

利用分子診斷預測西妥昔單抗（Cetuximab） 在結腸直腸癌病患的治療效果

王輝明^{1,2}、蔣鋒帆¹、郭集慶³

¹台中榮民總醫院大腸直腸外科，台中，台灣

²社團法人台灣分子醫學會，台北，台灣

³光田醫療社團法人光田綜合醫院癌症中心腫瘤內科，台中，台灣

摘要

西妥昔單抗（Cetuximab; 商品名Erbix[®]爾必得舒）是一個拮抗細胞表皮生長因子受體（epidermal growth factor receptor; EGFR）的單株抗體標靶藥物，經臨床試驗證實對轉移的結腸直腸癌（colorectal cancer）病患具有顯著的療效，因此在2004年由美國食品藥物管理局（U.S. Food and Drug Administration; FDA）核准上市。由於西妥昔單抗是EGFR的抑制劑，因此在FDA的藥品標示中，規定只有當病患的腫瘤組織經過檢查確認為EGFR過量表現時，才可以使用西妥昔單抗治療；然而臨床使用西妥昔單抗治療後，只有22.9%的EGFR過量表現的轉移型結腸直腸癌病患具有療效，因此依據EGFR是否過量表現並不能適當評估西妥昔單抗治療效果。近年來的研究顯示，EGFR訊息傳遞路徑中的KRAS對於西妥昔單抗治療效果具有重要的影響，若是腫瘤細胞的kras發生突變，則會持續刺激細胞生長，此時使用西妥昔單抗抑制KRAS上游的EGFR，就無法達到抑制腫瘤細胞生長的效果。對於醫師及結腸直腸癌病患而言，現今已可透過分子診斷技術，檢測與西妥昔單抗治療相關的基因是否發生突變，根據檢測的結果可以預估西妥昔單抗治療的效果，因此可以協助醫師選擇適合的治療方式。（生醫 2009;2(3):238-249）

關鍵字：結腸直腸癌（colorectal cancer）、西妥昔單抗（Cetuximab）、表皮生長因子受體（EGFR）、*kras*突變（*kras* mutation）

前言

結腸直腸癌（colorectal cancer）是國人最常見的癌症之一，在衛生署統計資料中，更高居癌症死亡原因第三位¹。結腸直腸癌與生活方式、家族史和飲食習慣有關，是現代人的文明病，近

年來在台灣的盛行率不斷攀升。結腸直腸癌發生率雖高，但值得慶幸的是，很容易找到早期病灶。多數的結腸直腸癌是由息肉漸漸轉變而成，癌變時間約需5-10年，近年來已經證實經由內視鏡移除良性腺瘤可降低結腸直腸癌的發生率及死亡率²。約有20%的結腸直腸癌病患將會發生腫

通訊作者：郭集慶醫師

電話：886-4-2662-5111

傳真：886-4-2665-5050

地址：433台中縣沙鹿鎮沙田路117號

電子郵件：doctorkok@hotmail.com

2009年8月9日來稿；2009年8月20日修改；2009年8月21日同意刊登

瘤遠處轉移，而且一旦發生轉移，五年的存活率即低於10%³。結腸癌最優先考慮的治療方式是手術切除，之後合併化學治療（chemotherapy）或放射線治療（radiotherapy）；而直腸癌的術前化學治療與放射線治療則優於術後的輔佐性化學治療與放射線治療。對於發現腫瘤時已經轉移或是無法手術摘除的病患，則只有依賴化學治療為主的幾種治療方式²。結腸直腸癌的化學療法中，最主要、也是使用最久的為5-氟嘧啶（5-fluorouracil; 5-FU），近年來則發展出歐善利鉑（oxaliplatin）、伊立替康（irinotecan; CPT-11）及卡培他濱（capecitabine; 商品名Xeloda[®] 截瘤達）等藥物，並且與5-FU組合成不同的處方例如FOLFOX、FOLFIRI以及XELOX等，在臨床均具有不錯的療效⁴。儘管有這麼多的療法，仍然有許多病患在使用化療之後沒有療效。因此，亟需要發展新的藥物給予治療。幸而近年來，隨著分子醫學的快速發展，許多藥廠針對癌細胞的特性研發出只會攻擊癌細胞的藥物，這些藥物即稱為標靶藥物（targeted therapy），讓這些接受傳統化療失敗的病患，仍有一線生機。由於結腸直腸癌中，約65-70%的病患的腫瘤組織呈現表皮生長因子受體（epidermal growth factor receptor; EGFR）過量表現的情形，與正常細胞不同，因此EGFR成為可能發展專一性藥物治療的標靶⁵。

EGFR訊息傳遞路徑（signal transduction pathway）

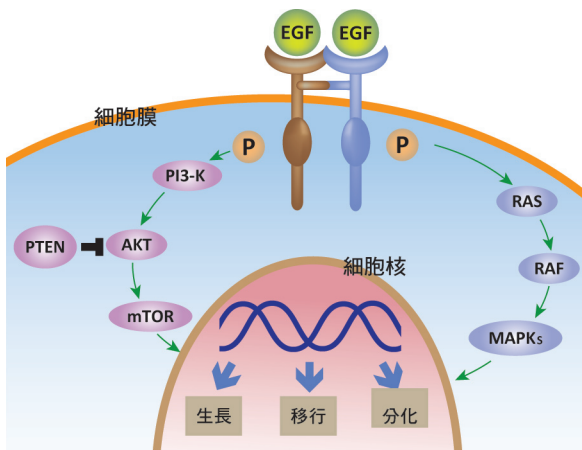
EGFR是人類表皮生長因子受體家族（human epidermal growth factor receptor family; HER family）的一員，這個家族有四個不同的穿膜受體酪胺酸激酶（transmembrane receptor tyrosine kinase）成員，分別為HER1（即EGFR）、HER2/neu、HER3及HER4。除了HER2尚未找到其配體（ligand），以及HER3沒有酪胺酸激酶的活性之外，每個HER都會與特定的配體結合並產生下游的訊息傳遞。這四個HER都是控制細胞生長

（proliferation）、分化（differentiation）及存活（survival）的重要調節者，在細胞中一共需要兩個步驟以活化HER的訊息傳遞：第一步是配體結合到受體上，使受體成對結合（dimerization）並活化酪胺酸激酶，第二步則是酪胺酸激酶將受體的細胞內區域磷酸化（phosphorylation），進而產生下游的訊息傳遞⁶。EGFR的下游訊息傳遞主要有兩個路徑，第一個路徑是透過一系列地磷酸化及活化RAS、RAF及有絲分裂活化蛋白質激酶（mitogen-activated protein kinases; MAPKs）等蛋白質傳遞訊息；第二個路徑則是透過磷脂酰肌醇-3激酶（phosphoinositide 3-kinase; PI3K）的活性，刺激下游的AKT並活化或抑制下游的其他蛋白質傳遞生長訊息。這兩個路徑最後都使細胞核中的轉錄因子（transcription factor）活化，促使調節細胞生長、移行（migration）及分化的蛋白質表現⁷（圖一）。

由於EGFR是控制細胞生長的蛋白質，當EGFR的訊息傳遞不受控制時，將會導致細胞不正常生長，甚至朝癌細胞的方向發展；而在結腸直腸癌病患的腫瘤組織中常可發現EGFR過量表現的現象，並且過量表現的程度與腫瘤惡化的情形相關⁸。因此，發展特殊的藥物以抑制EGFR的訊息傳遞，便成為治療結腸直腸癌一個可行的方向，西妥昔單抗（Cetuximab; 商品名Erbix[®] 爾必得舒）即是在這樣的觀念之下研發出來的標靶藥物。

西妥昔單抗

西妥昔單抗是美國食品藥物管理局（U.S. Food and Drug Administration; FDA）在2004年核准使用於治療結腸直腸癌的標靶藥物，這是一個拮抗EGFR的單株抗體，當它與EGFR結合之後，將會抑制EGFR與EGFR的配體如表皮生長因子（epidermal growth factor; EGF）結合，避免EGFR產生下游的訊息傳遞，因此可以抑制癌細胞的生長⁹。



圖一、表皮生長因子受體 (epidermal growth factor receptor; EGFR) 訊息傳遞路徑。

EGFR與其配體 (ligand) 如表皮生長因子 (epidermal growth factor; EGF) 結合後，將成對結合 (dimerization) 並活化酪胺酸激酶 (tyrosine kinase)，使EGFR的細胞內區域磷酸化 (phosphorylation)。磷酸化的EGFR可以透過兩個路徑傳遞訊息：第一個路徑是透過一系列地磷酸化及活化RAS、RAF及有絲分裂活化蛋白質激酶 (mitogen-activated protein kinases; MAPKs)，第二個路徑則是活化磷脂酰肌醇-3激酶 (phosphoinositide 3-kinase; PI3K)，刺激下游的AKT活化，並活化下游的哺乳動物雷帕黴素靶蛋白質 (mammalian target of rapamycin; mTOR)。EGFR透過這兩個路徑將訊息傳遞至細胞核內，促使調節細胞生長 (proliferation)、移行 (migration) 及分化 (differentiation) 的蛋白質表現，因此可以調控細胞生長。同源性磷酸酶-張力蛋白質 (phosphatase and tensin homolog; PTEN) 是PI3K訊息傳遞路徑的成員之一，透過抑制AKT的活性而抑制PI3K路徑的訊息傳遞，因此扮演腫瘤抑制的角色。(彩圖詳見本刊網頁)

Cunningham等人進行的第三期臨床試驗最早證實了西妥昔單抗對結腸直腸癌的療效，這個試驗收集329個伊立替康治療失敗且呈現EGFR過量表現的結腸直腸癌病患，並且隨機接受西妥昔單抗單方治療或是西妥昔單抗結合伊立替康的複方治療，結果顯示接受複方治療的病患的整體反應率 (overall response rate) 達到22.9%，比接受單方治療的病患高 (10.8%)；在疾病惡化時間

(time to disease progression) 方面，接受複方治療的病患 (4.1個月) 也比單方治療的病患長 (1.5個月)¹⁰。Saltz等人進行的第二期臨床試驗收集了57位病患，在西妥昔單抗治療之後的整體反應率為9%¹¹。西妥昔單抗除了可以有效治療傳統化療失敗的病患，在CO.17的臨床試驗中還發現接受西妥昔單抗治療的病患，其生活品質比未使用的病患更好¹²。由於伊立替康治療失敗的病患，在接受西妥昔單抗治療後有相當高的比率呈現治療有效，因此FDA在2004年發出核可，轉移型結腸直腸癌病患若是接受伊立替康治療失敗，並且屬於EGFR過量表現時，即可以接受西妥昔單抗結合伊立替康的複方療法；若是病患無法耐受伊立替康，則使用西妥昔單抗單方療法⁹。在國內，健保局已將西妥昔單抗納入健保給付項目當中，給付規定已經過兩次修訂；最新的給付規定於民國98年8月1日實施，必須是已接受過含5-FU、伊立替康及歐善利鉑二線以上之細胞毒性治療失敗，具有EGFR過量表現且*kras*基因沒有突變的轉移型結腸直腸癌病患才得以健保給付使用¹³。

雖然在臨床試驗中顯示西妥昔單抗對化療失敗的病患可以產生良好的治療效果，但是最佳的反應率僅有22.9%，說明有某些尚未明瞭的因素會影響西妥昔單抗治療的效果，由於分子醫學的快速進步，近年來的研究逐漸幫助醫學界找到可能影響西妥昔單抗治療效果的細胞分子。

影響西妥昔單抗治療效果的分子標記

EGFR表現量

由於西妥昔單抗是針對EGFR的標靶藥物，因此健保局及FDA均規定，病人的腫瘤組織必須經過檢查確認為EGFR過量表現者才可以使用西妥昔單抗，目前FDA規定的檢查方式為使用免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry; IHC)^{9, 13}。

然而在Cunningham等人的研究中，EGFR過量表現的病患僅有22.9%治療有效¹⁰，Saltz等人的研究也僅有9%的EGFR過量表現的病患治療有效，並且EGFR表現量與治療效果沒有相關性¹¹。這兩個研究的結果與原本預期的完全有效仍有很大的差距，因此在這些研究發表後，一直有許多學者在討論EGFR過量表現是否真的可以篩選適合治療的病患^{14, 15}；除此之外，在Chung等人的研究中發現使用西妥昔單抗治療EGFR陰性的病患，整體反應率可達到25%¹⁶，而近幾年發表的研究也發現不能用EGFR表現量來預估病患接受西妥昔單抗治療的效果¹⁷⁻²⁰，因此綜合目前的研究，說明EGFR過量表現並非西妥昔單抗治療有效的必要條件。

西妥昔單抗既然設計為針對EGFR的標靶藥物，為何對EGFR過量表現的病患卻不能達到有效的治療呢？可能的原因有以下幾點：首先，用來分析EGFR表現量的抗體，其所辨認的EGFR抗原位（epitope）可能與西妥昔單抗不同，因此檢查為EGFR過量表現的腫瘤組織，其實無法受到西妥昔單抗的抑制¹⁵。其次，目前均是由福馬林固定包埋的蠟塊組織（formalin-fixed paraffin-embedded tissue block）中取得切片進行EGFR表現量檢查，然而由Atkins等人的研究發現，固定組織時選擇的溶液與蠟塊保存的時間都會影響免疫組織化學染色法的品質與定量結果²¹，在FDA核可的EGFR表現量檢驗套組（Dako EGFR pharmDx™ kit）的說明書中，也特別指出使用中性福馬林溶液固定的組織才適合使用該套組檢驗EGFR表現量²²。第三，檢查EGFR表現量時，通常都是取原位腫瘤的組織進行分析，然而當腫瘤組織轉移至其他器官之後，其EGFR表現量可能與原位腫瘤不同，因此影響西妥昔單抗治療的效果²³。

由於EGFR表現量並非篩選適合西妥昔單抗治療病患的適當標記，近幾年的研究開始尋找更適合用來預估西妥昔單抗治療效果的分子標記。

EGFR基因複本數 (EGFR gene copy

number)

使用免疫組織化學染色法檢查EGFR表現量會受到許多因素影響，導致檢查結果不正確，也不能準確的預估病患接受西妥昔單抗治療的效果，因此需要找尋其他的分子標記來準確分析EGFR表現量，才能進一步預估病患接受西妥昔單抗治療的效果。一般認為DNA比蛋白質穩定，並且腫瘤組織中也經常發現EGFR基因複本數增加的現象，所以EGFR基因複本數可能是可用以協助預估治療效果的分子標記²⁴。Moroni等人使用螢光原位雜交法（fluorescent *in situ* hybridization; FISH）分析EGFR基因複本數與結腸直腸癌病患接受西妥昔單抗治療效果的相關性，結果在9個治療有效的病患中，有8位呈現EGFR基因複本數增加，而21位治療無效的病患中，只有1位呈現EGFR基因複本數增加¹⁷；Lièvre等人採用顯色原位雜交法（chromogenic *in situ* hybridization; CISH）分析EGFR基因複本數，也發現EGFR基因複本數增加的病患具有較好的整體反應率²⁵。雖然還有其他研究結果支持EGFR基因複本數可能是預估治療效果的分子標記^{18, 26, 27}，然而近年來發表的研究也發現EGFR基因複本數增加的病患並不一定有好的西妥昔單抗治療效果^{19, 20, 28}，因此仍需要更多研究釐清EGFR基因複本數與西妥昔單抗療效的關係。

EGFR突變

在非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer; NSCLC）中常可發現EGFR突變，並且這些突變與NSCLC病患接受小分子酪胺酸激酶抑制劑（tyrosine kinase inhibitors; TKI）的治療效果有關²³。基於肺癌的觀察，有些研究者即探討是否可以利用檢測EGFR突變篩選適合接受西妥昔單抗治療的結腸直腸癌病患。Moroni等人分析31位結腸直腸癌病患，僅發現1個病患具有EGFR突變，並且這個病患在西妥昔單抗治療後病情穩定（stable disease）¹⁷；Khambata-Ford等人分析80位結腸直

腸癌病患的EGFR則沒有發現任何突變²⁸；在11個結腸直腸癌細胞株中也沒有發現EGFR突變²⁹；Barber等人分析293位病患後，也只發現1位病患具有EGFR突變³⁰。這些結果說明在結腸直腸癌病患中，EGFR的激酶活性區域很少發生突變，同時也說明結腸直腸癌和肺癌之致病機轉不同，結腸直腸癌病患並不適合接受小分子酪胺酸激酶抑制劑的治療³¹。

EGFR多型性

EGFR突變在結腸直腸癌中非常少見，然而過去的研究都著重在分析EGFR的酪胺酸激酶區域是否有突變，由於EGFR的膜外區域（extracellular domain）是與西妥昔單抗結合的區域，在這個區域發生的任何變異都可能影響西妥昔單抗與EGFR結合的能力，也會影響西妥昔單抗治療的效果，因此Gonçalves等人分析32位接受西妥昔單抗治療病患的EGFR基因，結果沒有發現任何突變，但是發現12位病患（37%）具有外顯子13（exon 13）的一個基因多型性，這個基因多型性為DNA序列中的G變為A，導致第521個胺基酸的天門冬醯胺（asparagine）轉變成賴氨酸（lysine），稱為R521K。具有R521K基因多型性的病患的疾病控制率（disease control rate）為92%，並且無病存活期（progression-free survival）及整體存活期（overall survival）均顯著地比具有野生型EGFR的病患好。這個研究的結果說明EGFR的R521K基因多型性可能可以成為西妥昔單抗治療效果的分子標記，然而由於研究的病患數較少，這個發現仍需要經由大規模的臨床試驗驗證²⁶。

kras突變（kras mutation）

KRAS是EGFR訊息傳遞路徑下游的蛋白質，在許多癌症的腫瘤組織中均可發現kras突變。由於kras突變導致KRAS不受控制的持續活化，因此導致癌細胞的生長不受控制而過量增生。在這種情

況下，使用如西妥昔單抗類的EGFR抑制劑去抑制上游的EGFR，並不能抑制細胞的生長，結果導致西妥昔單抗的治療失敗。Lièvre等人的研究最早發現kras突變會導致西妥昔單抗治療失敗，在30個轉移型結腸直腸癌病患中，有11位病患接受西妥昔單抗治療有效，這些病患的腫瘤組織都沒有發現kras突變；而在其他19位西妥昔單抗治療無效的病患中，則有13位（68.4%）的腫瘤組織發現kras突變。kras正常的病患的整體存活期為16.3個月，也顯著地比kras突變的病患長（6.9個月）²⁵。近幾年的研究收集更多病患並分析kras突變與西妥昔單抗療效的相關性，這些研究也都證實帶有kras突變的病患，接受西妥昔單抗治療的效果不如kras正常的病患³²⁻³⁵。除此之外，Bokemeyer等人的臨床試驗還發現kras突變的患者，使用一般化療治療的效果，反而比接受含有西妥昔單抗的療程更好³⁶。由於目前已經累積非常多的證據說明kras突變的病患對西妥昔單抗治療無效，因此在國際間已經形成共識，對於將要接受西妥昔單抗治療的結腸直腸癌病患，應該先檢測其腫瘤組織是否有kras突變，以篩選治療效果較好的病患³⁷。在國內，健保局也已經更新了西妥昔單抗的給付規定，自民國98年8月1日起，病患必須具有EGFR表現型且kras沒有突變，才可以由健保給付使用西妥昔單抗¹³。

kras突變雖然可以篩選治療無效的病患，但是kras正常的結腸直腸癌病患接受西妥昔單抗治療的效果仍未達到完全有效，因此可能仍有其他因素影響病患接受西妥昔單抗治療的效果，許多研究也分析其他的可能影響西妥昔單抗療效的分子標記。

braf突變

BRAF也是EGFR下游訊息傳遞路徑RAS-RAF-MAPK的成員之一。和KRAS的情形相似，如果braf發生突變，將會導致BRAF持續活化，產生刺激細胞生長的訊號，使細胞生長失去控制，此時使用

西妥昔單抗抑制EGFR可能就無法抑制細胞生長，因此**braf**突變的病患接受西妥昔單抗治療就有可能失敗。在結腸直腸癌病患中，**braf**發生突變的比例約為0-14%，比**kras**發生突變的比例低^{25, 28, 38}。Di Nicolantonio等人分析79位結腸直腸癌病患的**braf**，發現11位病患具有**braf**突變（14%），這些病患都對EGFR抑制劑的治療無效，同時治療有效的病患都不具有**braf**突變，因此說明**braf**突變可能會導致西妥昔單抗治療失敗³⁹；Cappuzzo等人的研究也發現具有**braf**突變的病患接受西妥昔單抗治療無效，而且疾病惡化時間和整體存活期都比**braf**正常的病患短⁴⁰；然而也有其他研究發現**braf**突變並不影響病患接受西妥昔單抗治療的效果^{17, 20, 41}。雖然目前的研究結果無法對**braf**突變與西妥昔單抗治療效果的關係做出明確的結論，許多研究者仍認為應該將**braf**突變作為篩選病患接受西妥昔單抗治療的條件⁴²。

kras突變與**braf**突變都能刺激細胞持續生長，然而研究中很少發現這兩個突變同時發生在腫瘤組織中^{39,41}，這個現象稱為互不重複（mutually exclusive），也就是在同一個細胞中，不會同時發生**kras**突變與**braf**突變。由於在腫瘤形成的過程中，只要發生**kras**突變或**braf**突變其中之一就可以導致細胞持續生長，而兩個基因都突變可能反而不利於細胞存活，因此在腫瘤組織中很少同時發現**kras**突變與**braf**突變。

PIK3CA突變

PI3K是EGFR蛋白質下游訊息傳遞的路徑之一，活化PI3K的訊息傳遞將會促進細胞生長。當PI3K訊息傳遞路徑中的蛋白質發生變異時，細胞就會持續接收到生長的訊號，導致生長不受控制⁴³，在這種情形下使用EGFR抑制劑如西妥昔單抗時，就不會有良好的治療效果。PI3K含有一個具催化功能的次單元（subunit）p110，是**PIK3CA**基因的產物，當**PIK3CA**發生突變時，PI3K就會持續活化下游刺激細胞生長的訊息。在結腸直腸

癌中，有11-18%的病患腫瘤組織具有**PIK3CA**突變^{44, 45}，因此許多研究即分析**PIK3CA**突變是否會影響西妥昔單抗治療的效果。Sartore-Bianchi等人的研究分析110位接受EGFR抑制劑治療的結腸直腸癌病患，其中14%具有**PIK3CA**突變。結果顯示在**PIK3CA**突變的病患中，沒有病患達到良好的腫瘤反應；而**PIK3CA**正常的病患的整體反應率則有23%，這些病患同時也有較好的無病存活期，這個研究的結果支持**PIK3CA**突變會影響西妥昔單抗治療效果的假設⁴⁶。Souglakos等人的研究也發現**PIK3CA**突變的病患具有較差的無病存活期⁴⁷。然而，另外兩篇研究分別分析85位及200位結腸直腸癌病患，則發現**PIK3CA**突變並不影響西妥昔單抗治療的效果^{40, 48}。由於**PIK3CA**突變與西妥昔單抗治療效果的關係是最近才開始重視的研究方向，因此仍需要更多研究以確定**PIK3CA**突變對西妥昔單抗治療效果的影響。

PTEN活性的喪失

磷酸酶與張力蛋白同源基因（phosphatase and tension homolog; PTEN）是PI3K訊息傳遞路徑的成員之一，負責抑制PI3K路徑的訊息傳遞，因此扮演腫瘤抑制的角色³¹。當細胞失去正常的PTEN活性時，將會導致PI3K訊息傳遞路徑持續活化，使細胞生長失去控制而往癌化的方向發展，此時使用西妥昔單抗抑制上游的EGFR，就無法達到良好的治療效果⁴³。在轉移型的結腸直腸癌之中，約10-40%的病患腫瘤組織失去PTEN活性，Frattini等人的研究結果顯示PTEN正常的結腸直腸癌病患中，有62.5%達到良好的腫瘤反應，而失去PTEN活性的病患中，則沒有病患可以達到良好的腫瘤反應¹⁸。近幾年的研究也發現類似的結果，只是PTEN正常病患的整體反應率降低至30%左右^{19, 46, 49}。這些結果說明檢測PTEN活性可能可以協助篩選適合接受西妥昔單抗治療的病患。除了PTEN活性之外，也有研究分析**PTEN**突變與**PTEN**基因複本數對西妥昔單抗治療的影響，結果發現**PTEN**突變及**PTEN**基因複本數減少都會導致西妥昔單抗治療

效果較差^{19, 20}，若是有更多研究證實上述的結果，則*PTEN*突變與*PTEN*基因複本數也可能成為協助篩選病患的重要條件。

TP53突變

*TP53*基因是迄今發現與人類腫瘤相關性最高的基因，50%以上的人類腫瘤中可以發現*TP53*突變。正常的*TP53*是一種抑癌基因，其產物p53蛋白質具有抑制細胞生長及修補細胞內斷裂或損壞的DNA的功能。p53會因為許多原因失去活性，例如*TP53*發生突變；或是由其他蛋白質與p53結合並抑制其功能。當p53失去正常的活性之後，對腫瘤的形成有重要的作用⁵⁰。在NSCLC病患的研究中，指出只有在p53被抑制的情形下，活化的致癌基因才能導致細胞往癌化的方向發展⁵¹。Oden-Gangloff等人分析64個接受西妥昔單抗治療的結腸直腸癌病患腫瘤組織中的*TP53*是否具有突變，結果發現64%的病患具有*TP53*突變，並且這些病患接受西妥昔單抗治療後的疾病控制率（74%）與疾病惡化時間（20週）都顯著地比*TP53*正常的病患好（48%與12週）；進一步的分析則發現，將範圍縮小到46個具有*kras*突變的病患時，具有*TP53*突變的病患仍舊有較好的疾病控制率（78%，*TP53*正常者36%）；在*kras*正常的病患中，則發現具有*TP53*突變的病患具有較長的疾病惡化時間（20週，*TP53*正常者12週）⁵²。這些結果提供了初步的證據，支持*TP53*突變是西妥昔單抗治療是否有效的分子標記之一，然而這個假說仍需要更大規模的臨床試驗證實。

綜合數個分子標記的預估能力

多數的研究僅分析某個基因的變異與西妥昔單抗治療的關係，然而即使是*kras*正常的病患中，仍只有部份病患在西妥昔單抗治療後有效，說明僅依據一個基因的變異並不足以篩選出最適合西妥昔單抗治療的病患，應該要綜合更多分子標記

才能準確預測病患的治療效果。有些研究因此合併分析數個不同的分子標記與西妥昔單抗治療的關係。Frattini等人的研究中，西妥昔單抗治療有效的病患共有10位，其中9位病患都是*kras*正常，*PTEN*表現正常，並且具有*EGFR*基因複本數增加¹⁸；Loupakis等人的研究則是發現*kras*正常且*PTEN*正常的病患中，有47%治療有效⁴⁹；Cappuzzo等人也發現*EGFR*基因複本數增加且*kras*沒有突變的病患中，有47.7%對西妥昔單抗治療有效⁴⁰；Di Nicolantonio也發現*kras*正常的病患中有28%治療有效，若是*kras*及*braf*都正常的病患，則治療有效的比例提高至32%³⁹。

除了分子標記之外，早期的研究發現病患接受西妥昔單抗治療時發生的毒性反應，可以預測治療的效果¹¹。Lenz等人分析346位病患接受西妥昔單抗之後的毒性反應，發現有4.9%的病患產生第三級的痤瘡型皮膚疹（acneiform rash），並且皮膚疹的嚴重程度與西妥昔單抗治療效果呈現正相關⁵³；Lièvre等人的研究也發現產生二至三級皮膚疹的病患具有較好的療效與整體存活期，他們也發現*kras*正常且發生皮膚疹的病患，整體存活期的中位數為15.6個月，顯著地比僅有皮膚疹或*kras*正常的病患（10.7個月）和*kras*突變且沒有皮膚疹的病患（5.6個月）都長⁵⁴。

也有研究利用微陣列（microarray）分析腫瘤組織中不同基因的表現量，並結合*kras*突變，以預估病患的治療效果，例如Balko等人發展出基因表現量預測治療效果模型（gene expression predictor of response; GEPR），利用26個基因的微陣列分析*kras*正常的病患，可以有效從其中再區分治療有效和治療無效的病患⁵⁵。

雖然*kras*突變已經是預估西妥昔單抗治療效果的指標之一，然而由於*kras*正常的病患中，仍有很高比例治療無效，因此如同上述的這些研究，未來的趨勢將是開發一個包含數個分子標記的預測模型，以協助篩選適合接受西妥昔單抗治療的病

患。

kras突變檢測的技術問題

目前並沒有FDA核可的*kras*突變檢測技術或是套組⁵⁶，因此每個實驗室檢測*kras*突變的方法並不統一。在所有研究中，仍以直接定序法（direct sequencing）為主要的檢測方法，並且也是長久以來公認的標準方法，直接定序法的缺點是敏感度較低，突變序列DNA的含量必須佔25%以上才能測出⁵⁷。Marchetti等人比較使用突變增強定序法（mutation-enriched sequencing）與直接定序法分析90位結腸直腸癌病患，結果直接定序法發現40%的病患有*kras*突變，而突變增強定序法發現55%的病患有*kras*突變，因此以直接定序法分析*kras*突變時，可能會遺漏某些具有突變的病患⁵⁸。除了直接定序法以外，其他常用的*kras*突變檢測方法包括限制片段長度多型性（restriction fragment length polymorphism; RFLP）、高解析度溶解曲線分析法（high resolution melting analysis; HRMA）及擴增受阻突變系統（amplification refractory mutation system; ARMS）⁵⁷。然而，以上所提的非直接定序方法，都有專一性不好的缺點，其檢測結果通常仍需要與直接定序法比較。因此，目前仍需要建立一個敏感性高並且專一性良好的*kras*突變檢測方法⁵⁹。

有些研究發現結腸直腸癌病患的原位腫瘤與轉移到遠處的轉移腫瘤內的*kras*突變可能會不相同，因此建議應檢測轉移腫瘤的*kras*⁶⁰⁻⁶²，然而目前為止的研究中，大部分均發現90%以上的病患的原位腫瘤與轉移腫瘤的*kras*突變相同⁶³⁻⁶⁵，因此依目前的研究結果來看，檢查突變時，僅需檢查原位腫瘤或轉移腫瘤其中之一即可。

*kras*突變的研究大多分析*kras*的第12個及第13個胺基酸的序列是否突變，然而*kras*第61個胺基酸也是常發現突變的位置，並且細胞中還有HRAS及NRAS兩種RAS蛋白質，Albitar等人即分析結腸

直腸癌病患的*kras*、*hras*及*nras*的第12、13及61個胺基酸的突變，結果顯示若是只檢測*kras*的第12及13個胺基酸的變異，將會遺漏11%的*ras*突變，由於他們的研究中沒有發現*hras*突變，因此建議應該檢測*kras*和*nras*的第12、13及61個胺基酸的突變⁶⁶。De Rooock等人的研究也發現有5% *kras*正常的病患具有*nras*突變⁴²。由這些研究的結果，說明若要用*kras*突變來預估西妥昔單抗治療效果時，其實應該包含*kras*及*nras*，並且檢測這兩個基因的第12、13及第61個胺基酸的序列。

結論

Schrag曾經計算西妥昔單抗治療的成本效益，結果發現一個西妥昔單抗療程的花費比第二線化療至少高2-3倍，卻僅能增加病患1.7個月的壽命，使得臨床醫師常常對於是否建議病患使用西妥昔單抗治療陷入兩難⁶⁷。因此，篩選真正適合西妥昔單抗治療的病患，對病患本身及社會福利體系都是重要的課題。在許多大型臨床試驗中已經發現病患具有*kras*突變將導致西妥昔單抗治療失敗³³⁻³⁶，因此最近美國臨床腫瘤學會（American Society of Clinical Oncology; ASCO）發表了臨時臨床意見（provisional clinical opinion），建議臨床醫師在使用西妥昔單抗治療之前先檢測病患的*kras*基因型，若是在第12或13個胺基酸發現突變，則病患就不應該接受西妥昔單抗治療。由於目前沒有FDA核可的檢測方法，ASCO建議醫師應委託符合美國臨床實驗室改善修正法（clinical laboratory improvement amendments; CLIA）認證的實驗室執行*kras*檢測，以確保檢測結果正確性³⁷。ASCO並建議醫師參考美國病理醫師學會（College of American Pathologists; CAP）的指引提供臨床檢體，才能避免不良檢體影響檢測結果^{37, 68}。在國內，健保局也規定自民國98年8月1日起，病患必須具有EGFR表現型且*kras*沒有突變，才可以由健保給付使用西妥昔單抗¹³。由於在新的給付規定中並沒有指定*kras*突變的檢測方法，並且一般醫院的檢驗科並無能力執行*kras*檢測，臨床醫師

應委託通過CAP、ISO15189或ISO17025等認證的專業實驗室執行檢測，才能確保檢測結果正確，減少引起醫病糾紛的機會。國內獲得ISO15189或ISO17025認證的實驗室已由財團法人全國認證基金會（Taiwan Accreditation Foundation; TAF）建立名冊，在其中檢索可發現目前全國僅有一家實驗室取得*kras*突變檢測技術認證⁶⁹。

*kras*突變除了常見的第12及13個胺基酸之外，還有第61個胺基酸也是常見突變的位置，研究並發現結腸直腸癌病患的*nras*在這三個位置也常發生突變，雖然健保局的給付規定中並未明確規範應該檢測*kras*的哪些位置，臨床醫師仍應與執行檢測的實驗室溝通，盡可能檢測這2個基因的3個常見突變位置，以確保檢測結果能協助醫師篩選最適合接受治療的病患。

許多研究已經發現EGFR表現量無法預估西妥昔單抗治療的效果¹⁷⁻²⁰，並且也有研究發現EGFR陰性的病患接受西妥昔單抗治療有效¹⁶，因此是否應該停止以EGFR表現量篩選接受西妥昔單抗治療的病患，便是一個值得討論的課題；美國國家癌症資訊網（National Comprehensive Cancer Network; NCCN）的腫瘤學臨床執業執引（Clinical practice guidelines in oncology）中，已註明EGFR檢查沒有預估療效的價值，臨床上不應該依據EGFR檢查的結果決定病患是否接受使用西妥昔單抗治療⁷⁰。雖然目前FDA與健保局的規定仍以EGFR表現量為第一選擇的分子標記，若有更多研究發現EGFR陰性的病患接受西妥昔單抗治療有效，則有可能改變目前的規範，讓可能治療有效的病患也能接受西妥昔單抗治療。

除了*kras*突變之外，還有許多分子標記也可能影響西妥昔單抗治療的效果，例如*braf*突變、*EGFR*基因複本數增加及PTEN活性的喪失等，這些標記還可以從*kras*正常的病患中，再區分出治療有效與無效的病患，因此在預估治療效果中也扮演重要的角色，加上早期研究發現用藥治療的副作

用皮膚疹也能預估病患治療的效果，若能利用大型的臨床試驗進行研究，將這些標記結合成一個預測模型，將是協助臨床醫師治療結腸直腸癌病患非常有用的工具。

引用文獻

1. Department of Health, Executive Yuan, R.O.C (Taiwan); http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_2.aspx?now_fod_list_no=10387&class_no=440&level_no=4 (accessed July 27, 2009)
2. National Health Research Institutes, Cancer consensus manual: consensus of colorectal cancer diagnosis and treatment, 1998, http://www.nhri.org.tw/NHRI_ADM/userfiles/file/tcog/colon.pdf (accessed July 27, 2009)
3. Wolpin BM, Meyerhardt JA, Mamon HJ, Mayer RJ. Adjuvant treatment of colorectal cancer. *CA Cancer J Clin.* 2007;57:168-185.
4. Saltz L. Colorectal Cancer Treatment: What's Next? (or: Is There Life After EGFR and VEGF?). *Gastrointest Cancer Res.* 2008;2:S20-S22.
5. Overman MJ, Hoff PM. EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2007;50:1259-1270.
6. Capdevila J, Elez E, Macarulla T, Ramos FJ, Ruiz-Echarri M, Tabernero J. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2009;35:354-363.
7. Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: anti-epidermal growth factor receptor agents. *J Clin Oncol.* 2007;25:4057-4065.
8. Galizia G, Lieto E, De Vita F, Orditura M, Castellano P, Troiani T, Imperatore V, Ciardiello F. Cetuximab, a chimeric human mouse anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, in the treatment of human colorectal cancer. *Oncogene.* 2007;26:3654-3660.
9. Food and Drug Administration. Label for Erbitux. http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2004/125084lbl.pdf (accessed July 23 2009)
10. 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.
11. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, Needle MN, Kopit J, Mayer RJ. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol.* 2004;22:1201-1208.
12. Au HJ, Karapetis CS, O'Callaghan CJ, Tu D, Moore MJ,

- Zalberg JR, Kennecke H, Shapiro JD, Koski S, Pavlakis N, Charpentier D, Wyld D, Jefford M, Knight GJ, Magoski NM, Brundage MD, Jonker DJ. Health-related quality of life in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab: overall and KRAS-specific results of the NCIC CTG and AGITG CO.17 Trial. *J Clin Oncol*. 2009;27:1822-1828.
13. Bureau of National Health Insurance, Department of Health, Executive Yuan, R.O.C (Taiwan). http://www.nhi.gov.tw/information/bulletin_file/2633_0980040842-1.pdf (accessed July 23, 2009)
 14. Ellis LM, Hoff PM. Targeting the epidermal growth factor receptor: an important incremental step in the battle against colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22:1177-1179.
 15. Erlichman C, Sargent DJ. New treatment options for colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;351:391-392.
 16. 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.
 17. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2005;6:279-286.
 18. Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2007;97:1139-1145.
 19. Razis E, Briasoulis E, Vrettou E, Skarlos DV, Papamichael D, Kostopoulos I, Samantas E, Xanthakis I, Bobos M, Galanidi E, Bai M, Gikonti I, Koukouma A, Kafiri G, Papakostas P, Kalogeras KT, Kosmidis P, Fountzilas G. Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer: an exploratory study. *BMC Cancer*. 2008;8:234.
 20. Perrone F, Lampis A, Orsenigo M, Di Bartolomeo M, Gevorgyan A, Losa M, Frattini M, Riva C, Andreola S, Bajetta E, Bertario L, Leo E, Pierotti MA, Pilotti S. PI3KCA/PTEN deregulation contributes to impaired responses to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2009;20:84-90.
 21. Atkins D, Reiffen KA, Tegtmeier CL, Winther H, Bonato MS, Störkel S. Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2004;52:893-901.
 22. Dako corporation. EGFR pharmDx™ Interpretation Manual. Available at pri.dako.com/08052_egfr_pharmdx_interpretation_manual.pdf (Accessed July 23, 2009)
 23. Ng K, Zhu AX. Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;65:8-20.
 24. Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, Akram M, Chung KY, Yao D, Paty PB, Gerald W, Chen B. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol*. 2005;18:1350-1356.
 25. Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Côté JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006;66:3992-3995.
 26. Gonçalves A, Esteyries S, Taylor-Smedra B, Lagarde A, Ayadi M, Monges G, Bertucci F, Esterni B, Delpero JR, Turrini O, Lelong B, Viens P, Borg JP, Birnbaum D, Olschwang S, Viret F. A polymorphism of EGFR extracellular domain is associated with progression free-survival in metastatic colorectal cancer patients receiving cetuximab-based treatment. *BMC Cancer*. 2008;8:169.
 27. Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, De Hertogh G, De Schutter J, Biesmans B, De Roock W, Capoen A, Debiec-Rychter M, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clin Cancer Res*. 2008;14:5869-5876.
 28. 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.
 29. Nagahara H, Mimori K, Ohta M, Utsunomiya T, Inoue H, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, Mori M. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1368-1371.
 30. Barber TD, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *N Engl J Med*. 2004;351:2883.
 31. Spano JP, Milano G, Vignot S, Khayat D. Potential predictive markers of response to EGFR-targeted therapies in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66:21-30.

32. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboué R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillet 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.
33. 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, Zalberg JR. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:1757-1765.
34. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, van Groeningen CJ, Sinnige HA, Richel DJ, Voest EE, Dijkstra JR, Vink-Börger ME, Antonini NF, Mol L, van Krieken JH, Dalesio O, Punt CJ. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:563-572.
35. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:1408-1417.
36. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zubel A, Koralewski P. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:663-671.
37. Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol*. 2009;27:2091-2096.
38. Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, Preto A, Domingo E, Capelinha AF, Duval A, Hamelin R, Machado JC, Schwartz S Jr, Carneiro F, Seruca R. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene*. 2007;26:158-163.
39. 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.
40. Cappuzzo F, Varella-Garcia M, Finocchiaro G, Skokan M, Gajapathy S, Carnaghi C, Rimassa L, Rossi E, Ligorio C, Di Tommaso L, Holmes AJ, Toschi L, Tallini G, Destro A, Roncalli M, Santoro A, Jänne PA. Primary resistance to cetuximab therapy in EGFR FISH-positive colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2008;99:83-89.
41. 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.
42. De Roock W, Lambrechts D, Tejpar S. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360:834.
43. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S, Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev*. 2009;35:262-271.
44. Kato S, Iida S, Higuchi T, Ishikawa T, Takagi Y, Yasuno M, Enomoto M, Uetake H, Sugihara K. PIK3CA mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2007;121:1771-1778.
45. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM, Lièvre A, Cortet M, Bouvier AM, Rat P, Roignot P, Faivre J, Laurent-Puig P, Piard F. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer*. 2008;122:2255-2259.
46. 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.
47. Souglakos J, Phillips J, Wang R, Marwah S, Silver M, Tzardi M, Silver J, Ogino S, Hooshmand S, Kwak E, Freed E, Meyerhardt JA, Saridaki Z, Georgoulas V, Finkelstein D, Fuchs CS, Kulke MH, Shivdasani RA. Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;101:465-472.
48. Prenen H, De Schutter J, Jacobs B, De Roock W, Biesmans B, Claes B, Lambrechts D, Van Cutsem E, Tejpar S. PIK3CA mutations are not a major determinant of resistance to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3184-3188.
49. Loupakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D, Masi G, Graziano F, Cremolini C, Rulli E, Canestrari E, Funel N, Schiavon G, Petrini I, Magnani M, Tonini G, Campani D, Floriani I, Cascinu S, Falcone

- A. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27:2622-2629.
50. Zlobec I, Lugli A. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Postgrad Med J.* 2008;84:403-411.
 51. Mounawar M, Mukeria A, Le Calvez F, Hung RJ, Renard H, Cortot A, Bollart C, Zaridze D, Brennan P, Boffetta P, Brambilla E, Hainaut P. Patterns of EGFR, HER2, TP53, and KRAS mutations of p14arf expression in non-small cell lung cancers in relation to smoking history. *Cancer Res.* 2007;67:5667-5672.
 52. Oden-Gangloff A, Di Fiore F, Bibeau F, Lamy A, Bougeard G, Charbonnier F, Blanchard F, Tougeron D, Ychou M, Boissière F, Le Pessot F, Sabourin JC, Tuech JJ, Michel P, Frebourg T. TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy. *Br J Cancer.* 2009;100:1330-1335.
 53. Lenz HJ, Van Cutsem E, Khambata-Ford S, Mayer RJ, Gold P, Stella P, Mirtsching B, Cohn AL, Pippas AW, Azarnia N, Tsuchihashi Z, Mauro DJ, Rowinsky EK. Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J Clin Oncol.* 2006;24:4914-4921.
 54. 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.
 55. Balko JM, Black EP. A gene expression predictor of response to EGFR-targeted therapy stratifies progression-free survival to cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:145.
 56. Messersmith WA, Ahnen DJ. Targeting EGFR in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008;359:1834-1836.
 57. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG. KRAS Mutations and Susceptibility to Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer. *Cancer J.* 2009;15:110-113.
 58. Marchetti A, Gasparini G. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:833-834.
 59. Dempke WC, Heinemann V. Resistance to EGF-R (erbB-1) and VEGF-R modulating agents. *Eur J Cancer.* 2009;45:1117-1128.
 60. Velho S, Oliveira C, Seruca R. KRAS mutations and anti-epidermal growth factor receptor therapy in colorectal cancer with lymph node metastases. *J Clin Oncol.* 2009;27:158-159.
 61. Tórtola S, Steinert R, Hantschick M, Peinado MA, Gastinger I, Stosiek P, Lippert H, Schlegel W, Reymond MA. Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19:2837-2843.
 62. Molinari F, Martin V, Saletti P, De Dosso S, Spitale A, Camponovo A, Bordoni A, Crippa S, Mazzucchelli L, Frattini M. Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant. *Br J Cancer.* 2009;100:1087-1094.
 63. Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, Gambi V, Sarnataro CS, Gambacorta M, Lauricella C, Siena S. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:4217-4219.
 64. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist.* 2008;13:1270-1275.
 65. Gattenlohner S, Germer C, Muller-Hermelink HK. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:835.
 66. Albitar M, Yeh C, Ma W. K-ras mutations and cetuximab in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360:834.
 67. Schrag D. The price tag on progress-chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004;351:317-319.
 68. College of American Pathologists. Perspectives on Emerging Technology Report (POET). <http://www.cap.org/POET>. (accessed July 27, 2009)
 69. Taiwan Accreditation Foundation. http://service.taftw.org.tw/tafweb/CNLA/lab-directory_1.aspx. (accessed July 29 2009)
 70. National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology™: Colon cancer. Version 2. 2009. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp. (accessed July 27 2009)