

**TESIS  
DOCTORAL**



**NUEVAS TERAPIAS EN CÁNCER  
COLORRECTAL METASTÁSICO  
REFRACTARIO:  
PAPEL DE LOS FÁRMACOS  
QUE INTERFIEREN EN LA VÍA  
DE MET E INTEGRINAS**

**M<sup>a</sup> Elena Élez Fernández**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina  
2015

**NUEVAS TERAPIAS DIRIGIDAS EN CÁNCER  
COLORRECTAL METASTÁSICO:  
PAPEL DE LOS FÁRMACOS QUE INTERFIEREN  
EN LA VÍA DE MET E INTEGRINAS**

Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor en Medicina:  
María Elena Élez Fernández

Programa de Doctorado en Medicina

**Director de la Tesis**

Josep María Tabernero Caturla. Doctor en Medicina  
Departamento de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

**Tutor de la Tesis**

Albert Selva O'Callaghan. Doctor en Medicina  
Departamento de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

*A mis padres Félix y Teo por tantos años de duro trabajo.  
Por ellos he llegado hasta aquí.  
A mi marido Sebastián por su apoyo  
y respeto constantes desde el primer día.  
A mi hermano Félix y a Carmen por sus eternos buenos consejos.  
A mis sobrinas Adriana y Laura por su imaginación  
y gran capacidad para sorprenderme.  
A Leo por su incondicionalidad.  
A todos los pacientes que de forma desinteresada  
han participado en estos estudios y que son la razón principal  
por la que seguimos investigando.*

## AGRADECIMIENTOS

**S**on muchas las personas que han marcado la trayectoria que he seguido para llegar hasta aquí. Familia, amigos, compañeros, docentes y profesionales que de un modo u otro han influido en cada una de las decisiones que han acabado condicionando mi futuro profesional y científico. Sin embargo, no veo mejor forma para encabezar esta tesis doctoral que dedicándosela al mayor ejemplo de nobleza, tenacidad y perseverancia que he tenido durante todos estos años; mis padres. Sumo además la brillante inteligencia y genialidad de mi hermano Félix que seguro él mismo no sabe hasta qué punto me ha ayudado y que comparten Mamen, Adriana y Laura como no podía ser de otra manera. Le agradezco todo a Sebastián; el día a día, su apoyo constante, que entienda y respete mi trabajo y que me entienda a mi.

De mis primeros años de formación, me gustaría mencionar al Dr Francisco Franch que despertó en mi la curiosidad por la medicina, a Teresa Prat que me ayudó a tomar una decisión que hoy creo fue definitiva, a Mabeli y Maite que sin duda me ayudaron en mis primeros años académicos, a Julia por estar siempre ahí y a Marta porque no se me ocurre a nadie mejor para compartir 6 años de carrera.

Le quiero dar las gracias a Antonieta Salud porque adora esta especialidad y así lo ha transmitido a sus alumnos a lo largo de los años. Es un ejemplo de vocación y humanidad.

A todos los médicos adjuntos y residentes que han contribuido de algún modo en mis primeros años de formación profesional. Gracias a Toni Juan, Juan Ramon Perez Mas, Mercè Biosca e Isabela Díaz de Corcuera. Gracias a Berta Bernad Jordi Rodon que siempre serán mis Rs mayores. A mis Co-Rs Pili y Laura porque nos hemos reído mucho juntas y me han ayudado a ser el médico que soy hoy. A Ivan Castellví porque ha sido compañero y amigo desde el primer día.

A todos los adjuntos de l'Institut Català d'Oncologia Duran i Reynals que me formaron como residente de Oncología Médica, gracias en particular a Xavier Garcia del Muro, Ricard Mesia y Ramón Salazar por despertar en mi la curiosidad que creo tiene que ser la base que motiva la investigación.

A Ana Oaknin por conocerme, creer en mi y aconsejarme.

A Teresa Macarulla, Javier Ramos y Jaume Capdevila por ser compañeros y profesores. A María y Guillem por su motivación, entusiasmo, ayuda y amistad.

A Manolo, Cristina, Víctor, Tamara y Julieta por su ayuda en el día a día y porque todavía tenemos ganas de reírnos.

A María Herranz por la ayuda inestimable en el desarrollo de este trabajo y porque me encanta trabajar con ella.

A Albert Selva, porque sin él esta tesis no hubiera sido posible. Porque por médicos y profesores como él nos sigue gustando el arte de la medicina.

Quisiera agradecer por igual a los doctores Josep Baselga y Josep Tabernero su contribución al campo de la oncología no sólo desde un punto de vista científico e investigacional sino también humano ya que su capacidad de lucha y objetivo de cura en cada uno de nuestros pacientes es excepcional y nos han llevado hasta aquí.

A Josep Tabernero le quiero dar las gracias particularmente por darme esta oportunidad y por la confianza depositada en mi. Por haberme enseñado que se puede ser científico sin dejar de ser médico. Por su capacidad docente y haberme inculcado su tenacidad y rigurosidad sin agotar su paciencia. Per respondre sempre, gràcies.



# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIACIONES</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1. PREÁMBULO .....	10
1.2. ANTECEDENTES .....	11
1.2.1. Base molecular del cáncer colorrectal .....	11
1.2.1.1. Generalidades .....	11
1.2.1.2. Vía de señalización de WNT/APC/ $\beta$ -catenina .....	12
1.2.1.3. Vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico .....	14
1.2.1.3.1. Señalización mediada por RAS/RAF/MEK/MAPK .....	15
1.2.1.3.2. Señalización mediada por PI3K/AKT/MTOR .....	16
1.2.1.4. Vía de señalización de MET .....	17
1.2.1.5. Vía de señalización del factor de crecimiento transformante $\beta$ .....	18
1.2.1.6. Angiogénesis .....	19
1.2.1.6.1. Generalidades .....	19
1.2.1.6.2. Papel de las Integrinas .....	20
1.2.2. Tratamiento convencional del cáncer colorrectal .....	21
1.2.2.1. Papel de los quimioterápicos .....	21
1.2.2.2. Fármacos antiangiogénicos .....	21
1.2.2.3. Anticuerpos dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico .....	22
1.2.2.3.1. Papel de los anticuerpos dirigidos contra el recetor del factor de crecimiento epidérmico en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico .....	22
1.2.2.3.2. Factores de resistencia a terapias frente el factor de crecimiento epidérmico .....	23
1.2.3. Nuevas vías de investigación en cáncer colorrectal metastásico .....	27

<b>2. ARTÍCULOS DE TESIS</b> .....	29
2.1. ARTÍCULO DE TESIS I .....	29
2.1.1. A pharmacodynamic/pharmacokinetic study of ficlatuzumab in patients with advanced solid tumors and liver metastases .....	29
2.1.2. Conclusiones artículo del artículo de tesis I .....	43
2.2. ARTÍCULO DE TESIS II .....	45
2.2.1. Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial .....	45
2.2.2. Conclusiones artículo de tesis II .....	55
<b>3. DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	60
<b>5. REFERENCIAS</b> .....	62
<b>6. APÉNDICE: OTRAS PUBLICACIONES</b> .....	67
6.1. Publicaciones relacionadas con nuevas terapias dirigidas en cáncer colorrectal metastásico y biomarcadores pronósticos y de resistencia a tratamiento sistémico. ....	67
6.2. Publicaciones relacionadas con estudios fase I para tumores sólidos avanzados con fármacos que interfieren en el metabolismo epitelio-mesénquima. ....	136

## LISTA DE ABREVIACIONES

5-FU:	5-Fluorouracilo
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
AKT:	Proteína quinasa B
ALFA-V:	$\alpha v$
APC:	Adenomatous polyposis coli
ATP:	Adenosin trifosfato
CCR:	Cáncer colorrectal
CCRM:	Cáncer colorrectal metastásico
CMS:	Clinical molecular subtype
DSH:	Dishevelled
EGF:	Epidermal growth factor
EGFR:	Epidermal growth factor receptor
EMT:	Epithelial mesenchymal transition
ERK:	Quinasas reguladas por señalización extracelular
Ev:	Endovenoso
FISH:	Fluorescence in situ hybridation
FOXO3:	Forkhead box O3
FP:	Fluoropirimidina
GEPs:	Guanine Exchanging Factors
GTP:	Guanina trifosforiladas
HGF:	Factor de crecimiento de los hepatocitos
IMS:	Inestabilidad de microsatélites
IgG1:	Inmunoglobulina 1
Kg:	Kilogramos
LEF:	Potenciador del factor linfoideo
LV:	Leucovorin
MAPK:	Proteína quinasa activadora de mitógenos
Mg:	Miligramos
mTOR:	Mammalian target of rapamycin
NGS:	Next generation sequencing
PDK1:	Proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinosito
PI3K:	Fosfo-Inositol 3 quinasa
PIP3:	Fosfo-inositol trifosfato
PLGF:	Factor de crecimiento placentario
PTEN:	Fosfatasa homóloga del tensinógeno
RAS:	Rat Sarcoma
SG:	Supervivencia global
SLP:	Supervivencia libre de progresión
TCF:	Factor de células T
TGF:	Factor de crecimiento transformante
TR:	Tasa de respuesta
VEGF:	Vascular endotelial growth factor
VEGFR:	Vascular endotelial growth factor receptor
WIF:	Factor inhibidor de WNT
WT:	Wild type



# LISTA DE FIGURAS

**Figura 1**  
Alteraciones genéticas en la progresión  
del cáncer colorrectal

**Figura 2**  
Vía de señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina

**Figura 3**  
Receptores EGFR

**Figura 4**  
Principales vías de señalización celulares implicadas en la proliferación  
y progresión tumoral y su interacción

**Figura 5**  
Vía de señalización de Met

**Figura 6**  
Vía de señalización de VEGF

**Figura 7**  
Mecanismos moleculares de resistencia primaria  
y secundaria a terapias anti-EGFR

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PREÁMBULO

**E**l cáncer colorrectal (CCR) sigue constituyendo una de las primeras causas de muerte a nivel mundial(1). El mejor conocimiento de la biología tumoral de cada tipo de tumor específico ha sido crucial para el desarrollo e incorporación de nuevos fármacos biológicos en el tratamiento de esta entidad llegando a alcanzar una supervivencia global superior a 30 meses en enfermedad diseminada según datos presentados recientemente (2). Sin embargo, pese a todos estos progresos; la quimioterapia sigue siendo la base del tratamiento de esta enfermedad puesto que es la herramienta terapéutica que ha demostrado mayor eficacia. Sabemos que estos tumores presentan una alta tasa de respuesta a dicho tratamiento y tienen impacto en términos de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP); no obstante, esta eficacia se acaba perdiendo y la enfermedad adquiere resistencia al mismo. De este modo, el CCR ha sido uno de los primeros tumores sólidos en someterse a una clasificación desde un punto de vista molecular, dando lugar a extensas investigaciones que han puesto de manifiesto distintos genes y vías de señalización cruciales para el desarrollo y progresión de estos tumores así como la identificación de nuevas potenciales dianas terapéuticas y estrategias para revertir resistencia a tratamientos.

Así, los ensayos clínicos más recientes y los nuevos que se encuentran en vías de desarrollo, están incorporando los últimos avances científicos con el fin de pasar de una oncología basada exclusivamente en el tipo histológico para cada subtipo tumoral a una nueva práctica clínica fundamentada en la clasificación molecular.

Las terapias dirigidas deberían ser óptimas cuando se indiquen en un contexto molecular apropiado. Esto supondría un tipo de fármaco que interferiría en la función de una molécula previamente identificada en la célula tumoral pero no en las células integrantes del tejido sano. Esta diana, desempeñaría un papel fundamental en el crecimiento anormal y/o la capacidad de invasión y metástasis del tumor. La potencial especificidad que aportarían este tipo de fármacos conllevaría una mayor eficiencia terapéutica respecto la quimioterapia estándar y además evitaría una toxicidad innecesaria a aquellos pacientes que presumiblemente, no tuvieran potencial beneficio del tratamiento.

Por tanto, éste será un objetivo a perseguir en el desarrollo de nuevas terapias en el caso concreto del cáncer colorrectal metastásico (CRCm). En definitiva, posibilitará contribuir a validar posibles biomarcadores predictivos para terapias moleculares dirigidas, generar información valiosa en lo que se refiere a la biología tumoral y ganar eficacia en el potencial beneficio del tratamiento para el propio paciente.

Este proceso ha incrementado la complejidad de la investigación clínica en el sentido que, las dosis de administración y esquemas terapéuticos de cada uno de estos tratamientos; vendrá supeditada no sólo a su perfil de toxicidad y seguridad sino también a ciertos requisitos biológicos. Esto significa que es preciso alcanzar un equilibrio que nos permita administrar los tratamientos a una dosis y pauta que sea segura para el paciente pero que a su vez, logre nuestra intención terapéutica bloqueando la vía de señalización concreta que persigamos. Los estudios clínicos fase I son el marco idóneo para este objetivo ya que, paralelamente a los procedimientos realizados para testar distintos esquemas de tratamiento y dosis administradas de la terapia a estudio; se pueden asociar estudios de farmacodinámica en que se testa la diana biológica y respuesta en las células tumorales y/o sanas. La correlación de estos hallazgos con parámetros de farmacocinética, nos conducen a la interpretación de la dosis óptima de tratamiento.

A lo largo de esta memoria se tratará la situación actual del cáncer CCRm así como la justificación de la incorporación de nuevas drogas en esta enfermedad. Se tratarán las principales vías de señalización molecular implicadas en el desarrollo del CCR profundizando en aquellas implicadas en la proliferación celular, particularmente en la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Partiendo de esta base, se tratarán de manera concreta el papel que desempeña MET y las integrinas en este campo. A continuación, se presentan los dos artículos de tesis que siguen estas líneas de investigación en lo que se refiere a interferir en dichas vías de señalización para el tratamiento del CCRm.

En la primera publicación, se caracteriza el desarrollo de Flicatuzumab o SCH900105, un anticuerpo monoclonal humanizado de tipo inmunoglobulina 1 (IgG1) dirigido contra el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) con efectos antitumorales debido a su capacidad de unión y neutralización de HGF libre, inhibición de la fosforilación de c-MET, inhibición de la proliferación, inducción de apoptosis, angiogénesis e inhibición de la capacidad de invasión y motilidad celulares (3). En el segundo trabajo se describe la caracterización del fármaco Abituzumab o EMD525797 en combinación con quimioterapia estándar en segunda línea de tratamiento para CCRm. Abituzumab es anticuerpo monoclonal humanizado de tipo IgG2 que actúa contra la subunidad alfa-v ( $\alpha V$ ) de los receptores de la integrina humana. De este modo, el fármaco tiene el potencial de inhibir la progresión tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis inducida por el tumor y la inhibición de la proliferación tumoral actuando directamente sobre las células tumorales y afectando a la migración y la extravasación de las células tumorales (4). Cada una de las dos publicaciones, se acompaña de una discusión de los resultados presentados y potenciales líneas de investigación asociadas.

## 1.2. ANTECEDENTES

### 1.2.1. BASE MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL

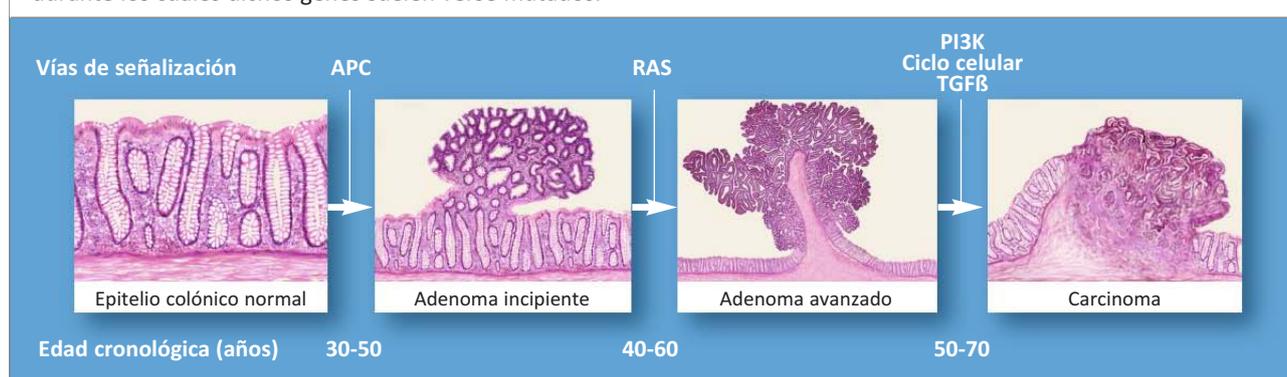
#### 1.2.1.1. Generalidades

A finales de la década de los 80 y principios de los 90 se sentaron las bases genéticas del CCR mediante la descripción de dos modelos tumorigénicos complementarios que conjuntamente argumentaban la génesis de la mayoría de los tumores de este origen: la secuencia pólipo-adenoma-adenocarcinoma de Vogelstein (5, 6), responsable de la génesis de aproximadamente el 90% de los tumores de colon y la inestabilidad de microsatélites (MSI) responsable del 10% restante descrita por Perucho (7). Estos modelos posteriormente, se han ido completando mediante la sedimentación progresiva de nuevo conocimiento hasta llegar al actual panorama molecular de la enfermedad al inicio de la era de la ultrasecuenciación tumoral.

Así pues, la mayor parte de tumores colorrectales son fruto de un proceso progresivo de eventos que dan lugar a la ganancia de mutaciones acumulativas en ciertos oncogenes y la pérdida de función de genes supresores de tumores que llevan a la transición de lesiones benignas pre-

existentes a la formación de un carcinoma. El inicio de esta cascada de carcinogénesis parte de alteraciones del gen que codifica para una proteína llamada APC (del inglés; *Adenomatous polyposis coli*) cuya pérdida de función conlleva la concatenación de dicha sucesión de eventos moleculares. Uno de los puntos fundamentales en la adquisición de un fenotipo agresivo viene dado por la incorporación de activaciones de las vías de transducción que se inician en los receptores de membrana a través de proteínas intermediarias con actividad GTPasa que provocan una señal de inducción de proliferación mediada por MAPK/ERK. Histológicamente, esto supone un evolución del adenoma desde sus fases más incipientes hasta las más tardías con una displasia que va alcanza progresivamente etapas de mayor severidad (5) (figura 1, adaptado de Vogeltestein et cols (5)).

**FIGURA 1:** Alteraciones genéticas en la progresión del CRC. Las vías de señalización más relevantes que llevan a la tumorigénesis se muestran en la transición de cada estadio evolutivo. Uno o diversos genes que codifican componentes de cada una de estas vías pueden verse alterados en cada tumor en particular. La edad indica los intervalos de tiempo durante los cuales dichos genes suelen verse mutados.



Estas vías de señalización han sido, por tanto; objeto de estudio no sólo para el mejor conocimiento de la biología molecular del CCR sino también por su potencial aplicabilidad desde un punto de vista terapéutico. A continuación se detallará los procesos moleculares concretos que tiene mayor impacto en la génesis y supervivencia tumoral en el caso concreto del CCR viendo además, como estos han llegado y pueden llegar a constituir potenciales dianas farmacológicas.

### 1.2.1.2. Vía de señalización de WNT/APC/ $\beta$ -CATENINA

Hasta en un 80% de los adenomas y tumores CCR, el gen supresor de tumoral APC se encuentra defectuoso siendo esta una de las alteraciones moleculares más frecuentes y precoces en la secuencia de alteraciones genéticas acumuladas que llevan al CCR. En este tipo de tumores, la mayor parte de mutaciones a nivel de APC suponen un truncamiento de la proteína conllevando su pérdida de función (8).

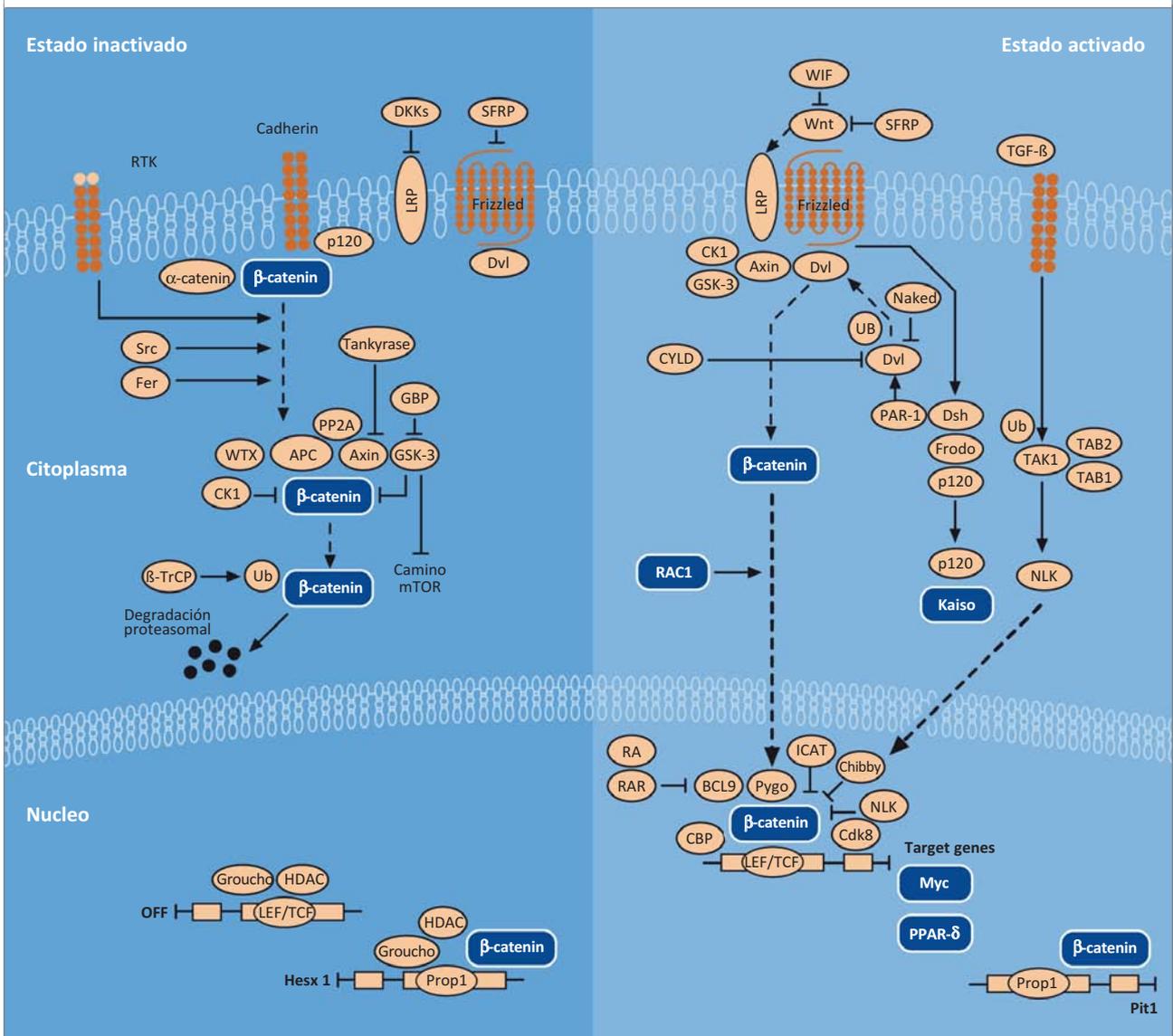
En condiciones normales, la proteína APC degrada la  $\beta$ -catenina citoplasmática una vez ésta se une al complejo APC/axina/GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\beta$  actúa fosforilando a  $\beta$ -catenina haciendo que se conjugue con ubiquitina y sea finalmente degradada (9, 10). Por tanto, la presencia de una proteína APC no funcional supone la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma que a su vez se acaba traslocando al núcleo. Esta molécula no solo tiene un papel fundamental en la adhesión celular sino que tiene una importante interrelación con la vía de señalización de WNT pudiendo llegar a activarla tal y como se describe a continuación (11, 12) (Figura 2).

El gen WNT1 codifica para una glicoproteína que desempeña un papel fundamental en la señalización extracelular y, a su vez, forma parte de una familia de factores de crecimiento (13). No sólo WNT1, sino también otros miembros de la familia de WNT, intervienen en procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular. Esta vía de señalización se inicia con la unión de WNT a un receptor específico denominado Frizzled. Para que esto no ocurra, se encuentra también un factor extracelular denominado WIF (factor inhibidor de WNT). En esta situación fisiológica,

Frizzled no está activado de modo que las proteínas  $\beta$ -catenina, APC y GSK-3 $\beta$  forman un complejo que produce que  $\beta$ -catenina sea fosforilada por GSK-3 $\beta$ ; a continuación la proteína beta-catenina fosforilada es ubiquitinizada y degradada en el proteosoma. Igualmente, en situación basal, la expresión del oncogen c-MYC se encuentra silenciada por la presencia de un factor llamada Groucho, que reprime la actividad pro-transcripcional del factor de transcripción LEF (factor de las células T) y TCF (potenciador del factor linfoideo)(13, 14).

La llegada de Wnt a su receptor Frizzled provoca su activación, lo cual a su vez activa proteínas intermediarias como Dishevelled (Dsh), que son las responsables de inhibir la actividad quinasa de GSK3-beta. De esta forma, GSK3-beta no puede fosforilar a  $\beta$ -catenina, librándose del complejo APC y se trasloca al núcleo. Allí desplaza a complejos represores de la transcripción y pone en marcha mecanismos de transcripción LEF/TCF induciendo la expresión de genes, que habitualmente se encuentran reprimidos como es el caso de c-MYC que precipita la división celular.

**FIGURA 2:** Vía de señalización de WNT/ $\beta$ -catenina. La vía de WNT/ $\beta$ -catenina, tiene un papel fundamental en procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular.

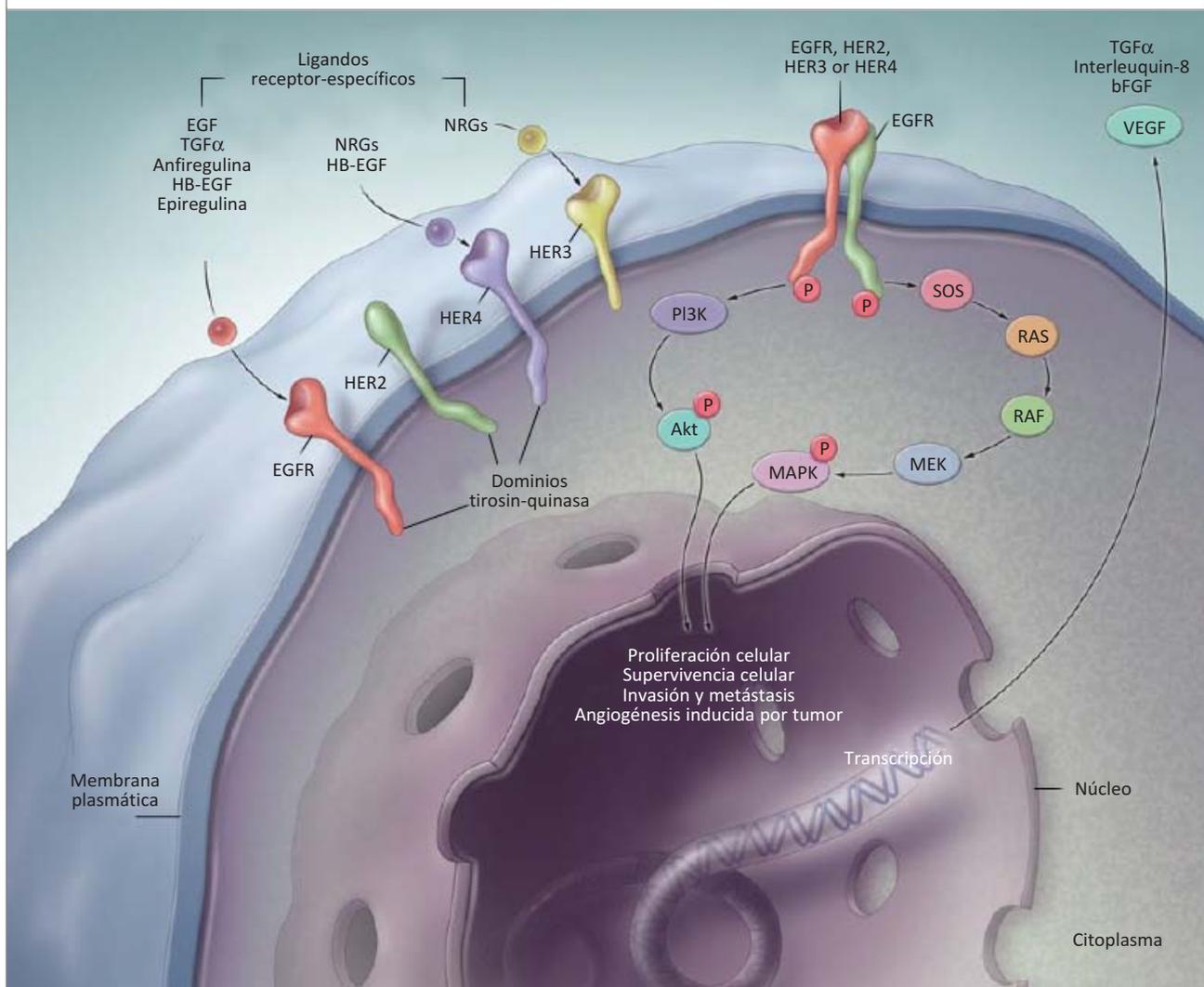


Por tanto, alteraciones moleculares que supongan la activación de esta vía de señalización como mutaciones a nivel de APC que a su vez implican la acumulación citoplasmática de  $\beta$ -catenina, supone un paso primordial para el desarrollo de tumores como el CCR.

### 1.2.1.3. Vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico

El cáncer de colon, como neoplasia epitelial, presenta una expresión muy significativa de EGF (del inglés; epidermal growth factor-EGF o factor de crecimiento epidérmico) y/o su receptor; EGFR. EGFR se encuentra sobreexpresado en un 75-90% de los tumores y se ha postulado que dicho aumento en el número de receptores extracelulares podría conferir peor pronóstico (15). Se trata de una proteína de membrana con función tirosin-quinasa que representa una importante diana para el tratamiento contra el cáncer dado que su activación estimula una cascada de procesos implicados en el crecimiento y progresión tumoral incluyendo mecanismos de proliferación, angiogénesis, invasión y metástasis (16). La familia del receptor EGFR comprende 4 moléculas: EGFR (HER1), HER2, HER3 y HER4. Estos receptores, tienen la habilidad de poder unirse a distintos ligandos que inician la activación de la vía una vez se da la unión al receptor (17). Se pueden definir sistemáticamente tres pasos en la activación de la señalización intracelular dependiente de EGFR (Figura 3, adaptado de Ciardiello et cols (18)). En primer lugar, tiene lugar la unión específica de un ligando al receptor en la porción extracelular del receptor EGFR o en uno de los receptores relacionados con el mismo. A continuación, se da la formación de una homodimerización o heterodimerización entre los mencionados receptores que supone la fosforilación dependiente de adenosin-trifosfato (ATP) de residuos tirosina específicos en el

**FIGURA 3:** Receptores EGFR. La activación del receptor EGFR consiste en tres pasos fundamentales en que se da la unión específica de un ligando a la porción extracelular del receptor, ocurre una homodimerización o heterodimerización entre los receptores y se fosforilan los residuos tirosina específicos en el dominio intracelular activando un programa de señalización intracelular desde el citoplasma hasta el núcleo.



dominio intracelular del receptor EGFR (19). Finalmente, esta fosforilación de los residuos específicos tirosina activa un complejo programa de señalización intracelular desde el citoplasma hasta el núcleo. Una de las vías de señalización primordial mediada por la activación del receptor EGFR es RAS-RAF-MEK-MAPK (20). Esta vía, media la transcripción genómica, progresión del ciclo celular desde G1 a S y proliferación celular.

#### 1.2.1.3.1. Vía de señalización de RAS/RAF/MEK/MAPK

La sobre-activación de la vía de las MAPK es uno de los principales fenómenos en la génesis del CCR. Como ya se ha mencionado, la activación de la cascada de señalización comienza cuando el dominio tirosina-quinasa de alguno de los receptores efectores de membrana es fosforilado. Tras este proceso, los grupos fosfato incorporados son capaces de atraer los dominios SH2 de algunas de las proteínas activadoras de KRAS que reciben el nombre en inglés de Guanine Exchanging Factors (GEPs). Cuando esto sucede, los GEPs son a su vez fosforilados produciéndose un cambio en su conformación que les permite atraer y unirse a las proteínas de la familia RAS. Las proteínas RAS (KRAS, HRAS y NRAS) son GTPasas, cuya función consiste en unir moléculas de guanina tri-fosforiladas (GTP) y defosforilarlas, proceso mediante el cual sufren un cambio en su conformación que les permite interactuar con otras proteínas. Una vez esta interacción se ha realizado, la proteína RAS recupera su conformación inicial mediante la defosforilación de la molécula de GTP.

RAS es una de las proteínas que podemos encontrar más frecuentemente mutada en tumores humanos (21). La mayor parte de mutaciones oncogénicas de RAS se encuentran se dan en el codón 12 mediante la sustitución de una glicina por cualquier otro aminoácido en esta situación. Esto implica un bloqueo de la unión GAP al complejo RAS-GTP haciendo que RAS se encuentre constitutivamente activado en la situación RAS-GTP (22). La activación continua de RAS genera una estimulación celular constante de diversas funciones oncogénicas tales como el crecimiento, progresión del ciclo celular a través de la fase G1-S y estimulación de la angiogénesis. Además, este fenómeno favorece la transformación del metabolismo celular hacia programas predominantemente anabólicos que sustentan los nuevos y elevados requerimientos derivados del comportamiento tumoral, inmortalización celular o el incremento de la motilidad y potencial metastásico (23).

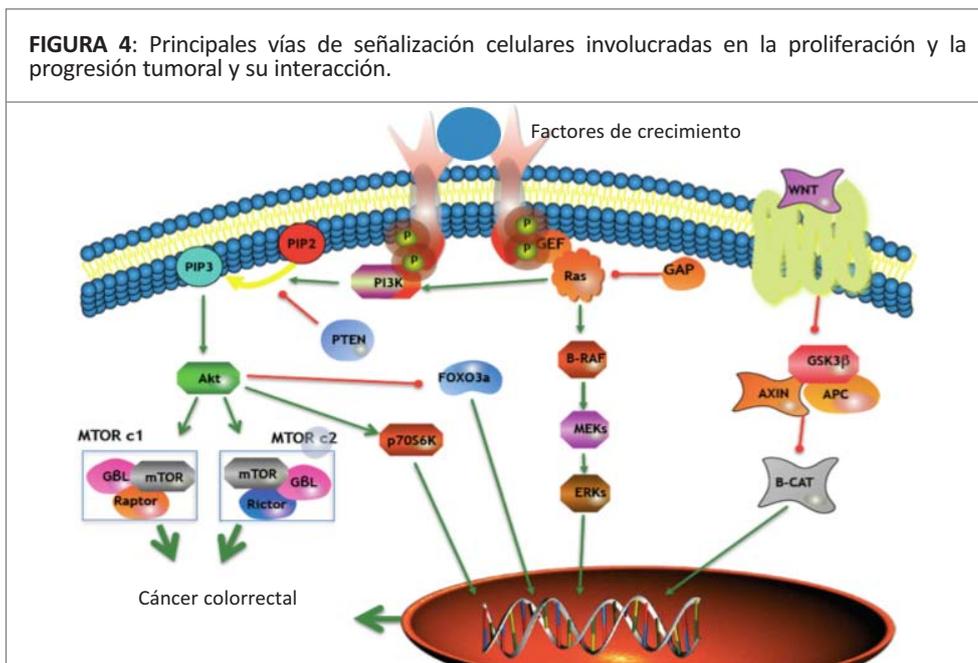
A continuación, el complejo activo RAS-GTP se une a una proteína serina-treonina quinasa llamada RAF mediante su fragmento N-terminal. La hidrólisis de RAS-GTP a RAS-GDP hace que RAF sea activado mediante fosforilación y posteriormente liberado (24). BRAF, miembro de la familia de proteínas RAF (A,B,C-RAF) es la principal efectora de RAS en la vía de las MAPK. Cuando BRAF es activada por RAS, ésta interactúa con CRAF para activar a MEK, que a su vez extiende la señal mitogénica a la activación de ERK que finalmente se trasloca al núcleo celular donde activa los programas genéticos que resultan en los efectos previamente descritos (25). Hasta la fecha, se han identificado mutaciones en tres proteínas RAF diferentes (ARAF, BRAF y CRAF) que están implicadas en tumores humanos. De éstas, las mutaciones en *BRAF* son las más frecuentes. Se han llegado a describir mutaciones de *BRAF* en el 13% de los tumores originados en colon y recto de las cuales, el 99% presentaban transición a V600E. Este fenómeno es mutuamente excluyente con la presencia de mutaciones en RAS en una misma célula. La alteración activadora más frecuente descrita es la V600E y consiste en una sustitución de la valina en su posición 600 por un ácido glutámico (26). Ya existe evidencia que indica que las mutaciones *BRAF* podrían actuar como un factor de resistencia a terapia anti-EGFR (27). Esto implicaría que las mutaciones *BRAF* activadas puedan suprimir la inhibición del crecimiento inducida normalmente por el agente terapéutico. De igual modo, también constituiría un marcador pronóstico negativo en pacientes con CCRm y su efecto, al contrario de las mutaciones RAS, parece no estar limitado a los resultados del tratamiento con anti-EGFR (28). Por tanto, los fármacos inhibidores de BRAF podrían suponer una interesante alternativa terapéutica para los pacientes cuyos tumores presenten este tipo de mutaciones.

1.2.1.3.2. Vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR

La vía de PI3K-AKT-mTOR constituye un eje central en la señalización celular tanto en tejidos sanos como en la mayoría de tipos tumorales. La desregulación de esta vía de señalización es una de las alteraciones más frecuentes en neoplasias humanas y se considera crucial para el desarrollo tumoral (29). La señal se desencadena con la estimulación del receptor de membrana, el dominio tirosina-quinasa del cual; una vez fosforilado atrae hacia sí el dominio SH2 de la parte p85 de PI3K (siglas en inglés de Fosfo-Inositol quinasa). PI3K es una quinasa lipídica formada por dos subunidades, p85 parte reguladora y p110 subunidad catalítica. Cuando la subunidad p85 está unida al grupo fosfato del receptor transmembrana, se produce un cambio conformacional sobre p110 que le posibilita interactuar con las moléculas de fosfo-inositol bifosfato (PIP2) fosforilándolas para dar fosfo-inositol trifosfato (PIP3), mecanismo que también puede ocurrir por la unión de KRAS directamente a la subunidad p110. El PIP3 puede ser reciclado a PIP2 por acción de la fosfatasa homóloga del tensinógeno (PTEN) que antagoniza la función de PI3K actuando como represor de la vía. PIP3 es capaz de fosforilar AKT (proteína quinasa B) y PDK1 (proteína quinasa 1 dependiente de fosfoinositol), dos proteínas situadas por debajo en la vía, que a su vez tienen como funciones más importantes la activación de los complejos mTOR 1 y 2 (del inglés; mammalian target of rapamycin), P70S6 quinasa y también la supresión de FOXO3a (del inglés; Forkhead box O3), provocando, entre otras cosas, la activación del metabolismo, adquisición de resistencia a la apoptosis, un incremento de la motilidad celular, un aumento de la angiogénesis y la progresión del ciclo celular.

La proteína PI3K se encuentra alterada por mutación en un 10-20% de los CCR siendo menos frecuente que se encuentre amplificada (30). Por otro lado, PTEN, principal represor de la vía, puede verse mermado por mutaciones inactivadoras o por disminución de su expresión ya sea por pérdidas alélicas o metilación de su promotor (31). Entorno al 19-36% de los CCR presentan una disminución en la expresión de PTEN, alteración que por la relación con la vía de EGFR podría tener un impacto en lo que se refiere al tratamiento con terapia específicas dirigidas (26).

Cabe destacar además, que existen numerosas interacciones entre diferentes vías de señalización involucradas en la proliferación y la progresión tumoral (Figura 4). Estas interacciones establecerían mecanismos de escape que permitirían al tumor escaparse del bloqueo farmacológico. Como ya se ha mencionado, las vías de RAS-RAF-MEK-MAPK y la de PI3K-Akt-mTOR juegan un papel importante en la tumorigénesis a través de la fosforilización de distintas proteínas y factores de transcripción que directamente controlan el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis (32). Mutaciones en los genes KRAS, NRAS, BRAF o PI3K resulta en una activación continua de sus proteínas de cascada RAS cascada RAS-MAPK o PI3K, de forma independiente a la inhibición producida por fármacos que bloquean el receptor del EGFR.

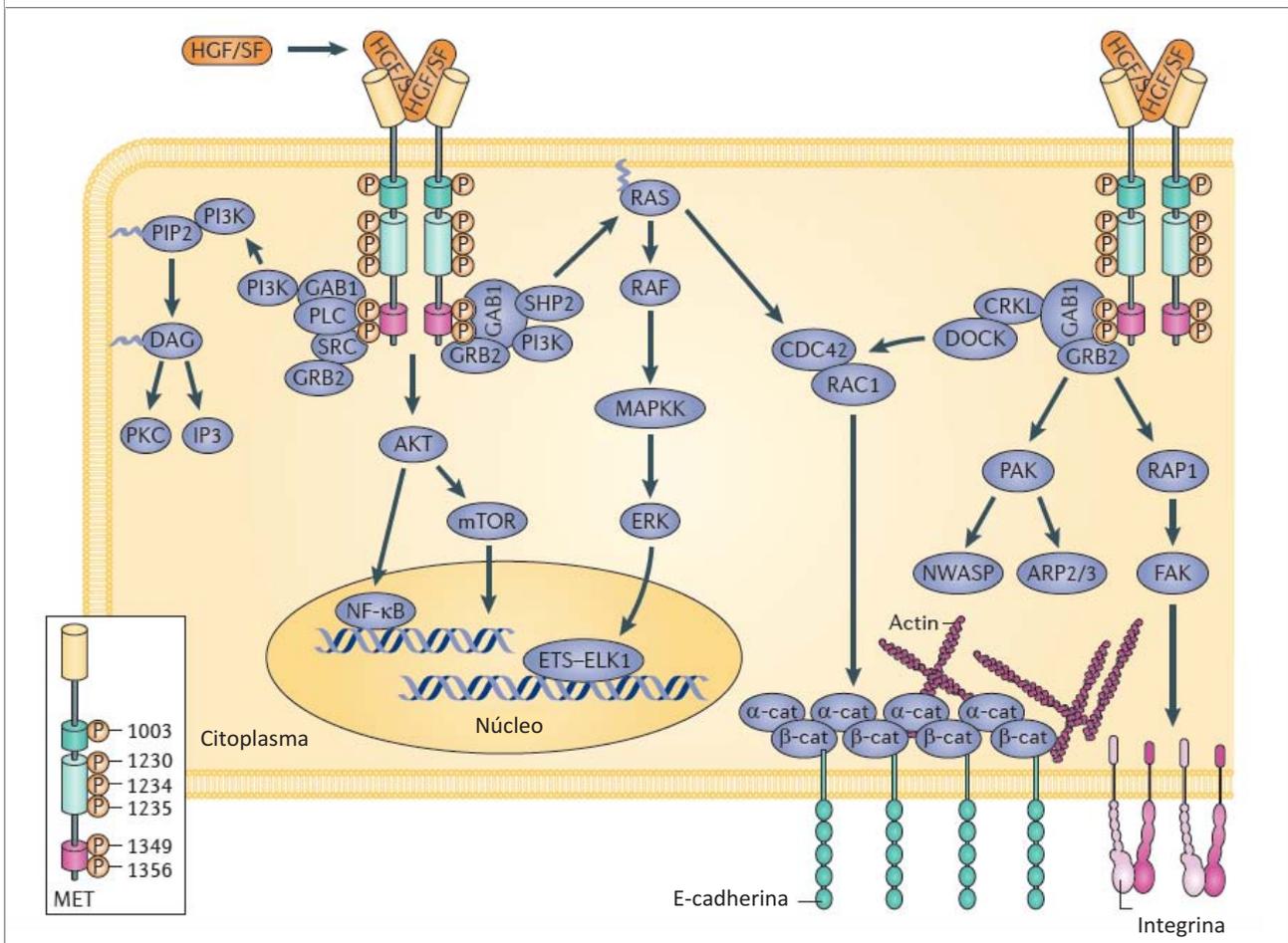


1.2.1.4. Vía de señalización de MET

El proto-oncogen MET se identificó por primera vez en líneas celulares de osteosarcoma en 1984 y su proteína resultante fue posteriormente descrita como un receptor de tipo tirosin-quinasa cuyo ligando es el factor de crecimiento de los hepatocitos conocido en inglés como HGF (33, 34). La vía de MET/HGF juega un papel fundamental en la formación de los hepatocitos y la placenta durante la embriogénesis y sus efectos son críticos para la regeneración de tejidos (35, 36). Así mismo, favorece la proliferación de los queratinocitos y su migración hacia zonas no epitelizadas (37). Por tanto, la desregulación en esta vía de señalización favorecería procesos de proliferación, apoptosis y migración celular que facilitarían el proceso de crecimiento tumoral y metastatización generando neoplasias dependientes de esta vía.

La activación dependiente de la unión de MET a HGF da lugar a la dimerización del receptor y la fosforilación de tres residuos de dominio tirosin-quinasa dando lugar a un proceso de autofosforilación que favorece el reclutamiento de proteínas efectoras citoplasmáticas y activando la señalización transmembrana. Los efectos de esta cascada de señalización se transmiten mediante la vía de las MAP-quinasas, PI3K/AKT, STAT y el factor nuclear  $\kappa$  (Figura 5). Como se ha mencionado previamente, la consecuencia final de la activación de estas vías de señalización, es la activación de procesos citoplasmáticos y nucleares que incrementan la proliferación celular, supervivencia, movilización y capacidad de invasión (38, 39). Se ha observado que el desarrollo de modelos murinos con una mutación activadora a nivel de MET, da lugar a la aparición de distintos tipos de neoplasias siendo esto una evidencia mas de la actividad oncogénica que tendría este tipo de alteración molecular (40). Aunque la amplificación de MET (cromosoma 7q31) se ha descrito en ciertos tipos de tumores como es el caso de CCR (41); la sobreexpresión del receptor es más frecuentemente observada (34).

**FIGURA 5:** Vía de señalización de MET. La unión de MET a HGF da lugar a la dimerización del receptor y fosforilación del dominio tirosin-quinasa dando lugar a un proceso de autofosforilación que favorece el reclutamiento de proteínas efectoras citoplasmáticas entre las que se encuentran y activando la señalización transmembrana.



También cabe destacar la interacción de la vía de MET con otros mecanismos celulares pro-oncogénicos como HER2 y HER3. Por ejemplo, las células que expresan EGFR y MET han demostrado ser independientes de la activación de MET mediante su unión propia a ligando siendo posible este fenómeno gracias a la activación a través de EGFR (42, 43). Por otro lado, en algunos tipos de tumores en que la vía de EGFR es particularmente relevante; se han hecho observaciones particulares al respecto. Se ha observado que en el cáncer de pulmón de célula no pequeña cuyas células presentan mutación a nivel de EGFR presumiblemente sensibles a inhibidores tirosin-quinasa EGFR, la amplificación de MET sería un mecanismo de resistencia a este tipo de terapias mediante la activación de la vía de PI3K a través de HER3 (43, 44).

En el caso concreto de CCR, se ha observado en líneas celulares que en ausencia de mutación a nivel de RAS y cuando existe sobreexpresión del factor de crecimiento tumoral alfa (TGF- $\beta$ ) como ligando de EGFR, da lugar a la activación de la vía de MET de modo que esto conferiría resistencia a las terapias anti-EGFR como cetuximab o panitumumab (45, 46).

La señalización mediada por MET también favorece la progresión tumoral mediante la angiogénesis. MET/HGF es un inductor potente de la producción del factor de crecimiento del endotelio vascular (del inglés; *vascular endothelial growth factor*, VEGF) tipo A y un inhibidor de la trombospondina-1 a través de moléculas de señalización comunes dando lugar al incremento de la vascularización (47, 48).

Finalmente, cabe destacar que también hay estudios que apuntan a un posible papel de MET favoreciendo el mantenimiento del nicho de las células madre o pluripotentes. HGF sería secretado por miofibroblastos del nicho favoreciendo su estabilización (49-52). Esto tiene particular relevancia si tenemos en consideración que la vía de WNT tiene un papel fundamental en CCR.

#### 1.2.1.5. Vía de señalización del factor de crecimiento transformante $\beta$

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) forma parte de una amplia familia de péptidos con función de factores de crecimiento que incluyen 5 genes altamente conservados (TGF- $\beta$ 1 a TGF- $\beta$ 5) los productos de los cuales forman dímeros de 25 kDa. Se han identificado tres proteínas de la superficie celular capaces de unirse a TGF $\beta$ . Estas serían los receptores de tipo 1, tipo 2 y tipo 3 de TGF $\beta$  (TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3) que se unen a TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 con una alta afinidad. El dominio extracelular rico en cisteínas de estas moléculas presenta una región con alta identidad con la molécula DAF-1 y con el receptor de activina pero no tiene homología con EGFR o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Los receptores TGF $\beta$ 1 y TGF $\beta$ 2 se localizan en la membrana citoplasmática y se distribuyen de forma ubicua a nivel tisular. Ambos receptores median la acción de los miembros de la familia y son serina-treonina quinasas transmembrana. TGF $\beta$  se une directamente al receptor 2 de TGF $\beta$ , el cual es directamente fosforilado.

Las distintas isoformas de TGF $\beta$  son potentes inhibidores de la proliferación en muchos tipos celulares. Sin embargo, TGF $\beta$  también es secretado por una amplia variedad de células tumorales y su incremento en su producción frecuentemente se correlaciona con propiedades anómalas de adhesión celular pudiendo incrementar la capacidad metastásica. TGF $\beta$  es capaz de estimular al mismo tiempo la proliferación de una línea celular de adenocarcinoma y promover la invasividad tumoral como ocurre también en ciertos tipos de tumores como el cáncer de pulmón. Sin embargo, en otro tipo de entidades como el cáncer de mama, TGF $\beta$  inhibe la proliferación posiblemente a través de la estimulación de la proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (53, 54).

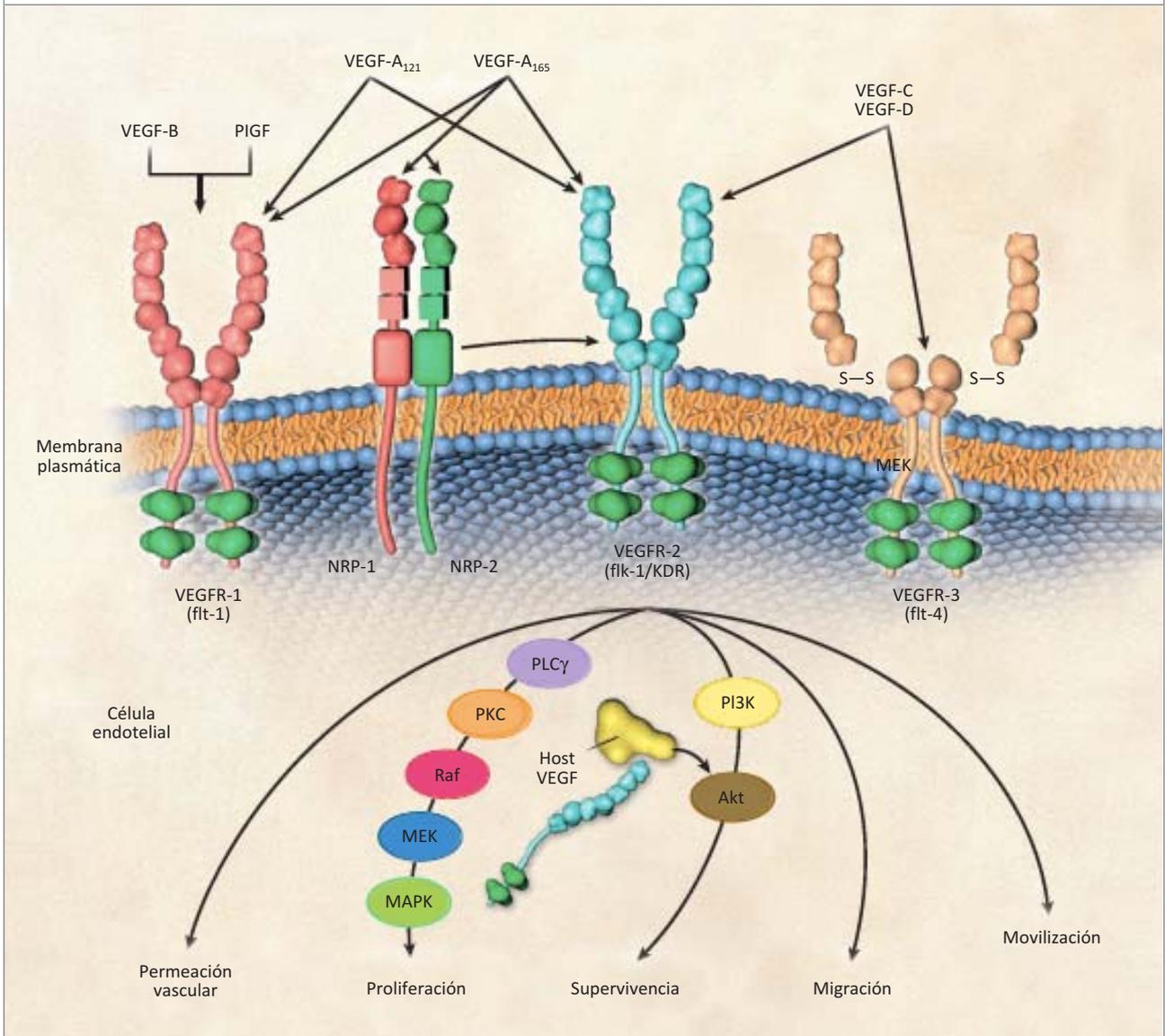
Cabe destacar que la sobreactivación del eje de TGF $\beta$  es de particular relevancia en la enfermedad avanzada puesto que contribuyen al mantenimiento y supervivencia de las células madre pluripotenciales a la vez que contribuye a la transición epitelio-mesénquima (del inglés, *epithelial mesenchymal transition*, EMT) favoreciendo así el potencial de metastatización (55).

**1.2.1.6. Angiogénesis**

*1.2.1.6.1. Generalidades*

Es bien sabido que la angiogénesis juega un papel crucial en el desarrollo del CCR. Se trata de un proceso mediante el cual se da lugar a la formación de nuevos capilares en un lecho vascular previo favoreciendo así la supervivencia y crecimiento tumoral. Cuando el tumor adquiere un tamaño crítico que imposibilita la llegada de nutrientes y oxígeno, se da una situación de hipoxia que es el desencadenante fundamental que da lugar a la liberación de factores angiogénicos. VEGF es uno de los principales activadores angiogénicos. Las células endoteliales expresan en su membrana receptores con actividad tirosin-quinasa específicos para VEGF (del inglés; vascular endotelial growth factor receptor, VEGFR). Se conocen tres tipos de receptores VEGF: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 (Figura 6, adaptado de Kerbel et cols (56)). El receptor de tipo 1 es necesario para mediar la migración de monocitos y macrófagos y el reclutamiento de precursores hematopoyéticos, mientras que los receptores de tipo 2 y 3 están más implicados en los procesos de linfangio y vasculogénesis. VEGF se expresa en la mayor parte de neoplasias humanas asociándose generalmente a un peor pronóstico. Existen distintos factores que pueden incrementar la expresión de VEGF como factores microambientales tipo hipoxia, pH bajo,

**FIGURA 6:** Vía de señalización de VEGF: La activación del receptor da lugar al inicio de una cascada de señalización en la que se están implicadas otras vías intracelulares de vital importancia para la proliferación y supervivencia tumoral como es el caso de la vía de las MAP-quinasa o la vía de PI3K.



citoquinas inflamatorias o factores de crecimiento. Otras causas, incluyen cambios genéticos que suponen la activación de distintos oncogenes o pérdida de función de genes supresores tumorales. La unión de VEGF al receptor desencadena una cascada de señalización que pone en marcha mecanismos que dan lugar a un incremento de la permeabilidad celular que posibilita la entrada de otros factores de crecimiento, inducen la proliferación celular, aumentan la capacidad de migración de la célula, inhiben la apoptosis y finalmente aumentan la supervivencia (56). De este modo, bloquear los procesos que la angiogénesis constituye una interesante vía para tratar el CCR siendo bevacizumab, anticuerpo monoclonal dirigido a VEGF-A; el primer fármaco biológico incorporado al tratamiento estándar de la enfermedad avanzada (57, 58).

#### 1.2.1.6.2. Papel de las integrinas

Las integrinas son receptores transmembrana de tipo glicoproteína formadas por una subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  que median la interacción intercelular y con la matriz extracelular. El entorno extracelular juega un papel fundamental en el comportamiento celular. De este modo, las integrinas actuarían como receptores que median la unión y migración celular mediante el reconocimiento de distintas moléculas de la matriz extracelular de modo que esto tiene particular relevancia en la angiogénesis tumoral mediante la interacción de las células tumorales con las células endoteliales. Las integrinas también tiene un efecto directo sobre las células tumorales estimulando la señalización intercelular que puede afectar la expresión génica y alterar la regulación de la supervivencia celular, diferenciación y proliferación (59-61).

Tal y como se ha descrito previamente, el rol de factores de crecimiento como VEGF y sus receptores como componentes fundamentales en el desarrollo de la angiogénesis tumoral están bien establecidos. Sin embargo, también sabemos que los factores de crecimiento secretados en el lecho tumoral también son de gran importancia la activación de moléculas de implicadas en invasión y adhesión relevantes para la angiogénesis. La supervivencia de las células tumorales, depende en gran parte de la unión célula-célula y de su contacto con la matriz extracelular de modo que las integrinas actuarían permitiendo estas dos funciones. Existen varios mecanismos mediante los cuales la interacción de la matriz extracelular con las células tumorales pueden promover la proliferación celular, supervivencia e invasión incluyendo aquellos mediados por metaloproteinas-3 (MMP-3) y las integrinas (62). La interacción que median las integrinas con la matriz rígida extracelular y la célula tumoral resultaría en la activación de la vía de señalización de RHO de modo que esto estimularía la contractilidad y la EMT, la vía de ERK y; por tanto, se induciría la proliferación celular. De igual modo, las integrinas alfa $\beta$ 3/alfa $\beta$ 5 podrían ejercer efectos antiangiogénicos interaccionando con vibrinectina, fibrinógeno y otras moléculas en las células endoteliales tras la activación de MMP-2 o trombospondina-1. Por otro lado, también existen trabajos en que se ha observado que la sobreexpresión de integrinas en ciertos tipos tumorales puede conferir un pronóstico desfavorable (63). Así pues, estas moléculas podrían considerarse también potenciales dianas terapéuticas en el CCR.

#### Base Molecular del Cáncer Colorrectal: Puntos Clave

- El modelo tradicional de desarrollo de CCR se basa en la acumulación progresiva de alteraciones genéticas y epigenéticas que llevan al desarrollo de una secuencia de progresión adenoma-carcinoma.
- Este modelo ha llevado a identificar los principales oncogenes y genes supresores de tumores implicados en este proceso como *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PI3K* y *APC*, *PTEN* respectivamente.
- Las alteraciones moleculares descritas conllevan una desregulación en vías de señalización cruciales para la proliferación y supervivencia tumorales siendo las más relevantes: WNT/ $\beta$ -catenina, TGF $\beta$ , EGFR, vía de las MAPK y PI3K.
- La angiogénesis y los mecanismos de adhesión intercelular y con la matriz extracelular tienen un rol fundamental en la progresión tumoral y potencial de metastatización.
- Dichas alteraciones moleculares no sólo han sido base para la incorporación de nuevos agentes terapéuticos en el tratamiento del CCRm como anticuerpos anti-EGFR y antiangiogénicos, sino que siguen una vía de investigación fundamental para la identificación de mecanismos de resistencia a los mismos y desarrollo de nuevas terapias dirigidas.

## 1.2.2. TRATAMIENTO CONVENCIONAL DEL CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO

### 1.2.2.1. Papel de los quimioterápicos

Si bien al principio de la década de los 80 la supervivencia media de los pacientes con CCRm era de 6 meses, ésta se prolongó con la incorporación de quimioterápicos como el 5-Fluorouracilo (5-FU) que, en combinación con leucovorín (LV) ofreció datos de SG de 12 meses (64). El desarrollo de regímenes infusionales de 5-FU en combinación con LV supuso una mejoría en el perfil de toxicidad del tratamiento así como en términos de eficacia. Por otro lado, la incorporación de las fluoropirimidinas (FP) orales como capecitabina, también ha permitido ofrecer a estos pacientes otras alternativas terapéuticas con un buen perfil de toxicidad y eficacia (65, 66). La asociación de 5-FU infusional a LV e irinotecan (FOLFIRI) u oxaliplatino (FOLFOX) supuso una mejoría en el pronóstico de estos enfermos alcanzando mayor TR, SLP y SG que 5-FU/LV (65, 67-69).

FOLFOX y FOLFIRI ofrecen una actividad similar aunque tienen distinto perfil de toxicidad fundamentalmente neuropatía sensorial atribuible a oxaliplatino y alopecia y mayor incidencia de diarrea en el caso de irinotecan (68). Cabe destacar que, cuatro estudios aleatorizados han demostrado que no hay mayores diferencias en términos de SG de un tratamiento de combinación de inicio respecto a una opción secuencial. Así, una pauta secuencial iniciándose con FP sería una opción válida en determinados pacientes considerados frágiles o de riesgo para toxicidad (70-72). De hecho, ciertos estudios retrospectivos han demostrado que la exposición a los tres citostáticos en distintas secuencias supone mayor SG. También existe evidencia acerca de las triples combinaciones de 5-FU, oxaliplatino e irinotecan en pauta FOLFOXIRI mostrando beneficio en todos los términos de eficacia comparado con un doblete de FOLFIRI aunque a expensas de mayor toxicidad. Éste es un régimen de tratamiento, por tanto; que se reserva a pacientes seleccionados (73). Las segundas líneas de tratamiento se basarán en la opción tomada en la primera línea y no hay en la actualidad evidencia de que una opción preferente (68).

Sin embargo, lo que ha supuesto el mayor avance en el tratamiento de esta entidad ha sido la incorporación de fármacos biológicos como es el caso de los fármacos antiangiogénicos como bevacizumab y aflibercept y los anticuerpos anti-EGFR como cetuximab y panitumumab (28, 58, 74). La exposición a todos estos agentes a lo largo de la historia oncológica del paciente es lo que parece haber ofrecido mejores resultados de supervivencia. Recientemente se han presentado estudios fase III que enfrentan combinaciones que incluyen anti-EGFR o antiangiogénicos y que ofrecen SGs entorno a los 30 meses siendo este beneficio mayor en poblaciones moleculares seleccionadas (75, 76).

### 1.2.2.2. Fármacos antiangiogénicos

Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que se une a VEGF evitando así su unión a VEGFR1 y VEGFR2 que se encuentra en las células endoteliales. Esto implica una reducción de la vascularización tumoral y por tanto inhibe el crecimiento tumoral.

Bevacizumab ha demostrado un incremento en términos de SG, SLP y TR en primera línea de tratamiento en combinación con 5FU/LV e irinotecan (57). En asociación con oxaliplatino y FP ha evidenciado mejoría en SLP también en primera línea de tratamiento (58). La combinación de FOLFOXIRI con bevacizumab ha demostrado también tener impacto en SLP y TR en comparación con FOLFIRI y bevacizumab llegando a alcanzar unos de los mejores resultados de supervivencia hasta el momento (77). La molécula también ofrece beneficios significativos en SG y SLP en asociación con FOLFOX en segunda línea de tratamiento (78). Sin embargo, y de forma más interesante; también se ha demostrado que mantener bevacizumab una vez se cambia el esquema de quimioterapia tras progresión a una primera línea que incluya el anticuerpo; impacta en SG y SLP (79). La toxicidad característica de bevacizumab es la derivada de su mecanismo de su acción como antiangiogénico, de modo que puede ocasionar hipertensión, proteinuria y mayor incidencia de trombosis y sangrado entre otros. Cabe decir que a día de hoy todavía no existen factores moleculares predictivos de respuesta para este tipo de agentes.

Aflibercept es una molécula de fusión recombinante dirigida a bloquear VEGF-A, VEGF-B y el factor de crecimiento placentario (PLGF). Esta molécula ha demostrado mejorar la SG, SLP y TR en combinación con FOLFIRI en segunda línea de tratamiento para CCRm independientemente del tratamiento previo con bevacizumab (80, 81). Aflibercept presenta un perfil de toxicidad muy similar a bevacizumab puesto que también se trata de un fármaco antiangiogénico aunque se ha observado que se asocia a cierto incremento de los efectos secundarios de la quimioterapia presentando mayor incidencia de diarrea, neutropenia o mucositis.

Regorafenib es un fármaco oral inhibidor multiquinasa que ha demostrado incrementar SG y SLP respecto a tratamiento exclusivo de soporte en aquellos enfermos en situación de refractariedad a tratamiento estándar (81). Los efectos adversos más frecuentemente observados en el estudio regulatorio síndrome mano-pie, astenia, diarrea, hipertensión y eritema o descamación.

### 1.2.2.3. Fármacos dirigidos frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico

#### 1.2.2.3.1. Papel de los anticuerpos dirigidos frente al factor de crecimiento epidérmico en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico

La indicación de tratamiento con anti-EGFR en CCRm supone el paradigma de la terapia personalizada en esta neoplasia. Cetuximab y panitumumab son los dos fármacos anti-EGFR aprobados para el tratamiento de CCRm en distintas líneas de tratamiento y bajo distintas combinaciones. Ambos fármacos son anticuerpos monoclonales de tipo murino IgG1 en el caso de cetuximab y, humanizado e IgG2 en el caso de panitumumab. La potencial eficacia de los mismos, sin embargo; viene supeditada a aquellos pacientes cuyos tumores no presentan mutación a nivel de los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* y *NRAS*. Se ha demostrado que la presencia de mutación a uno de estos niveles no solo constituye un factor predictor de no respuesta a tratamiento con a estas drogas sino que, el empleo de las mismas en estas poblaciones; puede implicar incluso un efecto detrimental (74, 82). De este modo, la ausencia de mutación a nivel de RAS es requisito para la prescripción de ambos anticuerpos de acuerdo con la Agencia Europea del Medicamento.

En lo que se refiere a datos concretos de eficacia, ambos anticuerpos han demostrado actividad desde su administración en monoterapia hasta distintas combinaciones con esquemas citostáticos. Cetuximab ha demostrado beneficio en términos de SG en pacientes refractarios a tratamiento quimioterápico estándar comparado con tratamiento exclusivo de soporte (83, 84). Panitumumab impacta en SLP cuando se administra en monoterapia también en este subgrupo de pacientes aunque probablemente no se llegó a demostrar beneficio en SG debido a la posibilidad de administración del fármaco una vez se constataba progresión en la población que había sido asignada a tratamiento exclusivamente de soporte (85, 86). Cabe decir, que ambos anticuerpos han demostrado eficacia similar cuando se han comparado directamente (87). En combinación con irinotecan, existen datos favorables acerca de la asociación a cetuximab en que los resultados son superiores a la administración del anticuerpo en monoterapia siendo esta una opción estándar en pacientes con tumores RAS wild type (del inglés; de tipo salvaje o nativo, WT) y quimiorrefractarios (83-86, 88).

Los estudios de segunda línea han demostrado también beneficio en SLP y TR de combinaciones basadas en irinotecán y anticuerpos anti-EGFR aunque sin llegar a alcanzar los mismos resultados para SG probablemente por la administración de anti-EGFRs en líneas posteriores de tratamiento (89-91).

En lo que se refiere a la primera línea de tratamiento, ambos anticuerpos han demostrado beneficio en todos los términos de eficacia. En el caso de cetuximab, la combinación con FOLFIRI supera a la quimioterapia en cuanto a SG, SLP y TR en la población RAS WT (28, 92). En combinación con FOLFOX ha demostrado beneficio en términos de TR y SLP (93) aunque esto no se ha reproducido en estudios que exploraban otras combinaciones basadas en oxaliplatino ya sea con la FP oral capecitabina (CAPOX) o con *bolus* de 5-FU (FLOX) (93, 94). Panitumumab en combinación con FOLFOX ha demostrado impacto en SG, SLP y TR en la población RAS WT (24, 25).

De este modo, la combinación de fármacos anti-EGFR no se recomienda en regímenes que asocien capecitabina o bolus de 5-FU.

La toxicidad característica de estos medicamentos es una erupción cutánea de tipo acneiforme así como la hipomagnesemia. En el caso de cetuximab, al tratarse de un anticuerpo murino, la incidencia de reacciones infusionales es mayor que con panitumumab que se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado.

A día de hoy todavía no se ha establecido si hay una secuencia establecida para optar por un tipo de biológico u otro en primera línea de tratamiento en la población RAS no mutada. Existen tres estudios cuyos resultados han sido presentados recientemente que comparan ambas estrategias. El estudio CALGB80405 exploraba la combinación de cetuximab o bevacizumab con quimioterapia en primera línea de tratamiento en población *KRAS* exón 2 no mutado (76). Los enfermos se aleatorizaban a recibir cetuximab o bevacizumab asociado al esquema de quimioterapia escogido por el investigador siendo el objetivo principal del estudio SG. Los resultados de este estudio se han presentado recientemente sin encontrar diferencias significativas entre las combinaciones que incluían anti-EGFR o antiangiogénico obteniendo una SG de 29'9 meses para la población tratada con bevacizumab y 29'0 meses para los tratados con el anticuerpo anti-EGFR. Cuando nos centramos en el análisis en base al esquema de quimioterapia empleado, los pacientes tratados con FOLFOX o FOLFIRI en combinación con cetuximab o bevacizumab tampoco observamos diferencias relevantes entre la asociación de uno u otro anticuerpo. Queda pendiente el análisis de dichos resultados en base al estudio completo del estado mutacional de RAS.

El estudio FIRE-3 evaluaba la combinación de FOLFIRI con cetuximab o bevacizumab en población WT para exón 2 de *KRAS* (95). Este estudio fase III incluyó 592 pacientes sin encontrar diferencias significativas en TR, objetivo principal del estudio, aunque se observó beneficio significativo en términos de SG para los pacientes tratados con cetuximab siendo particularmente relevante al analizar dichos resultados en base al resultados de RAS. Se ha postulado que estas diferencias se puedan deber la profundidad y precocidad de respuesta al tratamiento que es mayor para la población tratada con el anti-EGFR implicando esto, una traducción en términos de SG tal y como ha mostrado el análisis radiológico centralizado del estudio.

Finalmente, el estudio PEAK se trata de un ensayo fase II que explora la combinación de FOLFOX con panitumumab o bevacizumab para población *KRAS* WT exón 2 (96). Con el análisis completo de RAS se objetivó beneficio en términos de SLP para los enfermos que se trataron con la combinación que incluía panitumumab .

En definitiva, todavía queda por establecer la secuencia óptima de tratamiento en la población RAS WT y, lo que pueda llegar a ser más relevante; cuales son los mecanismos por los cuales una población ultraseleccionada para respuesta a tratamiento basado en anti-EGFRs como son estos pacientes, pueden acabar desarrollando resistencia a dichos tratamientos.

#### *1.2.2.3.2. Factores de resistencia a terapia dirigida frente al factor de crecimiento epidérmico*

Tal y como se ha descrito anteriormente, el bloqueo de EGFR mediante anticuerpos monoclonales como cetuximab y panitumumab, constituye una estrategia eficaz particularmente cuando se indica basada desde un punto de vista molecular en aquellos pacientes cuyos tumores no tienen mutación a nivel de RAS. Sin embargo, cabe destacar que en algunos casos, aun tratándose de tumores RAS nativos, existen pacientes que no responden a dicho tratamiento.

Se han descrito distintos mecanismos potenciales de resistencia como la posibilidad de mutaciones a nivel de BRAF o PI3K (30), amplificación de HER2, MET o pérdida de expresión de PTEN (45, 97, 98). Todos estos factores tienen como característica común su interacción en la vía de EGFR en mayor o menor medida. Además de estas alteraciones moleculares como posibles factores predicciones negativos a terapia anti-EGFR, también se ha apuntado al número de copias del gen que codifica para EGFR como un posible biomarcador candidato para predecir respuesta a estos tratamientos (99). Sin embargo, la evaluación del número de copias del gen median-

te FISH (del inglés; *in situ fluorescence hybridation*) es una técnica que difiere entre los distintos laboratorios de patología molecular de modo que no hay un consenso acerca del punto de corte que debe considerarse para definirlo como un factor de predictor de resistencia a tratamiento (100). La sobreexpresión de HER3 y el factor de crecimiento de insulina tipo 1 también se ha postulado que pueden condicionar resistencia a la terapia anti-EGFR (101, 102). Por otro lado, incluso aquellos enfermos que responden a estas terapias, alcanzan refractariedad a las mismas en algún momento de su historia oncológica. Esto supondría lo que podríamos considerar resistencias adquiridas.

La resistencia a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR suele aparecer después de varios meses de tratamiento. Se desconoce el mecanismo subyacente, pero datos recientes han identificado las mutaciones de *KRAS* como impulsores potenciales y frecuentes de la resistencia adquirida a ambos anticuerpos monoclonales anti-EGFR, panitumumab y cetuximab. La expansión de los subclones con *KRAS* mutado así como las mutaciones de *KRAS* de novo en clones con *KRAS* inicialmente no mutado parecen contribuir a la aparición de resistencia mediada por *KRAS* después de iniciado el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Y lo que es más importante, los trabajos publicados por Misale et al y Diaz et al, indicaron que la incorporación de inhibidores MEK a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR pueden representar una estrategia racional para revertir la resistencia a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR (103, 104). Este potencial para el tratamiento combinado con inhibidores MEK y anticuerpos monoclonales anti-EGFR para revertir la resistencia adquirida está siendo investigado para revertir la resistencia primaria a los anticuerpos monoclonales anti-EGFR en tumores con *KRAS* mutado.

Otra aproximación que nos podríamos plantear para aumentar la efectividad en el bloqueo de la vía de señalización mediada por EGFR sería el bloquear otros receptores distintos de la misma familia. Los receptores EGFR 2 a 4 juegan un papel fundamental mediando interacciones entre receptores que procuran distintos mecanismos funcionales incluyendo co-activación y/o activación de otras vías alternativas de señalización. HER3 se encuentra mutado sólo ocasionalmente en CRCm, sin embargo se pueden detectar niveles elevados de mRNA y proteína (105-107). Se ha observado una alta expresión de ERBB3 en ciertos tumores como en el caso del CCR motivo por el que se ha pensado en el mismo como una potencial diana terapéutica fundamentalmente por la interacción que podría tener este receptor con otros de la misma familia. Además, distintos estudios han demostrado que ERBB3 podría tener un papel en la resistencia tumoral a terapias que pretenden bloquear EGFR y HER2.

En la actualidad existen numerosos compuestos en desarrollo frente a ERBB3 como ciertos anticuerpos monoclonales con gran afinidad específica para unirse a EGFR y ERBB3. Una vez este tipo de moléculas se unen a los mencionados receptores, se consigue evitar la unión de sus correspondientes ligandos dando lugar a la inhibición de la señalización mediada por la dimerización de EGFR/EGFR, EGFR/HER2, EGFR/HER3 y HER2/HER3. Distintos estudios preclínicos han puesto de manifiesto la potencial eficacia aportada por estos medicamentos en tumores de colon, pulmón, páncreas, mama u ovario (108, 109).

En relación a HER2 como diana en CRCm, también existe evidencia preclínica del potencial rol que podría jugar esta diana (97, 110). En el estudio publicado por Yonesaka et cols no sólo se evidencia la amplificación de HER2 como factor de resistencia intrínseca y adquirida a anti-EGFRs en líneas celulares sino que también se testa en pacientes (110). Se observó que la supervivencia era mayor para aquellos pacientes que no presentaban amplificación de HER2 y recibían cetuximab mostrando una SG de 515 vs 307 días, y SLP de 149 vs 89 días. Es más, la amplificación de HER2 se observó en una muestra tumoral obtenida posterior al tratamiento con cetuximab y no en la basal en dos de los pacientes que desarrollaron resistencia al mismo. El análisis de una cohorte adicional de 70 enfermos puso de manifiesto que aquellos pacientes que presentaban niveles plásmicos menores de heregulina (ligando HER3/4) tenían mayor probabilidad de respuesta a cetuximab. Estos resultados fueron consistentes con la determinación de la expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) en la muestra tumoral de 44 pacientes. En 7 casos en los que se había alcanzado resistencia a cetuximab, los niveles de heregulina eran mayores tras el tratamiento que antes del mismo. Por tanto, estos resultados nos indican que los mecanismos de resistencia intrínseca también pueden serlo de resistencia adquirida. De hecho, la amplificación de HER2 como un mecanismo de resistencia intrínseca también ha sido

descrita en un estudio basado en modelos marinos de CCR. Bertotti et al pusieron de manifiesto que aquellos especímenes que no presentaban respuesta al tratamiento aun teniendo un estado nativo de *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*, presentaban amplificación de HER2 (45). En un trabajo posterior llevado a cabo, se confirmó este hallazgo en una cohorte de pacientes con diagnóstico de CRCm, encontrándose la amplificación en un 51% de casos. Estos hallazgos han sido la base para el desarrollo de estudios clínicos dirigidos a esta población tras progresión a tratamiento con cetuximab o panitumumab.

En otra línea, las alteraciones a nivel del propio receptor tirosin-quinasa también pueden contribuir a la resistencia adquirida a terapias anti-EGFR. En el trabajo publicado por Montagut *et al*, se evidencia la presencia de la mutación a nivel del codón 494 (S492R) del gen de EGFR en líneas celulares que alcanzan resistencia a cetuximab. De forma interesante, estos clones sí presentaron respuesta a la introducción de gefitinib y panitumumab. De este modo, la mutación del receptor impediría la unión de cetuximab al receptor (111). La determinación de esta alteración molecular se llevó a cabo en 10 pacientes diagnosticados de CRCm que presentaron progresión de la enfermedad tras respuesta inicial a tratamiento con cetuximab. En 2 de 10 enfermos, se detectó la mutación S492R en las biopsias tumorales obtenidas tras el tratamiento y la progresión de la enfermedad. Uno de estos dos enfermos presentaba también mutación a nivel de BRAF (V600E) en las muestras basales y post-tratamiento pese a que se documentó respuesta al anti-EGFR. Cabe destacar que en ambos casos se detectó amplificación de EGFR en las dos muestras obtenidas. Uno de estos dos enfermos recibió tratamiento con panitumumab posteriormente llegando a alcanzar respuesta al mismo. Sin embargo, no se pudieron llevar a cabo nuevos análisis de potencial resistencia a la progresión de panitumumab tras 5 meses de tratamiento.

Este mismo grupo de trabajo, cursó la determinación de esta mutación de EGFR en 156 enfermos que no habían recibido tratamiento previo con cetuximab o panitumumab sin encontrar la alteración en ningún caso. Estos hallazgos fueron confirmados posteriormente en una cohorte de enfermos de iguales características por un grupo de trabajo distinto lo cual parece indicar que dicho evento se tratara de un factor de resistencia adquirida (112).

Como se ha comentado previamente, HGF tiene la capacidad de unirse al receptor de membrana de tipo tirosin-quinasa conocido como c-Met. Esta unión, da lugar a la estimulación de determinadas funciones celulares relacionadas con su desarrollo, regeneración tisular y homeostasis como pueden ser la mitogénesis o la morfogénesis. Esto sucede en una amplia variedad de estirpes celulares incluyendo células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas, neuronas, melanocitos y hepatocitos. Asimismo, la señalización mediada por HGF también contribuye a la oncogénesis y progresión tumoral en distintos tipos de tumores favoreciendo la capacidad de invasión celular asociada al potencial de metastatización. La vía de c-Met se encuentra desregulada en varios tipos de cáncer ya sea por sobreexpresión, amplificación o mutación. La alteración más frecuentemente observada en CRCm es la sobreexpresión y/o amplificación. De este modo, la activación de c-Met por HGF jugaría un papel fundamental en la capacidad de metastatización de las células de CRC a nivel hepático cooperando con la mutación de *KRAS* e incrementando el potencial oncológico de las células de CRCm (113). También cabe destacar que la sobreexpresión del receptor c-Met y su ligando HGF se ha correlacionado con estadios avanzados de CRC y pronóstico desfavorable (114). Existen, además, trabajos en líneas celulares de CRC que postulan la sobreexpresión de c-Met constituiría un factor de resistencia a terapias anti-EGFR (45, 115, 116). La activación del receptor tirosin-quinasa c-MET resultaría en una autofosforilación y unión del mismo a proteínas adaptadoras que llevaría a reclutar a otras moléculas asociadas a la cascada de señalización y activación de la vía que daría lugar a un incremento de la proliferación, supervivencia, potencial de migración y metastacización.

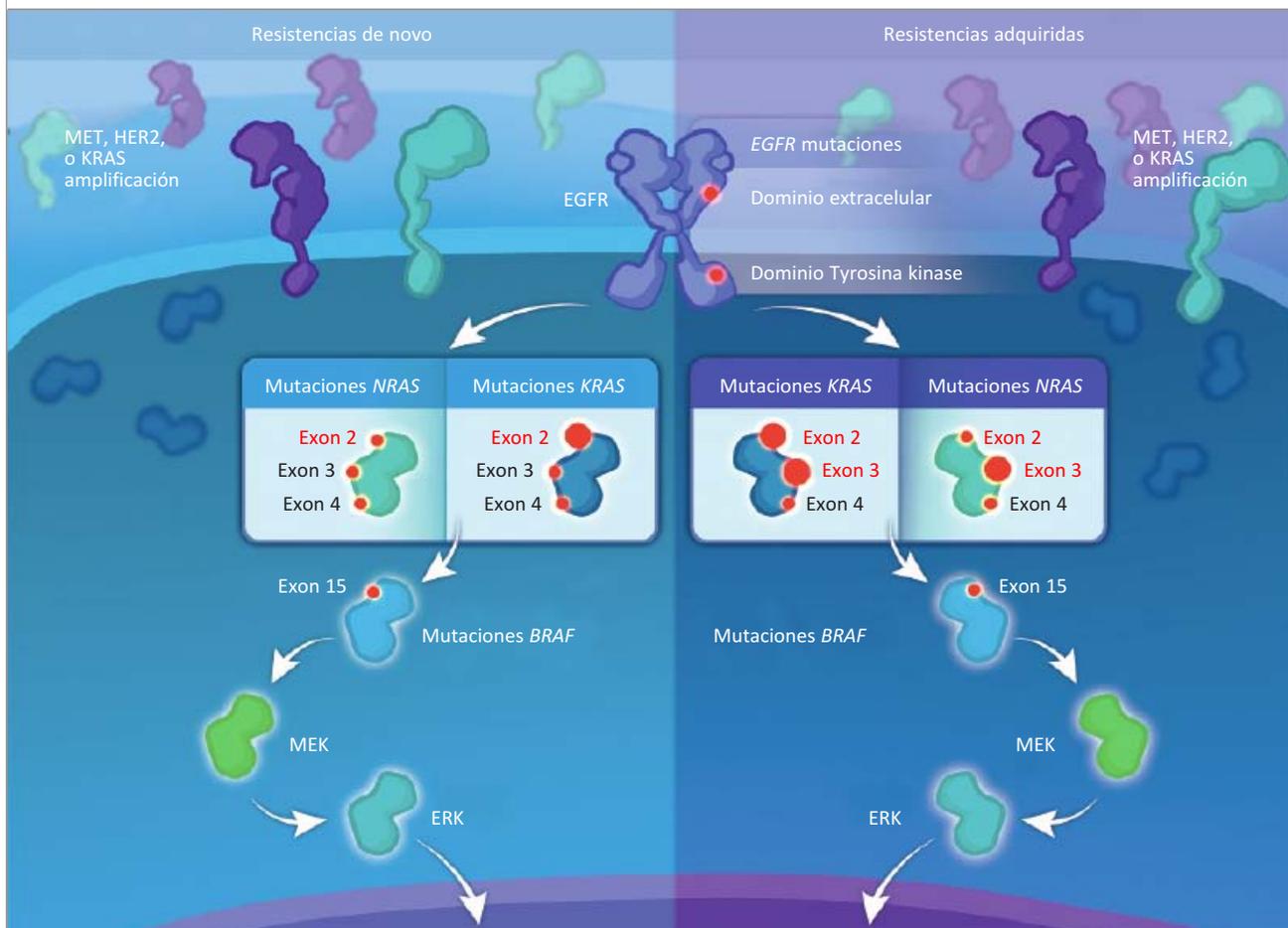
#### Convergencia de las vías de resistencia

Como se ha descrito, la evolución de la resistencia adquirida a terapias anti-EGFR se puede definir como la consecuencia de una perturbación en un sistema en el que el equilibrio está basado en células altamente dependientes de EGFR. El hallazgo de que la mayor parte de mutaciones que emergen tras el tratamiento, involucran genes que son miembros directos de la vía de señalización de EGFR (*EGFR*, *KRAS*; *NRAS* o *BRAF*) indica que para escapar de esta perturbación

las células deben establecer un nuevo equilibrio que debería ser de nuevo basado en salir en cierto modo de la vía de señalización de EGFR. Esta hipótesis viene soportada por el análisis bioquímico de modelos de líneas celulares de CCR que desarrollan resistencia a terapia anti-EGFR independientemente de genes/mutaciones que confieren resistencia, puesto que el desarrollo del mismo depende de una activación basada en la activación de MEK y ERK definiendo por tanto un ejemplo de una evolución convergente. De este modo, se podría postular que cuando se bloquea EGFR en un paciente con CCR con múltiples lesiones metastásicas, el efecto que ejerce la droga, desencadena la evolución bioquímica convergente de distintos clones cada uno de los cuales reactivaría la vía de EGFR. Así, pese a que cada metástasis desarrollaría lo que podrían considerarse factores de resistencia heterogéneos en realidad estarían altamente relacionados puesto que el objetivo final será reactivar la vía de EGFR.

Esto tendría cierto impacto en el desarrollo de drogas para este tipo de tumores. En primer lugar, este escenario homogeneizaría el perfil de resistencia ínter e intrapaciente. Por ejemplo, en pacientes con CCR que recibe terapias anti-EGFR, el abanico de alteraciones que pueden surgir tras la recaída convergerían a la activación del eje EGFR-RAS-MAPK. Así, en el momento de la progresión los distintos mecanismos de resistencia podrían ser interceptados interfiriendo en la cascada de señalización que es precisamente donde convergerían los distintos eventos genéticos, en este caso a nivel de MAP-ERK. En segundo lugar, se podría postular que se podría retrasar la aparición de resistencias desde el inicio se bloquearan aquellas moléculas o genes diana que sabemos están implicados en dichos mecanismos de resistencia como pudiera ser la asociación de un inhibidor de MEK a la terapia anti-EGFR. Ésta sería pues, la base para el desarrollo de nuevas drogas y combinaciones designadas no sólo a optimizar la respuesta a estos tratamientos sino también a prolongar su eficacia y retrasar la situación de progresión.

**FIGURA 7:** Mecanismos moleculares de resistencia primaria y secundaria a terapias anti-EGFR. Los mecanismos genéticos responsables de la resistencias de novo y adquiridas se solapan ampliamente a excepción de las mutaciones a nivel del receptor EGFR. Como punto común, convergen en la activación del eje de las MAP-quinasas, MEK y ERK.



### Tratamiento convencional del cáncer colorrectal metastásico: Puntos Clave

- La quimioterapia sigue siendo base del tratamiento del CCRm. Las opciones de tratamiento para esta población han evolucionado desde el empleo del 5-FU en monoterapia hasta la combinación de regímenes con oxaliplatino e irinotecán.
- El empleo de fármacos biológicos dirigidos frente a dianas moleculares como los anticuerpos antiangiogénicos: bevacizumab y aflibercept; anticuerpos anti-EGFR: cetuximab y panitumumab y el inhibidor multiquinasa regorafenib, es la maniobra que ha ofrecido mayor impacto en la supervivencia de estos pacientes.
- La evidencia derivada de estudios clínicos fase III prospectivos y aleatorizados todavía no han demostrado una secuencia preferente en lo que se refiere al empleo de anticuerpos antiangiogénicos o anti-EGFR y viceversa. La elección del tratamiento debe basarse en el objetivo del mismo y perfil de toxicidad del esquema seleccionado.
- El beneficio de los anticuerpos anti-EGFR viene supeditado a una subpoblación molecular concreta basada en la ausencia de mutación a nivel de los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* y *NRAS* y posiblemente a la ausencia de mutación a nivel de *BRAF*.
- La eficacia de los fármacos anti-EGFR está condicionada a determinados factores de resistencia entre los que destacan, alteraciones genéticas a nivel de la vía de señalización de RAS-RAF-MEK, mutaciones del receptor EGFR, señalización mediada por otros receptores EGFR o alteraciones que conllevan una desregulación en la vía de MET. Estos factores de resistencia constituyen, a su vez, base para el desarrollo de nuevos agentes dirigidos o nuevas estrategias terapéuticas investigacionales.

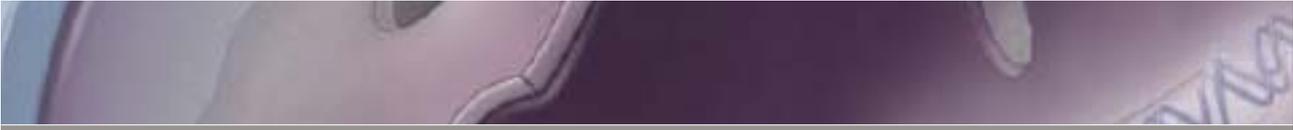
### 1.2.3. NUEVAS VÍAS DE INVESTIGACIÓN EN CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO

En la introducción de esta memoria se ha descrito la base molecular del CCR, las principales vías de señalización implicadas en la misma y alteraciones que llevan al desarrollo de la entidad, así como la identificación de dianas moleculares base para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Sin embargo, el empleo de nuevas técnicas de ultrasecuenciación han permitido un análisis molecular más exhaustivo del CCR tal y como se llevó a cabo por *The Cancer Genome Atlas Network* (117). Así, teniendo en cuenta la tasa de mutaciones, el CCR se podría clasificar en dos grupos: tumor hipermutados o no hipermutados. Los tumores hipermutados presentarían eventos somáticos ya sea en los genes reparadores o genes relacionados con la reparación del ADN lo que caracteriza a los tumores con IMS. Por contra, los tumores no hipermutados tendrían más alteraciones en el número de copias de genes y más incidencia de mutaciones a nivel de TP53. Cabe destacar que hasta en un 50% de los tumores hipermutados se encontraron mutaciones a nivel de *BRAF* o *TGFβR2* mientras que sólo se observó en un 5% de las muestras que habían sido clasificadas como no tumores no hipermutados. No sólo esto, sino que además, las mutaciones a nivel de *KRAS* y *PI3K* condicionan la activación de la vía las MAPK y PI3K en los tumores no hipermutados. Sin embargo, pese a estas diferencias la inactivación de la vía de señalización de WNT y la inactivación de la vía de TGFβ que resultan en un incremento de la transcripción de MYC son elementos prácticamente ubicuos en CCR. Otro tipo de alteraciones como a nivel de EGFR incluyendo la amplificación de EGFR2 también se describen en un grupo reducido de muestras de ambos subtipos. Por tanto, la complejidad del CRC va más allá de los biomarcadores hasta ahora descritos y sobretodo aquellos validados para decisión terapéutica que, a día de hoy; serían exclusivamente *KRAS* y *NRAS*.

Recientemente, varios grupos de investigación han aplicado métodos de agrupación no supervisada de datos genómicos para intentar definir los subtipos intrínsecos de CCR llegando a identificarse hasta 6 potenciales subgrupos. Sin embargo, existen tres subgrupos que se constatan independientemente del grupo de trabajo. De este modo, existiría un subtipo de tumores que serían hipermutados, con IMS, con mayor índice de mutaciones de BRAF que serían aquellos tumores que podríamos considerar de perfil inflamatorio. Un segundo subtipo serían tumores sin IMS de tipo epitelial proliferativo con una sobreactivación de la vía de WNT. Finalmente, existiría un tercer subtipo común identificado que consideraríamos de tipo mesenquimal caracterizado por ausencia de IMS y enriquecido por células madre pluripotenciales. Cabe decir, que pese a que existen ciertos subtipos bien identificados y caracterizados como los previamente descritos, las características clínicas y moleculares se solapan en mayor o menor medida dependiendo del trabajo publicado. Por este motivo, el *Colorectal Cancer Subtyping Consortium*, surge con objetivo de consensuar una clasificación molecular definitiva del CCR que sirva además como base para el desarrollo de nuevas vías de investigación y terapias dirigidas para cada subtipo molecular concreto. Así, podríamos hipotetizar que las alteraciones que hasta el momento hemos venido testando en la práctica clínica rutinaria es un modo muy grosero de clasificar este tipo de tumores. La clasificación molecular puede dar explicación al perfil pronóstico de cada uno de ellos así como de la respuesta o resistencia al tratamiento instaurado.

En cualquier caso, si bien esta es la dirección en la que está evolucionando la investigación en CCR; el modelo actual de desarrollo farmacológico se basa en la identificación de alteraciones moleculares concretas que vehiculicen una señalización aberrante subsidiaria de bloqueo farmacológico específico.

En el momento del desarrollo de los estudios clínicos objetivo de esta memoria, esta última fue la base para su diseño, hipótesis y objetivos tal y como se describe a continuación.



## 2. ARTICULOS DE TESIS

## 2.1. Artículo de tesis (I)

### 2.1.1. A PHARMACODYNAMIC/PHARMACOKINETIC STUDY OF FICLATUZUMAB IN PATIENTS WITH ADVANCED SOLID TUMORS AND LIVER METASTASES

Tabernero J, Elez ME, Herranz M, Rico I, Prudkin L, Andre J et al. Clinical cancer research; An official Journal of the American Association for Cancer Research. 2014; 20(10):2793-804.

## 2.2. Artículo de tesis (2)

### **2.2.1. ABITUZUMAB COMBINED WITH CETUXIMAB PLUS IRINOTECAN VERSUS CETUXIMAB PLUS IRINOTECAN ALONE FOR PATIENTS WITH KRAS WILD-TYPE METASTATIC COLORECTAL CANCER: THE RANDOMISED PHASE I/II POSEIDON TRIAL**

Elez E, Kokakova I, Hohler T, Mertens UM, Bokemeyer C, Van Cutsem E et al. *Annals of Oncology: official Journal of the European Society for Medical oncology / ESMO*. 2015; 26(1): 132-140

## 2.2.2. CONCLUSIONES ARTÍCULO DE TESIS (II)

Abituzumab o EMD 525797 es un antagonista del anticuerpo monoclonal IgG2 que actúa contra la subunidad  $\alpha v$  de los receptores de la integrina humana y que se ha desarrollado para el tratamiento del cáncer. Las integrinas son una familia de moléculas de adherencia celular que intervienen en una amplia variedad de interacciones entre las células y la matriz extracelular (MEC) y entre las células entre sí (118). Se trata de receptores transmembranarios heterodiméricos para las proteínas de la MEC, formados por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$  y se activan uniéndose a sus respectivos ligandos de la MEC. Después de esta interacción, las integrinas pueden poner en marcha cascadas de quinasas intracelulares para modular la proliferación y la supervivencia celulares, y asociarse al citoesqueleto de actina para dirigir la adhesión y la locomoción celulares (119).

EMD525797 se une específicamente a la cadena  $\alpha v$ , de forma que inhibe la unión de ligandos a todos los heterodímeros de dicha cadena ( $\alpha v 1\beta$ ,  $\alpha v 3\beta$ ,  $\alpha v 5\beta$ ,  $\alpha v 6\beta$ ,  $\alpha v 8\beta$ ). Las integrinas  $\alpha v$  se expresan en los vasos sanguíneos de los tumores angiogénicos proliferantes y en determinados tipos de células tumorales. Así mismo, en ciertos tumores; el aumento de la expresión de  $\alpha v 3\beta$  se asocia a un incremento de la invasión y la metástasis celulares (120). Se ha demostrado que los miembros de la familia de integrinas  $\alpha v$  desempeñan una función directa en la progresión tumoral, la angiogénesis tumoral y la metástasis (121). Los datos de inmunohistoquímica y los ensayos *in vitro* realizados con líneas celulares de CCR y con células endoteliales han demostrado que la integrina  $\alpha v$  se expresa en la vasculatura tumoral y en células de CCR (122). Por consiguiente, abituzumab tiene el potencial de inhibir la progresión tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis inducida por el propio tumor, la inhibición del crecimiento tumoral actuando directamente sobre las células neoplásicas y afectando a la migración y la extravasación de las células tumorales metastásicas.

Se ha demostrado que las integrinas diana  $\alpha v$  de EMD525797 se expresan en la vasculatura y células tumorales CCR. En muestras congeladas de CRC se ha detectado expresión de  $\alpha v 3\beta$  moderada a intensa en las células estromales y más pronunciada a nivel de los vasos sanguíneos, y una expresión moderada a intensa de  $\alpha v 5\beta$  en las células tumorales (122). Como se ha descrito previamente, también se ha propuesto que la expresión de las integrinas podría tener implicaciones pronósticas para el CCR. El análisis de la expresión de  $\alpha v 6\beta$  en pacientes con CCR puso de manifiesto que los pacientes con expresión elevada de  $\alpha v 6\beta$  presentan menor SG (63). Por otro lado, abituzumab ofrece también potencial antiangiogénico. De este modo, la actividad antiangiogénica del fármaco aumentaría su actividad en el tratamiento del CCRm.

Tras considerar los datos obtenidos de los modelos preclínicos mencionados y la eficacia de la combinación de irinotecán y cetuximab en pacientes con diagnóstico de CCRm *KRAS* exón 2 no mutado en el momento del desarrollo de dicho estudio, este protocolo se diseñó para evaluar la eficacia de la combinación de abituzumab, cetuximab e irinotecán en sujetos con CCRm *KRAS* exón 2 no mutado.

Los objetivos principales en la parte de seguridad del estudio fueron caracterizar el perfil de seguridad y tolerabilidad de la administración de diferentes niveles de dosis de EMD525797 en combinación con cetuximab e irinotecán en pacientes con CCRm de tipo *KRAS* wt a la progresión del tratamiento de primera línea basado en oxaliplatino. En la parte aleatorizada, se evaluó la actividad antineoplásica de dos dosis de abituzumab en lo que se refiere al tiempo de supervivencia sin progresión en pacientes con CCRm de tipo *KRAS* exón 2 no mutado después del fracaso del tratamiento de primera línea con una pauta con oxaliplatino. Como objetivos secundarios se estudió la eficacia de dos dosis de EMD525797 con respecto a la duración de la SG, el SLP, TR y el tiempo hasta el fracaso del tratamiento (TFT); el perfil farmacocinético de EMD525797 y sus efectos sobre cetuximab, y el perfil farmacocinética de cetuximab y su efecto sobre EMD525797. Cabe destacar que el estudio contemplaba como objetivos exploratorios el identificar posibles marcadores de predicción de la respuesta al tratamiento en investigación, estudiar la relación existente entre las proteínas candidatas circulantes en la sangre y/o expresadas por el tumor y los criterios de valoración de la eficacia y la seguridad, explorar el efecto de las variaciones genéticas en el genoma del anfitrión y/o en el genoma tumoral sobre los criterios de valoración de la eficacia y la seguridad y finalmente establecer una correlación entre modelos de expresión génica en muestras de sangre y/o en muestras tumorales y los criterios de valoración de la eficacia y la seguridad

Los resultados del estudio POSEIDON demuestran que la molécula a estudio, abituzumab; tiene un adecuado perfil de seguridad en combinación con irinotecán y cetuximab en la población a estudio llegando a alcanzar dosis de 1000 mg. En la parte aleatorizada del estudio fase II del estudio en que se incluyeron entorno a 70 pacientes con características clínicas bien balanceadas en cada una de las ramas de tratamiento, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en lo que se refiere a SLP, objetivo principal del estudio. Tampoco se encontraron diferencias en términos de TR aunque sí se evidenció una tendencia a la mejoría en lo que a SG se refiere para los pacientes tratados con la combinación investigacional respecto a los que recibieron sólo irinotecán y cetuximab. De forma interesante, aquellos pacientes cuyos tumores presentaban una alta expresión de integrina  $\alpha v \beta 6$  y que recibieron tratamiento dentro de algunas de las ramas que contenida abituzumab, presentaron mejor SG (rama A; HR 0.55 [0.30-1.00], rama B; HR 0.41 [0.21-0.81]).

Este es el primer estudio clínico publicado dirigido a pacientes con diagnóstico de CCRm que explora el papel de un anticuerpo anti-integrina. Como se ha descrito previamente, irinotecan en combinación con cetuximab a la progresión a terapia previa con oxaliplatino, tiene una actividad limitada en CCRm. Sin embargo, el análisis exploratorio pre-especificado en el estudio sugiere que abituzumab puede impactar en términos de SG en aquellos pacientes con tumores que expresen integrina  $\alpha v \beta 6$  constituyendo esta, una línea de investigación futura. Además, la expresión de  $\alpha v \beta 6$  constituiría un factor pronóstico negativo a tenor de la media de SG en los pacientes con expresión elevada de integrina  $\alpha v \beta 6$  que resulta ser entorno a 4 meses inferior respecto a los enfermos que con niveles bajos de la misma tal y como se había observado en estudios previos para enfermedad limitada. Sin embargo, los resultados obtenidos del estudio, sugieren que añadir abituzumab al tratamiento estándar en los pacientes con  $\alpha v \beta 6$  elevada reduciría el riesgo de muerte entorno a un 56% comparado con la rama de tratamiento estándar. La SLP y TR también tienden a mejorar cuando se selecciona la población en base a dicho biomarcador.

Cabe destacar que existen trabajos que postulan que la integrina  $\alpha v \beta 6$  está implicada en transición epitelio-mesénquima (TEM) que, a su vez, intensificaría el fenotipo agresivo de tumores epiteliales como el CCRm. El proceso de TEM también puede contribuir a la enfermedad metastásica, y los altos niveles de  $\alpha v \beta 6$  a nivel de las metástasis hepáticas y del sistema linfático sugieren que esta integrina conferiría mayor agresividad al CCRm. Por otro lado, esta integrina también es una factor activador de TGF- $\beta$  que, como se ha comentado previamente, también estimula el crecimiento e invasión tumorales durante la progresión del CCR. Por tanto, las terapias cuya diana sea  $\alpha v \beta 6$ , tendrían el potencial de interferir en la capacidad de invasión y metastatización de las células tumorales justificando así la mejoría obtenida en OS y PFS para los pacientes tratados con abituzumab y niveles altos de  $\alpha v \beta 6$ . Además, TGF- $\beta$  también tiene un papel clave en la regulación de la inmunidad y sabemos que las integrinas son elementos críticos para este proceso. Además, la capacidad de abituzumab para bloquear  $\alpha v \beta 6$  disminuiría la actividad inhibitoria de TGF- $\beta$  sobre la respuesta antitumoral siendo este otro potencial mecanismo de acción adicional para la molécula.

Cabe decir, que si bien los resultados particularmente obtenidos en esta población molecular seleccionada son muy alentadores, los datos deben interpretarse con cautela. Una de las limitaciones del estudio es que se trata de un estudio fase III y que los datos referentes a los biomarcadores explorados se basan en un análisis pre-especificado aunque puramente exploratorio. Se necesitan estudios adicionales para conformar el potencial valor pronóstico y predictivo de las integrinas  $\alpha v$  en pacientes con CRCm tratados con abituzumab.

En definitiva, nuestros datos indican que las terapias dirigidas a integrinas pueden tener un papel en el tratamiento del CRCm en poblaciones moleculares seleccionadas. Los análisis exploratorios desarrollados en el marco del estudio POSEIDON indican que el tratamiento basado en abituzumab puede ser de particular interés en aquellos pacientes con CCRm con niveles elevados de expresión de  $\alpha v \beta 6$  que, a su vez, se trataría de pacientes con particular mal pronóstico. Filiar el impacto real de esta potencial estrategia terapéutica, implica, sin embargo, el desarrollo y estandarización de una técnica diagnóstica adecuada y una población particularmente seleccionada.

## 3. DISCUSION

La investigación dirigida a profundizar los mecanismos moleculares de desarrollo y progresión del CCR ha permitido conocer eventos genéticos y epigenéticos fundamentales para su desarrollo así como vías de señalización celular cruciales para su progresión, supervivencia y potencial de metastacización. La investigación traslacional ha logrado, por tanto, acelerar la integración de la investigación básica y clínica permitiendo poner a disposición del paciente los últimos avances en investigación molecular, abordando la enfermedad desde todos los ángulos posibles y creando sinergias entre la investigación molecular y clínica a la vez que se emplean estos medios como plataforma clave en el proceso de desarrollo de fármacos. En el caso concreto del CCR, el empleo de biomarcadores se inició mediante la determinación del estado mutacional del exón 2 de *KRAS* como factor predictor de respuesta negativo para anticuerpos anti-EGFR. Hoy sabemos, que aquellos pacientes cuyos tumores presentan una mutación no sólo a nivel del exón 2 de *KRAS* sino también en los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* y *NRAS* no obtienen beneficio del tratamiento con estos fármacos siendo incluso detrimental su empleo. En el desarrollo de esta memoria se han tratado temas de particular relevancia en el marco de la investigación del CCRm en lo que se refiere a biología molecular, principales mecanismos de desarrollo y vías de señalización para supervivencia. Se han descrito las drogas empleadas en el tratamiento de esta entidad enfatizando aquellos dirigidos a dianas moleculares concretas como son los fármacos antiangiogénicos, inhibidores multi-quinasa y anticuerpos anti-EGFR incluyendo potenciales mecanismos moleculares de resistencia a los mismos. La evidencia presentada constata que cuando la indicación de las terapias diana se basa en la selección de pacientes con características moleculares concretas, el impacto en términos de TR, SLP y SG es mayor.

Las dos publicaciones aportadas exploran el papel de dos anticuerpos monoclonales dirigidos a potenciales dianas relevantes en CCRm como es el caso de flicatuzumab como anticuerpo anti-HGF capaz de interferir en la vía de señalización de MET, y abituzumab como anticuerpo anti-integrina  $\alpha v$  con capacidad antiproliferativa, antiangiogénica y moduladora de la vía de TGF $\beta$ . Ambos estudios podrían considerarse paradigma del desarrollo farmacológico de las terapias diana. Empezando por el diseño del estudio, es preciso mencionar que los estudios fase I permiten no sólo testar distintos esquemas y dosis de tratamiento, sino que paralelamente a los procedimientos realizados con este objetivo, se pueden asociar estudios de farmacodinámica en que se testa la diana biológica y respuesta en las células tumorales. La correlación de estos hallazgos con parámetros de farmacocinética, nos conducen a la interpretación de la dosis óptima de tratamiento tal y como se ha descrito para ambas drogas y en ambos casos con un perfil similar al tratarse de anticuerpos monoclonales. Y esto nos lleva a una segunda característica común para ambos estudios: la selección poblacional. En ambos estudios la selección poblacional se basa en características moleculares concretas siendo en el estudio POSEIDON la ausencia de mutación a nivel del exón 2 de *KRAS*, y la sobreexpresión de p-MET determinada por inmunohistoquímica en el estudio de flicatuzumab. Una de las críticas que podemos apuntar acerca del estudio POSEIDON es que, en el momento de su diseño, la indicación de los anticuerpos anti-EGFR venía supeditada a la ausencia de mutación en el exón 2 de *KRAS*. Como se ha mencionado previamente, se precisa el estado salvaje de los exones 2, 3 y 4 de *KRAS* y *NRAS* para obtener beneficio de estos fármacos. Así, los resultados obtenidos podrían verse condicionados por entorno a un 17% adicional de mutaciones que pudieran interferir en la eficacia del anticuerpo anti-EGFR tal y como se ha descrito previamente. El estudio

de ficlatuzumab basaba la inclusión de pacientes en histologías en que la vía de señalización de HGF/c-Met juega un papel relevante para su desarrollo, entre ellas CCR. De nuevo, las publicaciones más relevantes focalizadas en CCR que describen la amplificación o sobreexpresión de MET como un factor de resistencia a terapias anti-EGFR son posteriores al desarrollo de dicho estudio en que idealmente se debería haber restringido la población CCR a enfermos sin mutación a nivel de RAS, tratados previamente con fármacos anti-EGFR y con posterior constatación de alteración a nivel de Met en biopsia tumoral obtenida a la progresión de cetuximab o panitumumab. Alternativamente se podría haber seleccionado en base a presencia de mutación a nivel de KRAS. Precisamente siguiendo esta línea de investigación se ha desarrollado el estudio Mercuric del que el Vall d'Hebron Institut d'Oncologia es uno de los centros investigadores principales (123). Mercuric se trata de una colaboración paneuropea, financiada por el programa marco EU FP7, que se basa en usar una estrategia de ensayos clínicos basada en la medicina personalizada particularmente focalizada en dos proteínas clave para el CCR como son MEK y MET, que como se ha comentado están desregulados tanto en CCR RAS no mutado como RAS mutado. El estudio postula que una doble inhibición de MEK y MET en combinación puede impactar en supervivencia en pacientes con CCRm refractarios a tratamiento estándar. El estudio incluirá dos cohortes de pacientes. Por un lado, se reclutarán pacientes afectados de CCRm RAS no mutado en progresión a terapia anti-EGFR y con sobreexpresión o amplificación de MET en una biopsia tumoral obtenida previamente a la inclusión en el estudio. De este modo, la combinación investigacional trata uno de los potenciales mecanismos de resistencia a terapia anti-EGFR tal y como se ha constatado mediante biopsia. Por otro lado, existirá una cohorte de pacientes con CCRm RAS mutado. En este segundo grupo, sabemos que la inhibición de MEK1/2 como efector conocido en la cascada de señalización mediada por *EGFR* y *RAS*, es una potencial estrategia terapéutica de particular interés. Existen distintos modelos preclínicos in vivo que demuestran que los inhibidores de MEK pueden frenar el crecimiento de tumores CRC RAS mutado (124, 125). Sin embargo, el empleo del fármaco en monoterapia tiene una eficacia limitada debido a la activación de otras vías alternativas de resistencia o supervivencia, de ahí el racional de combinarlo con un inhibidor de MET (124). El ensayo clínico consta de un programa de investigación traslacional asociado que incluirá el empleo de técnicas de secuenciación de nueva generación (del inglés; *next generation sequencing*, NGS), asociadas a estrategias diagnósticas de micro-RNA con el objetivo de identificar subgrupos de pacientes que más puedan beneficiarse de estrategia terapéutica.

Si bien efectivamente los estudios presentan las mencionadas limitaciones, cabe decir que en ambos casos hemos constatado de una forma directa o indirecta el efecto que ejerce el fármaco dirigido frente a su diana. Esto lleva a preguntarnos el motivo por el que no hay una diferencia en términos de eficacia. A modo de ejemplo, en el caso de los pacientes con CCRm sin evidencia de mutación a nivel de RAS, BRAF o incluso otros biomarcadores no tan concluyentes como es el caso de *PIK3CA* o *PTEN*, seguimos sin identificar la causa por la que estos enfermos no llegan incluso ni a responder al tratamiento con anti-EGFRs. O por el contrario, en el caso de tumores con mutación a nivel de BRAF, podemos llegar a observar respuestas. Un fenómeno similar lo observamos en el caso de los estadios más precoces de CCR. Existen CCR en estadio II que presentan recurrencias precoces y estadios más avanzados como un CCR en estadio III, con afectación ganglionar N2 que no llegan a recaer nunca aun habiendo aplicado en ambos casos un tratamiento óptimo quirúrgico y sistémico con el mismo esquema de quimioterapia (126). De este modo, cuando clasificamos los tumores desde un punto de vista histopatológico, seguimos sin poder clasificar ciertos tumores de alto riesgo o bien, podríamos incluso llegar a sobretratar CCR sin apenas riesgo de recurrencia. Precisamente en el campo de la adyuvancia se han llevado a cabo estudios de firmas de expresión génica que predecirían el riesgo de recurrencia de estadios precoces de CCR. Oncotype DX® se basa en la expresión de 12 genes determinados en muestras de tumor parafinado que clasifica los tumores en alto, intermedio o bajo riesgo de recurrencia. ColoPrint® determina 18 genes en tejido congelado estableciendo alto o bajo riesgo de recaída. Ambos han sido validados en grandes series de pacientes con CCR. Cabe destacar que un hallazgo común en estos estudios es el alto grado de discordancia entre el riesgo de estratificación entre el perfil de expresión génica y los factores pronósticos anatomo-patológicos convencionales (127, 128). Por tanto, en la enfermedad metastásica podría darse un fenómeno similar en que la determinación y resultado determinados biomarcadores puede no ser suficiente para etiquetar el comportamiento de cada tipo de tumor concreto. Como se ha descrito previamente, varios grupos de investigación han aplicado métodos de agrupación no

supervisada de datos genómicos para intentar definir los subtipos intrínsecos de CCR. El *Colorectal Cancer Subtyping Consortium*, surge con objetivo de consensuar una clasificación molecular definitiva del CCR mediante el intercambio de datos a gran escala y un meta-análisis. Así, el CRCSC consiste en 6 grupos de investigación formados por más de 15 instituciones referentes en CCR que analizaron más de 30 cohortes de pacientes con datos de expresión abarcando múltiples plataformas y métodos de preparación de muestras. Cada uno de los 6 clasificadores que establecían de 3 a 6 subtipos moleculares distintos de CCR, se aplicó a una colección de 4000 muestras de CCR principalmente estadios II y III. La concordancia entre cada subtipo molecular y las características clínicas, moleculares y vinculadas a vías de señalización concretas se analizaron centralmente por un equipo independiente. El análisis de dichos datos mostró que, pese a la heterogeneidad en las cohortes y los métodos, el análisis de concordancia por subtipos estableció cuatro subtipos moleculares claros de CCR (del inglés; *clinical molecular subtypes*: CMS). De este modo, CMS1 o inflamatorio se tratarían de tumores hipermutados, con IMS y activación potente del sistema inmune. CMS2 o canónico, se trataría de un subtipo de tumores de tipo epitelial, sin IMS y con una activación pronunciada de la vía de WNT y MYC. El grupo CMS3 o metabólico estaría constituido por neoplasias epiteliales con una evidente desregulación metabólica. Finalmente, el subtipo CMS4 o mesenquimal en que tendría un papel fundamental la activación de la vía de TGF $\beta$ , presentaría invasión estromal y la angiogénesis tendría un papel relevante. En este último subtipo, el análisis proteómico objetiva la representación que tendrían moléculas como NOTCH, VEGFR o las integrinas. Por tanto, este trabajo pondría de manifiesto que, efectivamente; la clasificación del CCR iría más allá de los biomarcadores actualmente validados. Los resultados de este trabajo han sido base para diseñar el proyecto MoTriColor (del inglés; *Molecularly guided trials with specific treatment strategies in patients with advanced newly molecular defined subtypes of colorectal cancer*) (129). Se trata de un proyecto de investigación que pretende aplicar la clasificación molecular propuesta etiquetando a los pacientes en CMS1-4 de modo que en función del perfil diagnosticado el paciente tendría acceso a estudios clínicos diseñados específicamente para el subtipo molecular concreto al que pertenece. En el estudio POSEIDON, se consigue identificar una subpoblación de pacientes que, a la vez que parece presentar peor pronóstico, es la subgrupo de enfermos que más beneficio obtiene del tratamiento. Estos enfermos serían aquellos cuyos tumores exhiben una expresión alta de integrina  $\alpha v \beta 6$ . Como se ha mencionado, el subtipo molecular CMS4 o mesenquimal, se caracteriza por la activación de la vía de TGF $\beta$ , con importante componente de invasión estromal y procesos angiogénicos de los que las integrinas forman parte. Como centro coordinador del proyecto MoTriColor, se ha iniciado un proyecto paralelo que va a tener como objetivo tipificar por CMS los pacientes del estudio POSEIDON con alta expresión de  $\alpha v \beta 6$ . En caso de constatar que los pacientes con expresión elevada de dicha integrina presentan un perfil mesenquimal, el tratamiento con abituzumab sería una opción de tratamiento dentro de ensayo clínico para el subtipo CMS4.

En definitiva, ambas moléculas ofrecen un atractivo mecanismo de acción y base molecular para su empleo en el tratamiento del CCRm. Sin embargo, la indicación de las mismas puede optimizarse mediante una mejor selección poblacional como en pacientes que presenten un perfil molecular de tipo mesenquimal en que ambas vías de señalización (HGF/MET, Integrinas) tienen un papel fundamental por su interrelación con TGF $\beta$ .

## 4. CONCLUSIONES

1. El conocimiento de la biología molecular del CCR y en concreto las vías metabólicas y de señalización involucradas en la diferenciación, crecimiento y supervivencia celular han permitido el diseño de fármacos dirigidos a dianas clave en este tipo de tumor e identificar mecanismos de resistencia a los mismos.
2. La vía de señalización HGF/c-Met contribuye a la oncogénesis y progresión tumoral en distintos tipos de neoplasias favoreciendo la capacidad de invasión y metástasis. Esta vía, se encuentra desregulada en varios tipos tumorales por sobreexpresión, amplificación o mutación. La alteración más frecuentemente observada en CRCm es la sobreexpresión y/o amplificación constituyendo una potencial diana terapéutica para el tratamiento de esta entidad.
3. Ficlatusumab (SCH900105) es un anticuerpo humanizado que neutraliza la unión de HGF a c-Met inhibiendo así la fosforilación de c-Met. Ficlatusumab explorado a dosis de 2 mg (6 pacientes), 10 mg (7 pacientes) y 20 mg (6 pacientes) ev en ciclos de 14 días ha demostrado tener un perfil de seguridad aceptable presentando como toxicidad más habitual astenia, edema periférico, tos e hipoalbuminemia. Ninguno de estos eventos adversos llegó a cumplir criterios de toxicidad limitante de dosis reproduciendo los resultados previamente reportados para la molécula. La dosis recomendada de 20 mg/kg ev cada dos semanas se basa en criterios de tolerancia y, fundamentalmente; parámetros de farmacodinámica.
4. El mecanismo de acción de ficlatusumab ha sido corroborado en el estudio mediante la obtención de biopsias tumorales hepáticas antes y después de del tratamiento con el fármaco mediante la modulación de los biomarcadores p-Met, p-ERK, p-AKT y HGF. La administración de ficlatusumab a 20 mg/kg ev cada dos semanas disminuye los niveles tumorales de p-Met en un 53% p-ERK en un 43% y p-AKT en un 2% e incrementa los niveles de HGF en un 33%. Los niveles séricos de HGF se correlacionan con la dosis y número de ciclos de tratamiento administrados. Por todos estos motivos, la dosis biológica recomendada de ficlatusumab es 20 mg/kg ev cada dos semanas.
5. En el estudio P05670 no se llegaron a evidenciar respuestas parciales con ficlatusumab en CCR. Esto puede ser bien por no haber seleccionado correctamente la población a estudio o por requerir de la combinación con un agente dirigido que procure vencer mecanismos de supervivencia celular o resistencia asociados. Por tanto, el desarrollo de fármacos dirigidos a la vía de señalización de Met constituye una línea de investigación garantizada en el campo del CCR particularmente en aquellos pacientes que desarrollan resistencia a terapias anti-EGFR o con resistencias primarias a modo de mutación a nivel de RAS en cuyo caso la asociación a inhibidores de MEK tendría particular interés.

6. Las integrinas se encuentran sobreexpresadas de forma variable en CCR y están implicadas en fenómenos de progresión tumoral y metástasis confiriendo mal pronóstico a estas entidades.
7. Abituzumab (EMD525797) es un anticuerpo monoclonal dirigido a las integrinas  $\alpha v$  que ha demostrado presentar acción sinérgica con irinotecán y cetuximab en modelos preclínicos de CCR. La combinación de abituzumab con irinotecán y cetuximab explorado a dosis fijas de 250 mg, 500 mg, 750 mg o 1000 mg ha demostrado tener un adecuado perfil de seguridad siendo los efectos secundarios más frecuentemente observados; diarrea, mucositis y astenia sin llegar a cumplir criterios de toxicidad limitante de dosis. Las dosis recomendadas de 500 mg y 1000 mg para la parte aleatorizada del estudio POSEIDON se basaron en datos de farmacocinética y eficacia.
8. La triple combinación de cetuximab, irinotecan y abituzumab en segunda línea de tratamiento para pacientes con CCRm *KRAS* exón 2 no mutado a dosis de 500 mg o 1000 mg no ha demostrado un beneficio significativo en términos de SLP, objetivo principal del estudio; o SG. Sin embargo, se observa una tendencia a la mejoría en SG para aquellos pacientes tratados con abituzumab y con tumores con expresión alta de integrina  $\alpha v \beta 6$  indicando por un lado signos indirectos de la actividad del fármaco en cuanto a mecanismo de acción e indicando una posible población de pacientes que podrían beneficiarse de dicho tratamiento.
9. Incorporar pruebas de determinación de biomarcadores en los estudios clínicos permite, no sólo corroborar el mecanismo de acción del fármaco; sino también identificar posibles subpoblaciones de pacientes que más puedan beneficiarse del mismo. Sin embargo, los biomarcadores empleados de rutina como es el caso de *RAS/BRAF* en la práctica clínica rutinaria, o la determinación aislada de otros candidatos en el área investigacional como se ha descrito en esta memoria para p-Met o la integrina  $\alpha v \beta 6$ ; siguen presentando limitaciones puesto que aun constatando la acción del fármaco sobre la diana a estudio, no se obtiene traducción en términos de eficacia.
10. La selección poblacional basada en la caracterización molecular es fundamental para impactar en supervivencia cuando escogemos una terapia dirigida. Las características clínicas, histológicas y moleculares explican sólo parcialmente el comportamiento de estos tumores ya sea en cuanto a pronóstico o sensibilidad/resistencia a tratamiento. Por tanto, la clasificación molecular del CRC debe ser un objetivo primordial en la investigación de esta entidad puesto que las aplicaciones terapéuticas podrían suponer un nuevo paradigma en el tratamiento de la misma.

## 5. REFERENCIAS

1. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2012;62(4):220-41.
2. Lenz H ND, Innocenti F et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC): Expanded RAS analyses. . European Society of Medical Oncology Congress 2014; madrid2014.
3. Tabernero J, Elez ME, Herranz M, Rico I, Prudkin L, Andreu J, et al. A pharmacodynamic/pharmacokinetic study of ficlatuzumab in patients with advanced solid tumors and liver metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(10):2793-804.
4. Elez E, Kocakova I, Hohler T, Martens UM, Bokemeyer C, Van Cutsem E, et al. Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26(1):132-40.
5. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
6. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine*. 1988;319(9):525-32.
7. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nature genetics*. 1994;6(3):273-81.
8. Metzger U. Recent developments in molecular biology, screening, and treatment of colorectal cancer. *Current opinion in oncology*. 1990;2(4):738-46.
9. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007;13(28):3784-91.
10. Ponten J. Tumor biology--colorectal cancer as an illuminating example. *The European journal of surgery Supplement : = Acta chirurgica Supplement*. 1991(561):9-13.
11. Kitisin K, Mishra L. Molecular biology of colorectal cancer: new targets. *Seminars in oncology*. 2006;33(6 Suppl 11):S14-23.
12. Mader RM. Links between biology, prognosis and prediction of response to chemotherapy in colorectal cancer. *Onkologie*. 2006;29(7):334-41.
13. Walker J, Quirke P. Biology and genetics of colorectal cancer. *European journal of cancer*. 2001;37 Suppl 7:S163-72.
14. Barbier M, Attoub S, Calvez R, Laffargue M, Jarry A, Mareel M, et al. Tumour biology. Weakening link to colorectal cancer? *Nature*. 2001;413(6858):796.
15. Hemming AW, Davis NL, Kluftinger A, Robinson B, Quenville NF, Liseman B, et al. Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *Journal of surgical oncology*. 1992;51(3):147-52.
16. Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(18 Suppl):1S-13S.
17. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-54.
18. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *The New England journal of medicine*. 2008;358(11):1160-74.
19. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell*. 2003;12(3):541-52.
20. Weinberg RA. *The biology of cancer*. Second edition. ed. New York, NY, US: Garland Science; 2014. xx, 875 pages p.
21. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):459-65.
22. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103(2):211-25.
23. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer research*. 2012;72(10):2457-67.
24. Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D, et al. Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:127-55.
25. Marais R, Marshall CJ. Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer surveys*. 1996;27:101-25.
26. Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J, et al. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet*. 2008;Chapter 10:Unit 10 1.

27. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(35):5705-12.
28. Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(15):2011-9.
29. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296(5573):1655-7.
30. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *The Lancet Oncology*. 2010;11(8):753-62.
31. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2008.
32. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(2):127-37.
33. Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature*. 1984;311(5981):29-33.
34. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(18):6379-83.
35. Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*. 1995;376(6543):768-71.
36. Dietrich S, Abou-Rebyeh F, Brohmann H, Bladt F, Sonnenberg-Riethmacher E, Yamaai T, et al. The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Development*. 1999;126(8):1621-9.
37. Huelsenken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*. 2001;105(4):533-45.
38. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4(12):915-25.
39. Lai AZ, Abella JV, Park M. Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends in cell biology*. 2009;19(10):542-51.
40. Ma PC, Tretiakova MS, MacKinnon AC, Ramnath N, Johnson C, Dietrich S, et al. Expression and mutational analysis of MET in human solid cancers. *Genes, chromosomes & cancer*. 2008;47(12):1025-37.
41. Knudsen BS, Vande Woude G. Showering c-MET-dependent cancers with drugs. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(1):87-96.
42. Khoury H, Naujokas MA, Zuo D, Sangwan V, Frigault MM, Petkiewicz S, et al. HGF converts ErbB2/Neu epithelial morphogenesis to cell invasion. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(2):550-61.
43. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 2007;316(5827):1039-43.
44. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, Song Y, Dias-Santagata D, Lifshits E, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer cell*. 2010;17(1):77-88.
45. Bardelli A, Corso S, Bertotti A, Hobor S, Valtorta E, Siravegna G, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer discovery*. 2013;3(6):658-73.
46. Troiani T, Martinelli E, Napolitano S, Vitagliano D, Ciuffreda LP, Costantino S, et al. Increased TGF-alpha as a mechanism of acquired resistance to the anti-EGFR inhibitor cetuximab through EGFR-MET interaction and activation of MET signaling in colon cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(24):6751-65.
47. Zhang YW, Wang LM, Jove R, Vande Woude GF. Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene*. 2002;21(2):217-26.
48. Sulpice E, Ding S, Muscatelli-Groux B, Berge M, Han ZC, Plouet J, et al. Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 2009;101(9):525-39.
49. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(5):387-98.
50. Boon EM, van der Neut R, van de Wetering M, Clevers H, Pals ST. Wnt signaling regulates expression of the receptor tyrosine kinase met in colorectal cancer. *Cancer research*. 2002;62(18):5126-8.
51. Liu Y, Chattopadhyay N, Qin S, Szekeres C, Vasylyeva T, Mahoney ZX, et al. Coordinate integrin and c-Met signaling regulate Wnt gene expression during epithelial morphogenesis. *Development*. 2009;136(5):843-53.
52. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes & development*. 2004;18(18):2225-30.
53. O'Brien BL, DiPalma JA. Molecular biology and colorectal cancer: genetic alterations, inherited syndromes, and applications to colon cancer screening. *Digestive diseases*. 1995;13(3):182-9.
54. Allen JI. Molecular biology of colon polyps and colon cancer. *Seminars in surgical oncology*. 1995;11(6):399-405.
55. Bellam N, Pasche B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. *Cancer treatment and research*. 2010;155:85-103.
56. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008;358(19):2039-49.
57. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2335-42.
58. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(12):2013-9.

59. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology*. 2006;18(5):516-23.
60. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(10):816-26.
61. Assoian RK, Klein EA. Growth control by intracellular tension and extracellular stiffness. *Trends in cell biology*. 2008;18(7):347-52.
62. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nature medicine*. 2002;8(9):918-21.
63. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, Maynard E, Wu B, Kawakatsu H, et al. Transcriptional activation of integrin beta6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):339-47.
64. Petrelli N, Douglass HO, Jr., Herrera L, Russell D, Stablein DM, Bruckner HW, et al. The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: a prospective randomized phase III trial. *Gastrointestinal Tumor Study Group. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1989;7(10):1419-26.
65. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(16):2938-47.
66. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(12):2006-12.
67. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000;355(9209):1041-7.
68. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(2):229-37.
69. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(7):1209-14.
70. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, Topham C, James R, Gwyther SJ, et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9582):143-52.
71. Koopman M, Antonini NF, Douma J, Wals J, Honkoop AH, Erdkamp FL, et al. Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9582):135-42.
72. Ducreux M, Malka D, Mendiboure J, Etienne PL, Texereau P, Auby D, et al. Sequential versus combination chemotherapy for the treatment of advanced colorectal cancer (FFCD 2000-05): an open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2011;12(11):1032-44.
73. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(13):1670-6.
74. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2011;369(11):1023-34.
75. Heinemann V, Stintzing S. FOLFIRI with cetuximab or bevacizumab: FIRE-3-authors' reply. *The Lancet Oncology*. 2014;15(13):e583-4.
76. Venook A ND, Lenz H et al. CALGB/SWOG 80405: Phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/LV (mFOLFOX6) with bevacizumab or cetuximab for patients with KRAS wild type untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum. *Journal of Clinical Oncology* 2014. p. 32:5s, 2014 (suppl; abstr LBA3).
77. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2014;371(17):1609-18.
78. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(12):1539-44.
79. Bannoun J, Sastre J, Arnold D, Osterlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(1):29-37.
80. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(28):3499-506.
81. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2012;381(9863):303-12.
82. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(31):4697-705.
83. Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357(20):2040-8.

84. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2008;359(17):1757-65.
85. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, et al. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(13):1658-64.
86. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(10):1626-34.
87. Price TJ, Peeters M, Kim TW, Li J, Cascinu S, Ruff P, et al. Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(6):569-79.
88. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(4):337-45.
89. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(14):2311-9.
90. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(31):4706-13.
91. Seymour MT, Brown SR, Middleton G, Maughan T, Richman S, Gwyther S, 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. *The Lancet Oncology*. 2013;14(8):749-59.
92. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;360(14):1408-17.
93. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(5):663-71.
94. Tveit KM, Guren T, Glimelius B, Pfeiffer P, Sorbye H, Pyrhonen S, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(15):1755-62.
95. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(10):1065-75.
96. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, Fasola G, Canon JL, Hecht JR, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(21):2240-7.
97. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, et al. A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer discovery*. 2011;1(6):508-23.
98. Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, et al. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *British journal of cancer*. 2007;97(8):1139-45.
99. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *The Lancet Oncology*. 2005;6(5):279-86.
100. Sartore-Bianchi A, Fieuws S, Veronese S, Moroni M, Personeni N, Frattini M, et al. Standardisation of EGFR FISH in colorectal cancer: results of an international interlaboratory reproducibility ring study. *Journal of clinical pathology*. 2012;65(3):218-23.
101. Scartozzi M, Mandolesi A, Giampieri R, Bittoni A, Pierantoni C, Zaniboni A, et al. The role of HER-3 expression in the prediction of clinical outcome for advanced colorectal cancer patients receiving irinotecan and cetuximab. *The oncologist*. 2011;16(1):53-60.
102. Scartozzi M, Mandolesi A, Giampieri R, Pierantoni C, Loupakis F, Zaniboni A, et al. Insulin-like growth factor 1 expression correlates with clinical outcome in K-RAS wild type colorectal cancer patients treated with cetuximab and irinotecan. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;127(8):1941-7.
103. Diaz LA, Jr., Williams RT, Wu J, Kinde I, Hecht JR, Berlin J, et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*. 2012;486(7404):537-40.
104. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*. 2012;486(7404):532-6.
105. Hu YP, Venkateswarlu S, Sergina N, Howell G, St Clair P, Humphrey LE, et al. Reorganization of ErbB family and cell survival signaling after Knock-down of ErbB2 in colon cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(29):27383-92.
106. Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrris A, Rontogianni D, Xiros N, Patsouris E, et al. Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. *BMC cancer*. 2006;6:46.
107. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(7):463-75.
108. Schaefer G, Haber L, Crocker LM, Shia S, Shao L, Dowbenko D, et al. A two-in-one antibody against HER3 and EGFR has superior inhibitory activity compared with monospecific antibodies. *Cancer cell*. 2011;20(4):472-86.

109. Huang S, Li C, Armstrong EA, Peet CR, Saker J, Amler LC, et al. Dual targeting of EGFR and HER3 with MEHD7945A overcomes acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer research*. 2013;73(2):824-33.
110. Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, et al. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Science translational medicine*. 2011;3(99):99ra86.
111. Montagut C, Dalmases A, Bellosillo B, Crespo M, Pairet S, Iglesias M, et al. Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer. *Nature medicine*. 2012;18(2):221-3.
112. Esposito C, Rachiglio AM, La Porta ML, Sacco A, Roma C, Iannaccone A, et al. The S492R EGFR ectodomain mutation is never detected in KRAS wild-type colorectal carcinoma before exposure to EGFR monoclonal antibodies. *Cancer biology & therapy*. 2013;14(12):1143-6.
113. Seiden-Long IM, Brown KR, Shih W, Wigle DA, Radulovich N, Jurisica I, et al. Transcriptional targets of hepatocyte growth factor signaling and Ki-ras oncogene activation in colorectal cancer. *Oncogene*. 2006;25(1):91-102.
114. Van Cutsem E, Eng C, Nowara E, Swieboda-Sadlej A, Tebbutt NC, Mitchell E, et al. Randomized phase Ib/II trial of rilotumumab or ganitumab with panitumumab versus panitumumab alone in patients with wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 20(16):4240-50.
115. Diaz LA, Jr., Sausen M, Fisher GA, Velculescu VE. Insights into therapeutic resistance from whole-genome analyses of circulating tumor DNA. *Oncotarget*. 2013;4(10):1856-7.
116. Mohan S, Heitzer E, Ulz P, Lafer I, Lax S, Auer M, et al. Changes in colorectal carcinoma genomes under anti-EGFR therapy identified by whole-genome plasma DNA sequencing. *PLoS genetics*. 2014;10(3):e1004271.
117. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487(7407):330-7.
118. Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(5):495-507.
119. Goel HL, Languino LR. Integrin signaling in cancer. *Cancer treatment and research*. 2004;119:15-31.
120. Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clinical & experimental metastasis*. 2002;19(5):427-36.
121. Nemeth JA, Nakada MT, Trikha M, Lang Z, Gordon MS, Jayson GC, et al. Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. *Cancer investigation*. 2007;25(7):632-46.
122. Max R, Gerritsen RR, Nooijen PT, Goodman SL, Sutter A, Keilholz U, et al. Immunohistochemical analysis of integrin alpha v beta3 expression on tumor-associated vessels of human carcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1997;71(3):320-4.
123. SCHAEYBROECK SV. European Commission. 2014.
124. Little AS, Balmanno K, Sale MJ, Newman S, Dry JR, Hampson M, et al. Amplification of the driving oncogene, KRAS or BRAF, underpins acquired resistance to MEK1/2 inhibitors in colorectal cancer cells. *Science signaling*. 2011;4(166):ra17.
125. Yoon J, Koo KH, Choi KY. MEK1/2 inhibitors AS703026 and AZD6244 may be potential therapies for KRAS mutated colorectal cancer that is resistant to EGFR monoclonal antibody therapy. *Cancer research*. 2011;71(2):445-53.
126. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(23):2343-51.
127. Gray RG, Quirke P, Handley K, Lopatin M, Magill L, Baehner FL, et al. Validation study of a quantitative multigene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for assessment of recurrence risk in patients with stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(35):4611-9.
128. Salazar R, Roepman P, Capella G, Moreno V, Simon I, Dreezen C, et al. Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(1):17-24.
129. Consortium CCS. European Commission Horizon 2020. 2015.

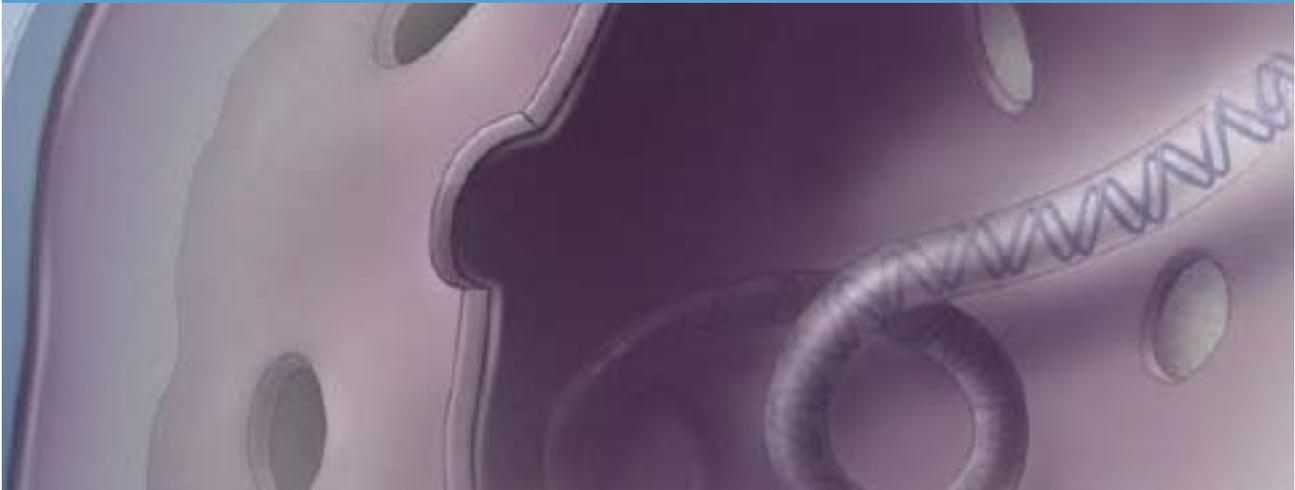
## 6. APENDICE: OTRAS PUBLICACIONES

### 6.1.

### Publicaciones relacionadas con nuevas terapias dirigidas en cáncer colorrectal metastásico y biomarcadores pronósticos y de resistencia a tratamiento sistémico

- Van Cutsem E, Eng C, Nowara E, Swieboda-Sadlej A, Tebbutt NC, Mitchell E, Davidenko I, Stephenson J, Elez E, Prenen H, Deng H, Tang R, McCaffery I, Oliner KS, Chen L, Gansert J, Loh E, Smethurst D, Tabernero J. Randomized phase Ib/II trial of rilotumumab or ganitumab with panitumumab versus panitumumab alone in patients with wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Aug 15;20(16):4240-50
- Siena S, Van Cutsem E, Li M, Jungnelius U, Romano A, Beck R, Bencardino K, Elez ME, Prenen H, Sanchis M, Sartore-Bianchi A, Tejpar S, Gandhi A, Shi T, Tabernero J. Phase II open-label study to assess efficacy and safety of lenalidomide in combination with cetuximab in KRAS-mutant metastatic colorectal cancer. *PLoS One.* 2013 Nov 11;8(11):e62264
- Sotelo MJ, Sastre J, Maestro ML, Veganzones S, Viéitez JM, Alonso V, Grávalos C, Escudero P, Vera R, Aranda E, García-Alfonso P, Gallego-Plazas J, Lopez C, Pericay C, Arrivi A, Vicente P, Ballesteros P, Elez E, López-Ladrón A, Díaz-Rubio E. Role of circulating tumor cells as prognostic marker in resected stage III colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2015 Mar;26(3):535-41
- Katsila T, Juliachs M, Gregori J, Macarulla T, Villarreal L, Bardelli A, Torrance C, Elez E, Tabernero J, Villanueva J. Circulating pEGFR is a candidate response biomarker of cetuximab therapy in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2014 Dec 15;20(24):6346-56
- Dienstmann R, Serpico D, Rodon J, Saura C, Macarulla T, Elez E, Alsina M, Capdevila J, Perez-Garcia J, Sánchez-Ollé G, Aura C, Prudkin L, Landolfi S, Hernández-Losa J, Vivancos A, Tabernero J. Molecular profiling of patients with colorectal cancer and matched targeted therapy in phase I clinical trials. *Mol Cancer Ther.* 2012 Sep;11(9):2062-71
- Moutinho C, Martínez-Cardús A, Santos C, Navarro-Pérez V, Martínez-Balibrea E, Musulen E, Carmona FJ, Sartore-Bianchi A, Cassingena A, Siena S, Elez E, Tabernero J, Salazar R, Abad A, Esteller M. Epigenetic inactivation of the BRCA1 interactor SRBC and resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014 Jan;106(1):djt322
- Dopeso H, Mateo-Lozano S, Elez E, Landolfi S, Ramos Pascual FJ, Hernández-Losa J, Mazzolini R, Rodrigues P, Bazzocco S, Carreras MJ, Espín E, Armengol M, Wilson AJ, Mariadason JM, Ramon Y Cajal S, Tabernero J, Schwartz S Jr, Arango D. 14. Aprataxin tumor levels predict response of colorectal cancer patients to irinotecan-based treatment. *Clin Cancer Res.* 2010 Apr 15;16(8):2375-82
- Elez ME, Tabernero J, Geary D, Macarulla T, Kang SP, Kahatt C, Pita AS, Teruel CF, Siguero M, Cullell-Young M, Szyldergemajn S, Ratain MJ. First-in-human phase I study of Lurbinectedin (PM01183) in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2014 Apr 15;20(8):2205-14.
- Angevin E, Tabernero J, Elez E, Cohen SJ, Bahleda R, van Laethem JL, Ottensmeier C, Lopez-Martin JA, Clive S, Joly F, Ray-Coquard I, Dirix L, Machiels JP, Steven N, Reddy M, Hall B, Puchalski TA, Bandekar R, van de Velde H, Tromp B, Vermeulen J, Kurzrock R. A phase I/II, multiple-dose, dose-escalation study of siltuximab, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2014 Apr 15;20(8):2192-204
- Cervantes A, Elez E, Roda D, Ecsedy J, Macarulla T, Venkatakrishnan K, Roselló S, Andreu J, Jung J, Sanchis-Garcia JM, Piera A, Blasco I, Maños L, Pérez-Fidalgo JA, Fingert H, Baselga J, Tabernero J. Phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic study of MLN8237, an investigational, oral, selective aurora A kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2012 Sep 1;18(17):4764-74.
- Macarulla T, Cervantes A, Elez E, Rodríguez-Braun E, Baselga J, Roselló S, Sala G, Blasco I, Danaee H, Lee Y, Ecsedy J, Shinde V, Chakravarty A, Bowman D, Liu H, Eton O, Fingert H, Tabernero J. Phase I study of the selective Aurora A kinase inhibitor MLN8054 in patients with advanced solid tumors: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Mol Cancer Ther.* 2010 Oct;9(10):2844-52





**NUEVAS TERAPIAS EN CÁNCER COLORRECTAL METASTÁSICO REFRACTARIO:  
PAPEL DE LOS FÁRMACOS QUE INTERFIEREN EN LA VÍA DE MET E INTEGRINAS**

**M<sup>a</sup> Elena Élez Fernández**