都是目前針對這類癌症研發的藥物，其作用皆是阻斷EGFR的訊息傳遞路徑。KRAS是EGFR的下游分子，當KRAS突變時，就不會受到EGFR的調控，造成EGFR標靶治療無效，因此KRAS突變為負向生物指標 (negative biomarker)。偵測KRAS的突變方法有許多種，從最基本的桑格定序 (Sanger sequencing) 到焦磷酸測序 (pyrosequencing)，甚至是最新發表的SMAP-2 (Modified smart amplification process version 2)，各有千秋。因此如何挑選KRAS突變檢測方法視各實驗室之目地而定。(生醫 2010;3(1):283-290)

關鍵字：表皮生長因子接受器 (epidermal growth factor receptor; EGFR)、標靶治療 (targeted therapy)、負向生物指標 (negative biomarker)

## 前言

表皮生長因子接受器 (epidermal growth factor receptor; EGFR) 是一個調控細胞生長的穿膜蛋白，屬於人類EGFR蛋白質家族的四個成員之一 (圖一)。概觀其訊息傳遞路徑，表皮生長因子 (epidermal growth factor; EGF) 結合到細胞膜上的EGFR，KRAS將細胞膜上EGFR所接受的訊息傳遞到細胞核內，來調控細胞的正常生長。但是當EGFR或KRAS發生突變而持續活化時，就會造成細胞不斷生長形成腫瘤。

目前已有針對EGFR為標靶的小分子藥物，

如得舒緩 (Tarceva; erlotinib) 和艾瑞莎 (Iressa; gefitinib)。兩者皆能阻斷EGFR酪氨酸激酶 (tyrosine kinase) 區域的活性，目前已被廣泛應用在肺腺癌 (lung adenocarcinoma) 的治療。其中erlotinib已被美國食品與藥品管理局 (Food and Drug Administration; FDA) 列為轉移性非小細胞肺癌 (metastatic non-small cell lung cancer) 的二線和三線治療藥物。其病患治療反應約9%，並且能延長其整體存活率 (overall survival; OS) 約兩個月<sup>1</sup>。另外還有爾必得舒 (Erbix; cetuximab) 和帕尼單抗 (Vectibix; panitumumab) 兩種EGFR抑制劑，此兩者都是阻斷EGFR細胞外區域的單株抗體，主要用於頭頸部的癌症和結腸直腸癌

通訊作者：張寧瑀

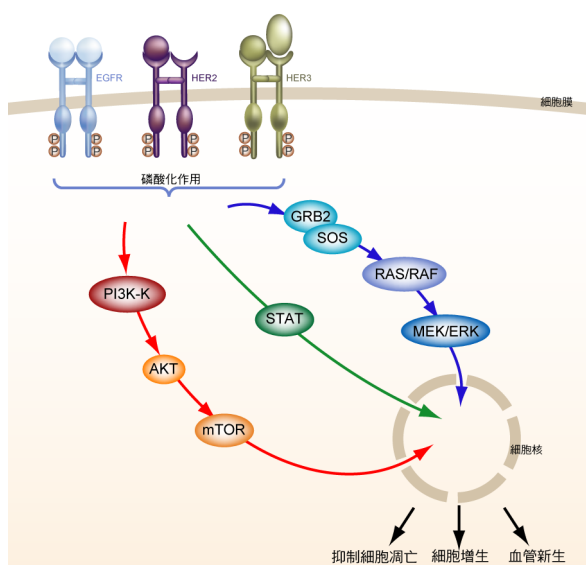
電話：886-2-2690-7965 ext 2308

傳真：886-2-2691-9800

地址：221 台北縣汐止市建成路160巷32號分子醫學科

電子郵件：vivianchang515@gmail.com

2009年8月13日來稿；2009年9月15日修改；2009年10月4日同意刊登



圖一、表皮生長因子接受器 (epidermal growth factor receptor; EGFR) 之訊息路徑。

EGFR受到配體的刺激後，會與EGFR家族的其他成員（如HER2或HER3）形成雙聚體（dimer），進而磷酸化酪胺酸激酶區域，啟動下游訊息傳遞因子。包括PI3K/AKT、RAS/RAF/MAPK等訊息路徑，造成細胞增生並且抑制細胞凋亡。（彩圖詳見本刊網頁）

（colorectal cancer; CRC）。研究顯示，末期CRC使用cetuximab搭配irinotecan治療後，能改善其OS<sup>2-3</sup>。Panitumumab大多單獨使用在CRC的治療，能提高此疾病的無病存活率（progression-free survival; PFS）<sup>4</sup>。

由於標靶療法中所針對的標靶，絕大多數為致癌蛋白（oncogene），抑制了此致癌蛋白的活性後即可抑制癌細胞的生長。因此，標靶療法中具有預測特性的生物指標（biomarker）常常都是作為正向的（positive），亦即此生物指標的出現意味著有功效的標靶治療。例如肺腺癌僅約10%的病患對erlotinib和gefitinib的治療有效。若以EGFR的突變當作指標，那麼約80%的病患對於erlotinib和gefitinib的治療有療效。因此，EGFR的突變則被視為EGFR小分子抑制劑（如gefitinib）治療的正向生物指標；而EGFR蛋白的表現量則是

EGFR抗體（如cetuximab）標靶療法的正向生物指標。

然而，有些病患即使出現正向生物指標，標靶藥物卻仍然對癌細胞無效。顯然僅利用正向生物指標作為治療的依據仍是不足的。吾人應再尋找負向的（negative）生物指標以排除對此藥無效之病患。由於細胞生長的訊息傳遞途徑中有許多致癌蛋白的參與。因此對某一標靶藥物而言，這些位於同一訊息傳遞途徑上的致癌蛋白就可分為兩大群。位於此標靶（生物指標）和細胞核之間的致癌蛋白即是下游（downstream）分子；相反地，從這標靶的另一方向遠離細胞核的致癌蛋白即是上游（upstream）分子。由這個模型來看，下游分子可能就是標靶藥物的負向生物指標。亦即，當病患對EGFR抑制劑的治療無效果時，有可能是因為下游分子的調控出現了問題。

## EGFR下游分子之突變對EGFR標靶療法的影響

EGFR有多個下游原致癌蛋白質（圖一）。其中KRAS指的是Kirsten RNA Associated Rat Sarcoma 2 Virus基因在人體內的同源基因。文獻指出當KRAS發生突變時，不管使用EGFR抑制劑或是EGFR單株抗體治療都無效<sup>5</sup>。在肺癌方面，有研究發現對於erlotinib或gefitinib治療有功效的病患（n=21）都沒有KRAS突變的現象。相反的，24%（9/38）的病患對此藥物有抗性（resistance），這些病人的腫瘤都有KRAS的突變。不僅如此，還有許多的研究也出現類似的結果<sup>6-12</sup>。此外，以erlotinib治療的病患中，KRAS無突變之患者較KRAS有突變之患者，有較佳的存活率<sup>9</sup>。

在大腸癌方面，FDA批准將cetuximab用於有表現EGFR之轉移性結腸直腸癌（metastatic colorectal cancer; mCRC）。但是卻有研究指出，EGFR的表現與cetuximab的療效並無相關性<sup>2,13</sup>。

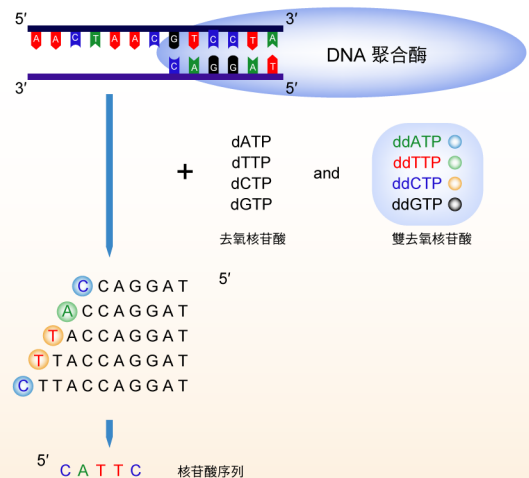
倒是KRAS的突變情形可用來評估患者對於EGFR單株抗體的治療反應。綜合許多臨床研究結果顯示，大約僅有40%的mCRC病患含有KRAS的突變，並且在研究中僅有一位KRAS發生突變的病患對於藥物治療有反應；而腫瘤為KRAS野生型（wild-type）的病患約16-17%對panitumumab治療有反應，約27-44%對cetuximab治療有反應<sup>14-17</sup>。類似的研究數據也出現在2008年的一項重要的cetuximab搭配化療的臨床試驗，此項試驗發現約有12.8% KRAS野生型的病患對cetuximab的治療有反應，但是僅有1.2%（一個病人）的KRAS突變患者對cetuximab的治療有反應<sup>18</sup>。在一項第三期的臨床試驗中，以irinotecan、fluorouracil、folinic acid加上cetuximab做為mCRC的第一線治療藥物試驗中，結果發現cetuximab對KRAS野生型的病患有效，且能增加PFS；但是對KRAS突變的病患無效<sup>19</sup>。所以我們可確定的是，KRAS的突變是EGFR抑制劑療效的負向指標。這表示有KRAS發生突變時，腫瘤對EGFR抑制劑的治療有抗性。因此目前許多腫瘤科醫師已將KRAS突變檢測視為erlotinib、gefitinib、和cetuximab用藥治療的基本檢測。相反地，Pool等人的實驗數據顯示正常表現KRAS及大量表現EGFR配體（ligand）—epiregulin及amphiregulin—的患者，最可能對cetuximab有反應<sup>20</sup>。

EGFR位於細胞表面，需要下游分子才能正常運作。假若這系統當中有任何一個分子被永久啟動，那麼EGFR抑制劑將無法發揮作用。由這個角度來看，如果KRAS的下游基因（如BRAF和PIK3CA）發生突變也會是EGFR抑制劑療效的負向指標。因此有研究指出，79名KRAS正常表現的mCRC患者當中有11名患者具有BRAF V600E突變，而這些患者對於cetuximab或panitumumab治療皆無反應<sup>21</sup>。另有研究證明在110名mCRC患者中，有15位患者的PIK3CA基因有突變，且這些患者對於EGFR單株抗體均有抗性<sup>22</sup>。這些研究人員表示，對EGFR單株抗體療法沒有反應的患者，有七成以上都可以PIK3CA/PTEN及KRAS的角色加以

解釋。

由於KRAS突變所扮演的負向指標角色重大，現在美國臨床腫瘤學會（American Society of Clinical Oncology; ASCO）以及美國國家癌症整合網路（National Comprehensive Cancer Network; NCCN）共同制定的綱領已指出，只要是診斷為mCRC的病患，均應檢測KRAS的突變情形以評估EGFR單株抗體—cetuximab和panitumumab—的治療。

## KRAS突變的檢測



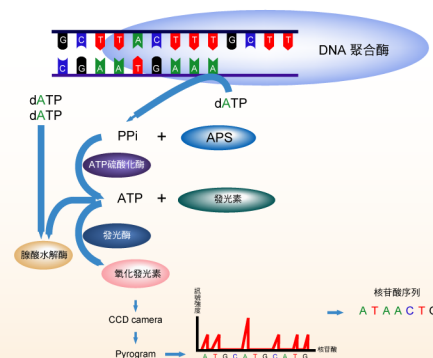
### 圖二、桑格定序（Sanger sequencing）。

將PCR反應分為四個反應槽，每個反應槽都加入DNA模板（template）、DNA聚合酶（DNA polymerase）、三種去氧核苷酸（deoxynucleotide; dNTP）。剩下的一種去氧核苷酸以其類似物—雙去氧核苷酸（dideoxynucleotide; ddNTP）代替。當DNA合成新股時，去氧核苷酸會嵌至DNA模板上，而雙去氧核苷酸亦有相同的功能。不同的是，雙去氧核苷酸其3'端缺乏氫氧基（hydroxyl group），無法與下一個核苷酸形成磷酸酯鍵（phosphoester bond）。所以一旦ddNTP與DNA模板形成配對後，就會終止PCR的反應，因此又稱為鏈終止法（chain termination method）。如此一來反應後會產生各種大小片段的DNA產物，此時利用電泳將這些片段進行分離，即可判讀出DNA的序列。（彩圖詳見本刊網頁）

KRAS突變檢測的方法有很多種，但是臨床上真正要採行哪幾種卻仍有爭議。不管是桑格定序（Sanger sequencing）、焦磷酸測序（pyrosequencing）、對偶基因聚合酶連鎖反應（allele-specific PCR）或是modified smart amplification process version 2（SMAP-2）的檢測方法，都有其愛好者，也都各有優缺點。目前缺乏KRAS突變檢測方法的共識。

直接定序的好處在於能夠偵測出所有的突變。但是直接定序（圖二）的敏感度（sensitivity）並不高，若癌組織佔檢體的1/4以下就會偵測不到（偽陰性）。因此每位分子醫學科醫師都應小心選出檢體內的腫瘤部分，然後萃取此部分檢體的DNA。若腫瘤組織的含量不高，可用顯微解剖法（microdissection）克服檢體不足的困難。

焦磷酸測序法是新世代的DNA序列分析技術，主要針對短或中等長度的DNA序列，是個精確度高且再現性佳的分析技術。其DNA序列分析反應之原理是利用幾種生化反應之組合，測定DNA在合成時，會產生焦磷酸基團（pyrophosphate, PPi），進而將PPi轉換成腺苷三磷酸（adenosine-5'-triphosphate; ATP），ATP再促使發光酶（luciferase）放出冷光（bioluminescence）。此放出的冷光強度經冷光儀（luminometer）偵測後，轉讀出DNA序列（圖三）。該技術特點包括：對DNA的序列分析無須進行電泳、DNA片段無須螢光標記（因此無須螢光分子的激發和檢測裝置）、可在96孔盤上進行反應，因此可同時進行多檢體序列分析。但也因反應特性的限制，精準讀序目前只在20-30個核苷酸（nucleotide）序列左右。有研究者改良此方法，使該技術的讀序長度增加一倍以上。因此有些專家偏好將焦磷酸測序法用於小片段的DNA序列，此法的花費較為經濟，並且敏感性高，因此較一般傳統桑格定序法還好。

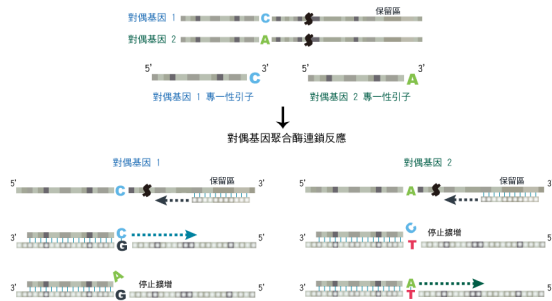


圖三、焦磷酸測序法（pyrosequencing）。

焦磷酸測序法於反應中加入四種酵素：DNA聚合酶（DNA polymerase）、ATP硫酸化酶（ATP sulfurylase）、發光酶（luciferase）和腺酸水解酶（apyrase），以及發光素受質（luciferin）。當去氧核苷酸與DNA模板發生配對時，可經由一連串反應最後產生光訊號。此光訊號經過偵測、紀錄後即可再加入另一種去氧核苷酸繼續進行反應。如果加入的去氧核苷酸無法與DNA模板形成配對，即無法產生光訊號。其反應步驟簡述如下：（1）於反應槽內同時加入PCR引子、DNA模板、DNA聚合酶、ATP硫酸化酶、發光酶、腺酸水解酶、發光素受質和腺苷磷酸硫酸（adenosine phosphosulfate; APS）。（2）第一輪反應中先加入一種去氧核苷酸，倘若此種去氧核苷酸與DNA模板互補時，DNA聚合酶會將此去氧核苷酸嵌至DNA模板上。而每一次配對成功時，就會同時釋放出與嵌至DNA模板上之去氧核苷酸等莫爾當量的焦磷酸基團（PPi）。（3）ATP硫酸化酶在APS存在時，可將焦磷酸基團轉換至ATP。（4）產生之ATP可經由發光酶的作用，將發光素轉換成氧化發光素，並且產生與ATP同等比例之可見光。（5）反應產生之可見光經由CCD相機偵測，由Pyrogram轉換成波峰狀訊號。而此波峰的高度會與嵌插至DNA模板上的去氧核苷酸數目等比例，如出現一個兩倍波峰的情形，即代表此處的核苷酸序列為兩個相同的核苷酸。（6）反應槽中的腺酸水解酶可將反應產生之ATP以及未反應之去氧核苷酸進行分解，因此可消除此一輪反應中所產生的光訊號，並再生反應系統。接著就可加入另一種類的去氧核苷酸進行下一輪反應。（7）如此周而復使的反應過程，便可產生一連串的波形訊號，而DNA序列也可從中得知。（彩圖詳見本刊網頁）

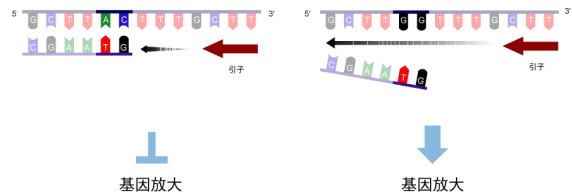
對偶基因聚合酶連鎖反應 (allele-specific polymerase chain reaction; AS-PCR) 是根據已知基因序列設計引子 (primer)。其結果的再現性高，但是對於未知的DNA序列就不適用了。此方法利用PCR原理，設計一組引子，一個與DNA模板的保留區 (conserved domain) 互補，確保PCR過程的進行。另一個引子分為兩種，一種含有野生型的核苷酸序列，另一種則是包含突變型的核苷酸序列。此兩種引子分別和與DNA模板的保留區互補的引子進行PCR反應。因此只要觀察不同引子的PCR產物即可得知特定DNA序列有無突變。此方法可快速並準確篩選大量的檢體 (圖四)。

2008年Tatsumi<sup>23</sup>等人發表了一項能快速檢測KRAS突變的一套方法，命名為modified smart



**圖四、對偶基因聚合酶連鎖反應 (allele-specific polymerase chain reaction; AS-PCR)。**

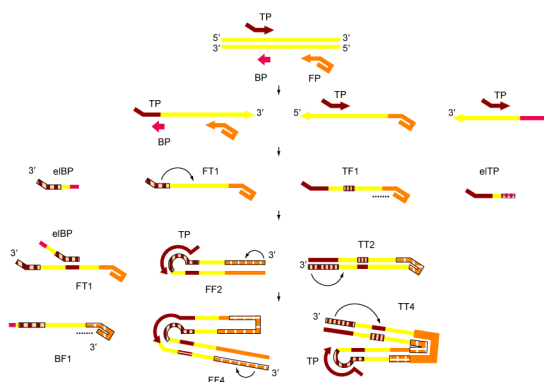
AS-PCR的原理是利用不同的引子來分辨DNA有無發生突變。設計一組引子，其中一個引子會結合上DNA的保留區 (conserved domain)，另一個引子分為兩種，其中引子的最後一個核苷酸就是我們要觀察的突變位置，一種會與野生型的DNA序列結合，另一種則會與突變型DNA序列結合。分別將這兩種引子和與保留區互補的引子進行PCR反應，倘若只有加入野生型序列的引子會有PCR產物，代表檢體內的DNA序列為野生型；若只有加入突變型序列的引子會進行PCR反應，代表此基因序列的突變為同合突變型 (homozygous mutant)；如果野生型序列的引子和突變型序列的引子都有PCR產物，代表此基因序列的突變為異合突變型 (heterozygous mutant)。(彩圖詳見本刊網頁)



**圖五、胜肽核酸 (peptide nucleic acid; PNA) 作用機制。**

PNA可準確結合到野生型DNA序列上，結合力比DNA-DNA的結合還要強，因此當PCR反應進行到PNA-DNA此區域時，DNA聚合酶無法解開此鏈結，PCR反應就會中斷。若是DNA發生突變，PNA-DNA的結合會降低，DNA聚合酶就可以解開這個雙股結構，PCR反應仍可持續進行。(彩圖詳見本刊網頁)

amplification process version 2 (SMAP-2)。此方法利用胜肽核酸 (peptide nucleic acid; PNA) 搭配先前Hayashizaki<sup>24</sup>團隊所研發的SMAP-2的原理而成的。PNA為DNA的類似物，不同的是醯胺鍵 (amide bond) 取代了DNA特有的去氧核糖磷酸 (deoxyribose-phosphate) 的骨架 (backbone)。因為有此結構上之差異，使得PNA可準確地結合至DNA模板 (template) 上所對應的核苷酸序列，但是DNA聚合酶 (DNA polymerase) 無法辨識PNA，因而PCR反應無法進行。此外，PNA-DNA的結合較DNA-DNA的結合來的強，如果PNA所辨識的DNA序列發生點突變時，PNA與DNA的結合會降低 (圖五)。SMAP-2主要應用的兩個技術是採用 *Thermus aquaticus* MutS (Taq MutS) 搭配恆溫擴張法 (isothermal amplification) 的方式，另一個就是使用兩個不對稱 (asymmetric) 的引子—folding primer (FP) 和turn-back primer (TP)，利用其self-priming的特性，專一性地放大所要觀察之DNA特定片段。修改 (modified) 後的SMAP-2即是將PNA取代Taq MutS (圖六)，當基因型態為野生型時，PNA-DNA的鏈結力會阻斷PCR進行延長反應 (elongation) 而沒有PCR產物生成。一旦DNA發生點突變，PCR延長反應的高溫可打斷PNA-DNA



圖六、Modified smart amplification process version 2 (SMAP-2)。

利用PCR方法，於反應中加入所需之DNA模板、DNA聚合酶、去氧核苷酸，此外再加入PNA。PNA為一特殊設計的類DNA片段，與其序列須與野生型DNA序列互補，並且此互補的片段須包含欲檢測之突變位置。當DNA為野生型時，PNA-DNA的鍵結力強，因此DNA聚合酶無法打斷此鍵結力，PCR反應進而終止。倘若DNA有突變，則PNA-DNA的鍵結力會降低，所以在PCR延長反應時，高溫會打斷此鍵結，PCR得以持續進行。SMAP-2在此反應中添加兩種不對稱的引子—FP和TP。FP如同名字所示，具有摺疊（folding）的構造，此構造是由於末端的序列本身互補，因此可向內摺疊。TP具有折轉（turn back）的功能，其PCR產物的序列上有相對應的序列，TP會與此序列結合，形成環狀（loop）結構。由於添加TP和FP可使PCR專一性放大自己的PCR產物，減少其背景產物的汙染，有效提高檢測的準確性。（彩圖詳見本刊網頁）

之間的鍵結，PCR得以繼續進行。此法的優點在於能快速的檢測基因是否發生突變，因為一般PCR反應都應具有高純度的DNA，以確保DNA聚合酶的作用。但是利用修改後的SMAP-2不僅能應用在粗產物（crude lysate）和冷凍組織（frozen tissue）上，也適用於蠟塊檢體。

## 結語

致癌蛋白已成為目前癌症治療的新目標，設

計標靶藥物可專一性的殺死帶有此標靶的癌細胞。標靶治療的副作用較傳統化學治療低，是癌症治療的革命性突破。依據此原則，當我們使用標靶藥物時，一定要先以正向指標篩選才不會漫無目標的治療。然而，細胞訊息卻可能失調而讓癌細胞不受控制的生長，使得標靶藥物也無法作用。因此，在使用標靶藥物前也應檢驗負向指標。最近的資料顯示，KRAS突變可作為EGFR療法的負向生物指標，而EGFR抗體在有KRAS突變的結腸直腸癌病患中幾乎無療效，因此負向指標能減少不必要的治療。因此如何增加KRAS突變檢測的準確性以及快速檢測的方法已成為臨床上重要的議題。目前最常用的為桑格定序法，但是其他方法也有擁護者。然而各種檢測方法都有利弊，目前並無共識。

## 引用文獻

1. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, Campos D, Maoleekoonpiroj S, Smylie M, Martins R, van Kooten M, Dediu M, Findlay B, Tu D, Johnston D, Bezjak A, Clark G, Santabarbara P, Seymour L; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123-132.
2. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337-345.
3. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcborg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2040-2048.
4. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:1658-1664.
5. Pao W, Wang TY, Riely GJ, Miller VA, Pan Q, Ladanyi M, Zakowski MF, Heelan RT, Kris MG, Varmus HE. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*

- 2005;2:e17.
6. Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, Li AR, Patel JD, Heelan RT, Kris MG, Sandler AB, Carbone DP, Tsao A, Herbst RS, Heller G, Ladanyi M, Pao W, Johnson DH. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol* 2008;26:1472-1478.
  7. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F, McCoy J, Bemis L, Xavier AC, Dziadziuszko R, Gumerlock P, Chansky K, West H, Gazdar AF, Crino L, Gandara DR, Franklin WA, Bunn PA Jr. Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol* 2007;18:752-760.
  8. Jackman DM, Yeap BY, Lindeman NI, Fidias P, Rabin MS, Temel J, Skarin AT, Meyerson M, Holmes AJ, Borrás AM, Freidlin B, Ostler PA, Lucca J, Lynch TJ, Johnson BE, Jänne PA. Phase II clinical trial of chemotherapy-naïve patients > or = 70 years of age treated with erlotinib for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:760-766.
  9. Zhu CQ, da Cunha Santos G, Ding K, Sakurada A, Cutz JC, Liu N, Zhang T, Marrano P, Whitehead M, Squire JA, Kamel-Reid S, Seymour L, Shepherd FA, Tsao MS; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* 2008;26:4268-4275.
  10. Massarelli E, Varella-Garcia M, Tang X, Xavier AC, Ozburn NC, Liu DD, Bekele BN, Herbst RS, Wistuba II. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:2890-2896.
  11. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira JR, Ciuleanu T, von Pawel J, Watkins C, Flannery A, Ellison G, Donald E, Knight L, Parums D, Botwood N, Holloway B. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5034-5042.
  12. Han SW, Kim TY, Jeon YK, Hwang PG, Im SA, Lee KH, Kim JH, Kim DW, Heo DS, Kim NK, Chung DH, Bang YJ. Optimization of patient selection for gefitinib in non-small cell lung cancer by combined analysis of epidermal growth factor receptor mutation, K-ras mutation, and Akt phosphorylation. *Clin Cancer Res* 2006;12:2538-2544.
  13. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, Shah M, Schwartz GK, Tse A, Hamilton A, Pan D, Schrag D, Schwartz L, Klimstra DS, Fridman D, Kelsen DP, Saltz LB. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005;23:1803-1810.
  14. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboué R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* 2007;96:1166-1169.
  15. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626-1634.
  16. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374-379.
  17. De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008;19:508-515.
  18. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalcberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1757-1765.
  19. Van Cutsem E, Lang I, D'haens G, Moiseyenko V, Zaluski J, Folprecht G, Tejpar S, Kisker O, Stroh C, Rougier P. kras status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI with or without cetuximab: the CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 2008;26:Abstract 2.
  20. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, Wong TW, Huang X, Takimoto CH, Godwin AK, Tan BR, Krishnamurthi SS, Burris HA 3rd, Poplin EA, Hidalgo M, Baselga J, Clark EA, Mauro DJ. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007;25:3230-3237.
  21. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic

- colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5705-5712.
22. Sartore-Bianchi A, Martini M, Molinari F, Veronese S, Nichelatti M, Artale S, Di Nicolantonio F, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. PIK3CA mutations in colorectal cancer are associated with clinical resistance to EGFR-targeted monoclonal antibodies. *Cancer Res* 2009;69:1851-1857.
23. Tatsumi K, Mitani Y, Watanabe J, Takakura H, Hoshi K, Kawai Y, Kikuchi T, Kogo Y, Oguchi-Katayama A, Tomaru Y, Kanamori H, Baba M, Ishidao T, Usui K, Itoh M, Cizdziel PE, Lezhava A, Ueda M, Ichikawa Y, Endo I, Togo S, Shimada H, Hayashizaki Y. Rapid screening assay for KRAS mutations by the modified smart amplification process. *J Mol Diagn* 2008;10:520-526.
24. Mitani Y, Lezhava A, Kawai Y, Kikuchi T, Oguchi-Katayama A, Kogo Y, Itoh M, Miyagi T, Takakura H, Hoshi K, Kato C, Arakawa T, Shibata K, Fukui K, Masui R, Kuramitsu S, Kiyotani K, Chalk A, Tsunekawa K, Murakami M, Kamataki T, Oka T, Shimada H, Cizdziel PE, Hayashizaki Y. Rapid SNP diagnostics using asymmetric isothermal amplification and a new mismatch-suppression technology. *Nat Methods* 2007;4:257-262.



# 生物醫學

BIOMEDICINE JOURNAL