

Masterthesis

**Personalisierte Therapiekonzepte  
durch umfassende molekulare Profilierung  
bei biliären Tumoren**

**Review der Literatur und Analyse retrospektiver Daten  
aus dem Tumorzentrum Oberösterreich**

Eingereicht von

**Bernhard Doleschal**

Zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science in Medizinischer Genetik  
(MSc)**

Ausgeführt am

Ordensklinikum Linz- Gastrointestinal Cancer Center

Unter der Anleitung von

Dozent Dr. Holger Rumpold

Linz, 18.9.2023

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Linz, am 18.09.2023 Bernhard Doleschal*

## Zusammenfassung

Biliäre Tumore sind trotz einer steigenden Inzidenz eine seltene Tumorentität. Aufgrund eines klinisch oft lange inapparenten Verlaufs und fehlender Strategien zur Früherkennung ist zum Zeitpunkt der Diagnose häufig bereits eine chirurgische Resektion nicht mehr möglich, sodass palliative Therapiekonzepte im Vordergrund stehen. Die Chemotherapie mit Gemcitabin und Cisplatin +/- Checkpointinhibitor stellt zwar weiterhin den Standard dar, erste Studien mit molekularen Ansätzen in selektionierten Patientenkollektiven sind jedoch sehr vielversprechend und unterstreichen den Einzug der personalisierten Medizin in die Therapie biliärer Tumore sowie die zunehmende Bedeutung einer frühzeitigen umfassenden molekularen Charakterisierung. Aufgrund der noch geringen Inzidenz biliärer Tumore und der Vielzahl an potentiell angreifbaren molekularen Targets ergibt sich ein sehr heterogenes Bild biliärer Tumore, an der sich die Effektivität von Therapiestrategie mit einem singulären Target in prospektiven randomisierten Studien meist nur unzureichend beschreiben lässt. Evidenz kommt meist aus tumoragnostischen Studien oder Extrapolation von Studiendaten aus anderen Tumorentitäten. Real World Daten zur klinischen Effektivität zielgerichteter Therapieansätze könnte hier eine wertvolle Ergänzung sein.

Diese Masterarbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung der molekularen Diagnostik und den daraus abgeleiteten Therapieoptionen für Patienten mit fortgeschrittenem Gallenwegskarzinomen an einem Kollektiv des Tumorzentrums OÖ. Es wurde eine eingehende klinische und molekulare Charakterisierung der erhobenen Patientendaten durchgeführt. Die molekulare Analyse umfasste Immunhistochemie (IHC) und vor allem next-generation-sequencing (NGS). Bei 37.9% der Patienten konnte ein molekulares Target identifiziert und adressiert werden. Anhand der erhobenen Daten aus dem Tumorzentrum OÖ lässt sich zeigen, dass Patienten mit Gallenwegskarzinomen, die eine molekular informierte Therapie erhalten haben einen Überlebensvorteil im Vergleich zu ausschließlich chemotherapierten Patienten aufweisen.

Diese Arbeit bestätigt somit Empfehlungen der European Society for Medical Oncology (ESMO) zur umfassenden molekularen Diagnostik aller biliären Tumoren, an einer real world Kohorte.

## Abstract

Biliary tumors, despite a rising incidence, remain a rare malignancy. Due to a clinically often insidious course and a lack of early detection strategies, surgical resection is frequently unfeasible by the time of diagnosis, necessitating palliative treatment approaches. While chemotherapy with gemcitabine and cisplatin, with or without checkpoint inhibitors, remains the standard, preliminary studies on molecular approaches in selected patient cohorts are promising, highlighting the integration of personalized medicine into biliary tumor treatment and emphasizing the increasing significance of an early comprehensive molecular characterization. Given the still-low incidence of biliary tumors and the plethora of potential molecular targets, there is a highly heterogeneous presentation of these tumors. The effectiveness of therapeutic strategies targeting a single molecule is often inadequately described in prospective randomized studies. Evidence typically stems from tumor-agnostic studies or extrapolations from data on other malignancies. Real-world data on the clinical efficacy of targeted therapeutic approaches might offer valuable insights.

This Master's thesis addresses the role of molecular diagnostics and the resultant therapeutic options for patients with advanced cholangiocarcinoma, based on a cohort from the Tumor Center of Upper Austria (OÖ). An in-depth clinical and molecular characterization of the collected patient data was executed. The molecular analysis involved immunohistochemistry (IHC) and predominantly next-generation sequencing (NGS). In 37.9% of patients, a molecular target was identified and addressed. Data from the Tumor Center OÖ suggests that cholangiocarcinoma patients who underwent molecularly-informed treatment had a survival advantage compared to those who received chemotherapy alone.

This research thus corroborates the European Society for Medical Oncology (ESMO) recommendations for comprehensive molecular diagnostics of all biliary tumors, validated on a real-world cohort.

## Inhalt

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1. Definition .....	1
1.2. Epidemiologie biliärer Tumore .....	2
1.3. Ätiologie, Risikofaktoren .....	3
1.4. Klinik .....	4
1.5. Molekulare Heterogenität .....	5
1.6. Epidemiologie, Risikofaktoren, Klinik, charakteristische molekulare Alterationen und Therapiestrategien biliärer Tumore auf einen Blick .....	9
1.7. Diagnosestellung und Staging .....	9
1.8. Analyseverfahren .....	14
1.9. Therapeutische Strategien bei biliären Tumoren .....	19
1.9.1 Kurative Situation .....	19
1.9.2 Palliative Situation .....	21
1.9.2.1 Chemotherapie + Immuntherapie .....	21
1.9.2.2. Molekular informierte Therapiestrategien an nicht selektionierten Patienten .....	22
1.9.2.3 Therapiestrategien an molekular selektionierten Patienten .....	22
1.9.2.4. Ausgewählte molekulare Targets .....	24
IDH1 .....	24
FGFR2 .....	26
ERBB2 .....	29
BRAF .....	31
KRAS .....	33
MSI .....	34
Weitere therapeutisch relevante genetische Alterationen .....	36
1.10. ESCAT (ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets) ...	38
<b>2. Retrospektive Datenerhebung am Tumorzentrum OÖ</b> .....	40
2.1. Einleitung .....	40
2.1.1. Zielsetzung der Studie .....	40
2.2. Methoden .....	41
2.2.1. Molekulare Profilierung und Klassifikation von Mutationen .....	41
2.2.2. Statistik .....	42
2.3. Ergebnisse .....	42

2.3.1. Patientencharakteristika .....	43
2.3.2. Charakterisierung der genetischen Alterationen und klinische Annotation analog ESCAT .....	45
2.3.3. Charakterisierung der Effektivität von zielgerichteten Therapiestrategien in der klinischen Routine .....	47
2.4. Diskussion.....	49
<b>3. Synopsis und Ausblick.....</b>	<b>52</b>
<b>4. Referenzen .....</b>	<b>53</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Definition

Maligne biliäre Neoplasien, auch als Cholangiokarzinome (CCA, CCC, BTC) bekannt, repräsentieren eine heterogene Gruppe epithelialer Tumoren, die typischerweise eine cholangiozytäre Differenzierung aufweisen. Die Klassifikation dieser Gallenwegskarzinome basiert auf ihrer anatomischen Lokalisation: Das intrahepatische CCA (iCCA), welches proximal der Bifurkation liegt; das perihiläre CCA (pCCA), auch als Klatskin-Tumor bezeichnet; die distalen Karzinome, die sich unterhalb des Zystikusabgangs befinden (dCCA); sowie das Karzinom der Gallenblase (GBC) (siehe Abbildung 1). Tumoren der Ampulla Vateri werden je nach ihrer molekularen Charakteristik ebenfalls zu den biliären Neoplasien gezählt. Beim iCCA werden zwei primäre histologische Typen unterschieden: Das sogenannte Small-Duct-iCCA und das Large-Duct-iCCA. Während das Small-Duct-iCCA typischerweise ein noduläres Wachstumsmuster und minimale bis keine Muzinproduktion zeigt und sich infiltrierend ins Leberparenchym ausbreitet, findet das Large-Duct-iCCA seinen Ursprung in den größeren intrahepatischen Gallengängen und besteht aus muzinproduzierenden Tumorzellen.(1–3)

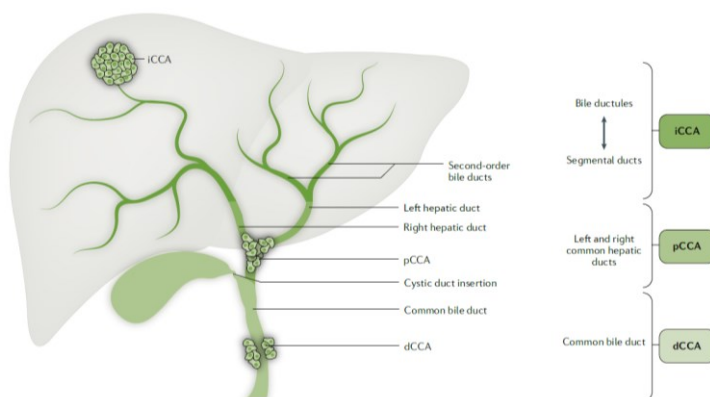


Abbildung 1: Darstellung der anatomischen Subtypen biliärer Tumore. (2)

Diese rein anatomische Unterscheidung ist aufgrund unterschiedlicher Risikofaktoren, Unterschiede in Bezug auf molekulare und klinische Charakteristika und unterschiedlicher Therapieansätze- chirurgisch, systemtherapeutisch oder lokal-ablativ- hoch relevant.

## 1.2. Epidemiologie biliärer Tumore

Obwohl die Inzidenz biliärer Tumoren zunimmt, zählen sie weiterhin zu den selteneren malignen Entitäten. Es zeigt sich eine bemerkenswerte regionale Varianz in den Inzidenzraten. Insbesondere im südostasiatischen Raum sind überdurchschnittlich hohe Inzidenzen zu verzeichnen, vor allem bei eCCA. Im Gegensatz dazu beobachtet man in den westlichen Nationen einen Anstieg in der Inzidenz von iCCA (vergleiche Abbildung 2). In Deutschland beträgt die Gesamtinzidenz mehr als 7.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Basierend auf diesen Daten wird in Österreich eine Inzidenz von schätzungsweise 600 bis 700 Neuerkrankungen jährlich erwartet.(4–6)

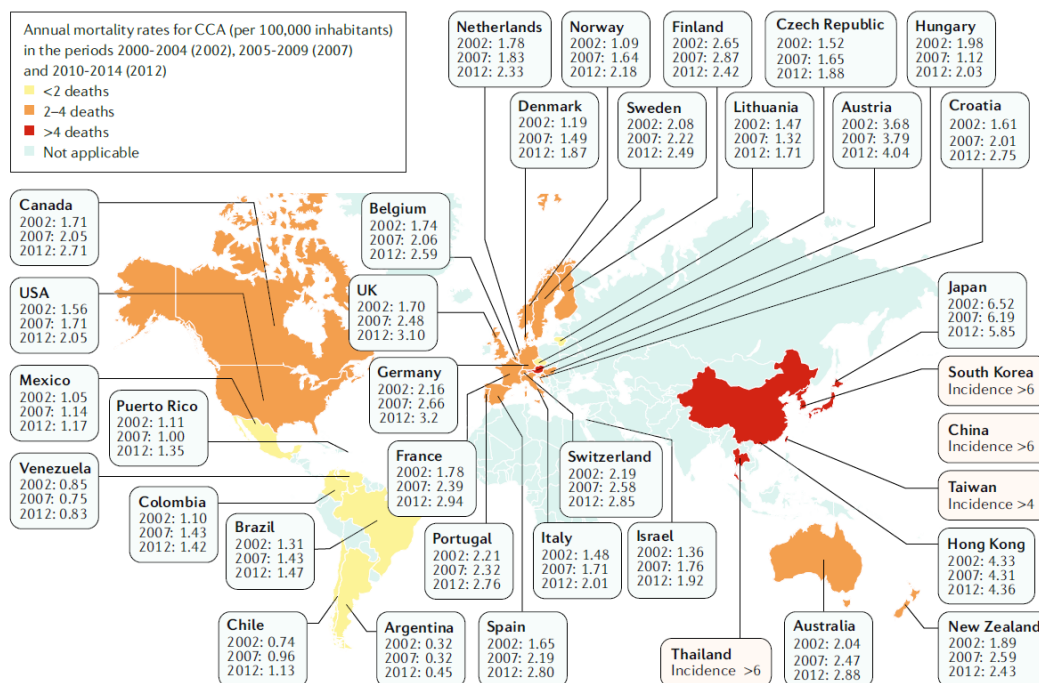


Abbildung 2: Darstellung der weltweiten Inzidenz- und Mortalitätsraten biliärer Tumore.(4)

Biliäre Tumoren manifestieren sich überwiegend nach dem 50. Lebensjahr, wobei eine Prädominanz bei männlichen Patienten beobachtet wird. Von allen Subtypen zeigt das iCCA in der westlichen Welt den signifikantesten Anstieg. Dieser Trend könnte teilweise durch verbesserte diagnostische Standards erklärt werden, die es erlauben, CUPs (Cancer of unknown origin) in der Leber dem iCCA zuzuordnen. Interessanterweise hat die Inzidenz von Gallenblasenkarzinomen, besonders bei Frauen, in den letzten 20 Jahren eine leichte Abnahme verzeichnet (vgl. Abbildung 3).(7)

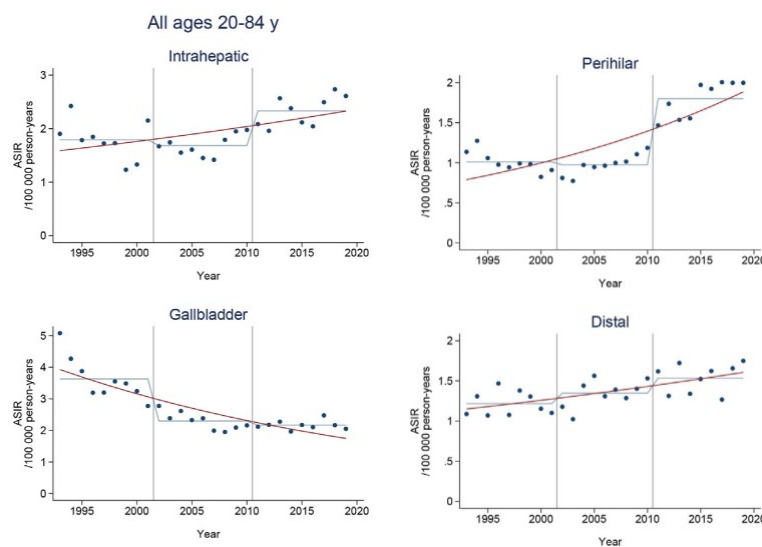


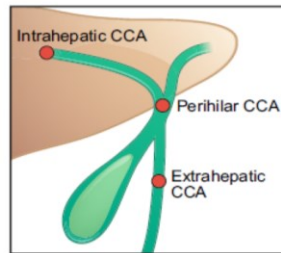
Abbildung 3: Inzidenzraten der verschiedenen Subtypen biliärer Tumore in den letzten 20 Jahren in der westlichen Welt (Schwedische Kohorte).(7)

### 1.3. Ätiologie, Risikofaktoren

Die überwiegende Mehrheit der biliären Tumoren manifestiert sich sporadisch, wobei die assoziierten Risikofaktoren je nach anatomischer Lokalisation variieren (siehe Abbildung 4). Zu den etablierten Risikofaktoren zählen: Übergewicht und nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD), Infektionen mit den Hepatitis-B- und -C-Viren (HBV und HCV), primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und im asiatischen Kontext parasitäre Infektionen durch Leberegel. Für das Gallenblasenkarzinom sind zudem Gallensteine ein anerkannter Risikofaktor. (2,8,9)

#### Intrahepatic CCA risk factors:

- Choledochal cysts (OR 26.71)
- Choledocholithiasis (OR 10.08)
- Cirrhosis (OR 15.32)
- Cholelithiasis (OR 3.38)
- HBV (OR 4.57)
- HCV (OR 4.28)
- Alcohol (OR 3.15)
- Cholecystolithiasis (OR 1.75)
- IBD (OR 2.68)
- T2DM (OR 1.73)
- Smoking (OR 1.25)



#### Extrahepatic CCA risk factors:

- Choledochal cysts (OR 34.94)
- Choledocholithiasis (OR 18.58)
- Cirrhosis (OR 3.82)
- Cholelithiasis (OR 5.92)
- HBV (OR 2.11)
- Alcohol (OR 1.75)
- Cholecystolithiasis (OR 2.95)
- IBD (OR 2.37)
- T2DM (OR 1.50)
- Smoking (OR 1.69)

Abbildung 4: Darstellung der unterschiedlichen Risikofaktoren für iCCA bzw. eCCA.(8)

Trotz gemeinsamer Risikofaktoren wie NAFLD oder virale Hepatitiden gestaltet sich die Differenzierung zwischen intrahepatischen Cholangiokarzinomen (CCA) und hepatozellulären Karzinomen (HCC) oftmals als herausfordernd. Eine histologische Analyse ist daher zur präzisen Diagnosesicherung unabdingbar. Durch eine erhöhte Anzahl an Leberbiopsien bei vermuteten primären HCC wird die Diagnose eines kombinierten HCC-CCA (cHCC-CCA) zunehmend gestellt, was spezifische therapeutische Ansätze erfordert. Das 5-Jahres-Überleben ist mit einer Rate von weniger als 20% als ungünstig zu bewerten. Die große Mehrheit der Patienten stellt sich in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium vor. Selbst nach kurativer Therapie bleibt das Rezidivrisiko signifikant hoch.

## 1.4. Klinik

Die klinische Präsentation biliärer Tumore ist vor allem abhängig von der Lokalisation des Primums. Dominiert bei distalen oder perihilären CCA ein ikterisches Bild, zeigen sich iCCA oft sehr lange asymptomatisch, und fallen erst bei ausgedehntem Befund mit B-Symptomen auf. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die häufigsten Symptome biliärer Tumore.

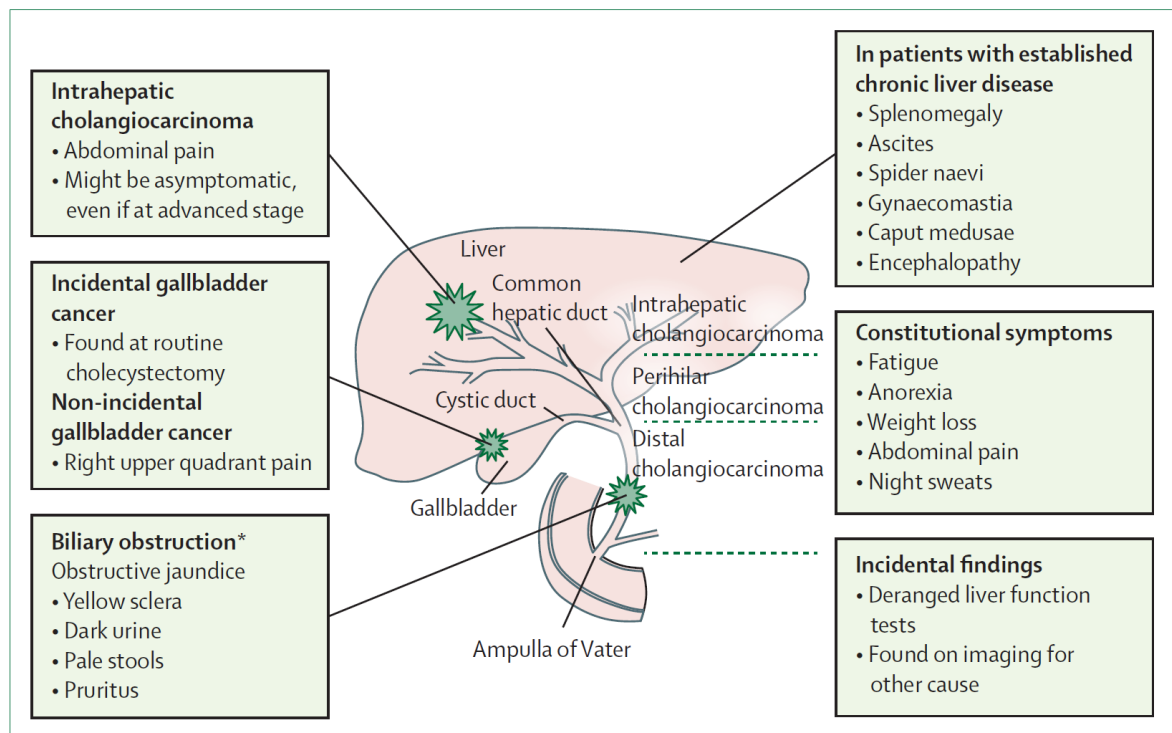


Abbildung 5: Überblick über die unterschiedliche klinische Präsentation biliärer Tumore.(1)

## 1.5. Molekulare Heterogenität

Das molekulare Profil biliärer Tumore variiert stark und spiegelt die Heterogenität ihrer anatomischen Lokalisationen wider.(10) Abbildung 6 illustriert deutlich die Unterschiede in der Häufigkeit molekularer Alterationen in Abhängigkeit von der jeweiligen Primärlokalisierung. Es ist zudem hervorzuheben, dass Gallenblasenkarzinome eine erhöhte Inzidenz von *ERBB2*-Amplifikationen aufzeigen

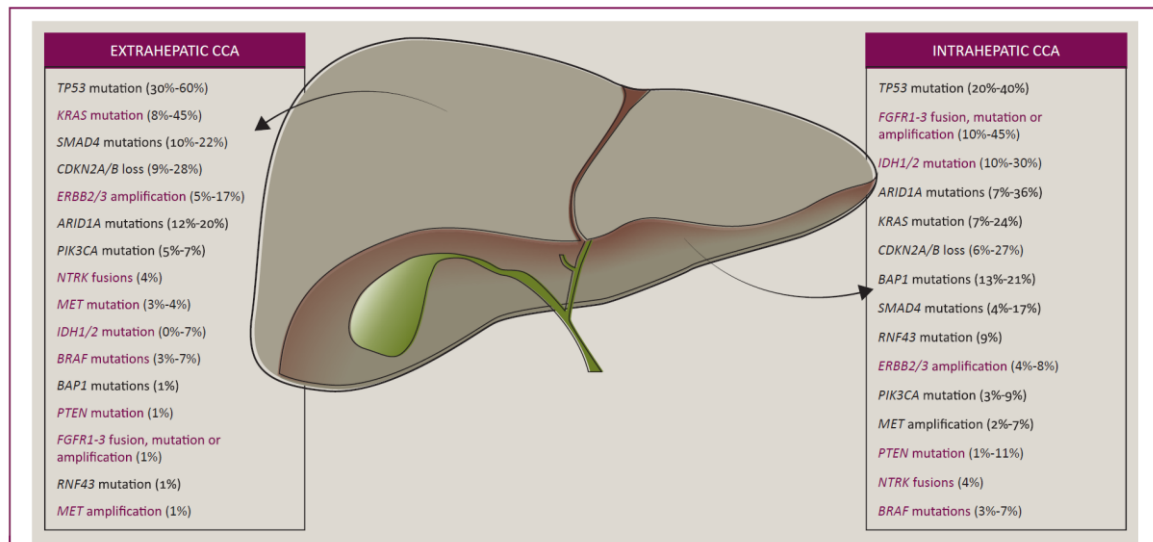


Abbildung 6: Häufige genetische Alterationen bei iCCA bzw. eCCA. Speziell die in rot unterlegten Alterationen könnten aktuell als Target für eine molekular informierte zielgerichtete Therapie dienen.(11)

Jusakul et al. klassifizierten bereits im Jahr 2017 biliäre Tumore in vier molekulare Cluster basierend auf NGS, DNA-Methylierung und Genexpressionsprofilen. Diese Cluster differenzieren sich je nach Ätiologie.(12) Es lassen sich zwei Hauptcluster identifizieren, wie in Abbildung 7 dargestellt. Einer dieser Cluster charakterisiert ein durch Leberegel induziertes CCC, welches möglicherweise durch chronische Entzündungsreaktionen und genetische Treiber, wie *KRAS*, *ERBB2* und *TP53*, beeinflusst wird. Auffällig ist, dass dieser Tumor eher extrahepatisch lokalisiert ist.(13) Demgegenüber erscheint der Anstieg in der Inzidenz von intrahepatischen CCC durch ein metabolisch verändertes Mikromilieu, bedingt durch NASH oder andere Leberparenchymveränderungen im Kontext des metabolischen Syndroms, beeinflusst zu sein. Die wachsende Inzidenz von iCCA in der westlichen Welt untermauert diese Beobachtung.

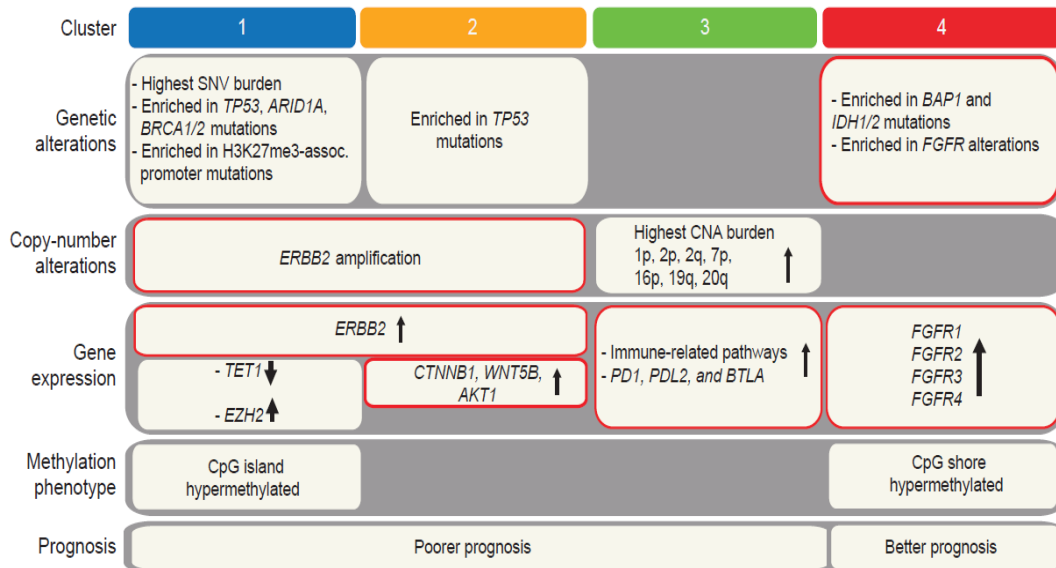
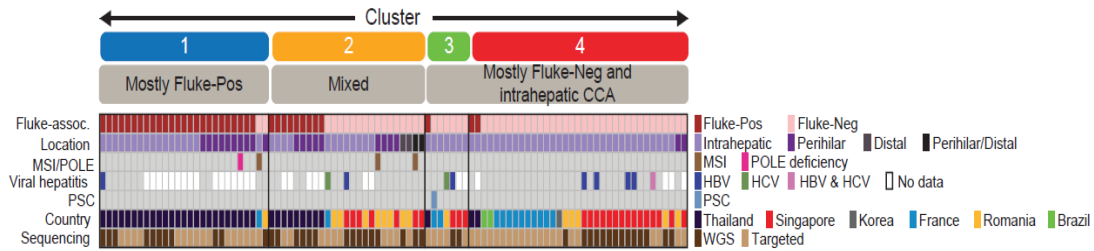


Abbildung 7: Molekulare Cluster wie von Jusakul et al beschrieben. Es lassen sich die erworbene genetischen Alteration aufgrund unterschiedlicher Umwelteinflüsse gut gegeneinander abgrenzen und ebenfalls in Bezug setzen zur anatomischen Lokalisation. Mutationen in *BRCA1/2* oder Amplifikationen in *ERBB2* dominieren in Leberegel assoziierten eCCA. In westlich dominierten iCC herrschen *IDH1/2* Mutation sowie *FGFR* Alterationen vor.(12)

Ein kürzlich veröffentlichtes Manuskript aus der Forschungsgruppe von Prof. Vogel hat die molekulare Charakterisierung von über 6000 intrahepatischen Cholangiokarzinomen detailliert untersucht, wobei auch Co-Mutationen neben den etablierten treibenden Alterationen identifiziert wurden (siehe Abbildung 8).(14) Die am häufigsten vorkommenden medikamentös adressierbaren genetischen Alterationen (GA) in dieser Studie waren *IDH1/2*-Mutationen (14.3%) und *FGFR2*-Fusionen (10%). Andere potenziell therapeutisch targetable GAs beinhalteten *ERBB2* (3.8% Amplifikationen, 1.6% Einzelvarianten [SV]), *BRAF* (2,3% V600E Mutation und 2.3% Nicht-V600E-SV), *MDM2*-Amplifikation (4.3%), *BRCA1/2* (2.4% *BRCA1*-SV und 1.0% *BRCA2*-SV) und *KRAS* (G12C Mutation, 1.1%). Ein hoher Mikrosatelliteninstabilitäts-Status (MSI-high) und eine hohe Tumor-Mutationslast

(TMB-high) wurden bei 1.3% bzw. 3.7% der analysierten Tumoren festgestellt. Es wurden auch geschlechts- und altersbedingte Unterschiede in der Prävalenz dieser genetischen Alterationen beobachtet: Frauen wiesen häufiger *FGFR2*-Fusionen, *IDH1/2*- und *Pik3Ca*-Mutationen auf, während bei männlichen Patienten *TP53*- und *KRAS*-Mutationen häufiger vorkamen. Bemerkenswert war der signifikant erhöhte Anteil an *FGFR2*-Fusionen bei jüngeren Patienten unter 65 Jahren.(15) Eine rezent publizierte österreichische Studie zeigte, dass ebenfalls *FGFR2* und *IDH1/2* die am häufigsten therapeutisch adressierbaren GAs waren.(6)

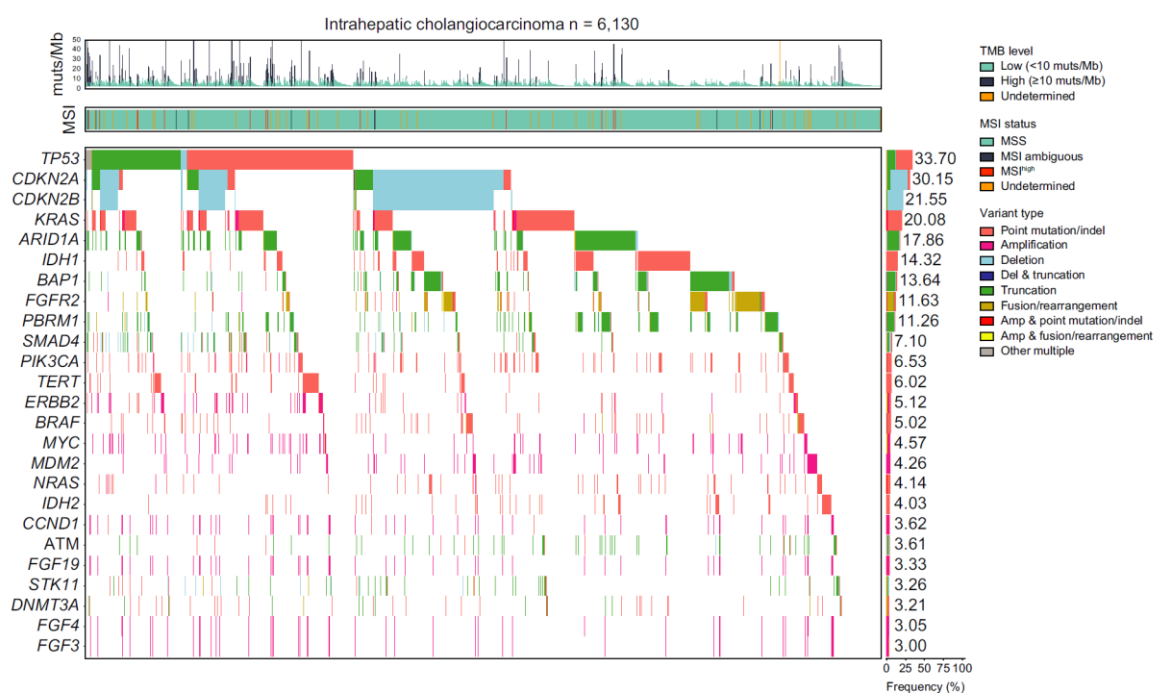


Abbildung 8: Darstellung der genetischen Alterationen von über 6000 iCCA Fällen. *TP53*, *CDKN2A/B* und *KRAS* Alterationen fanden sich am häufigsten. *FGFR2* Fusionen und *IDH1* Mutationen waren unter den potentiell „targetable“ Alterationen die dominierenden.(14)

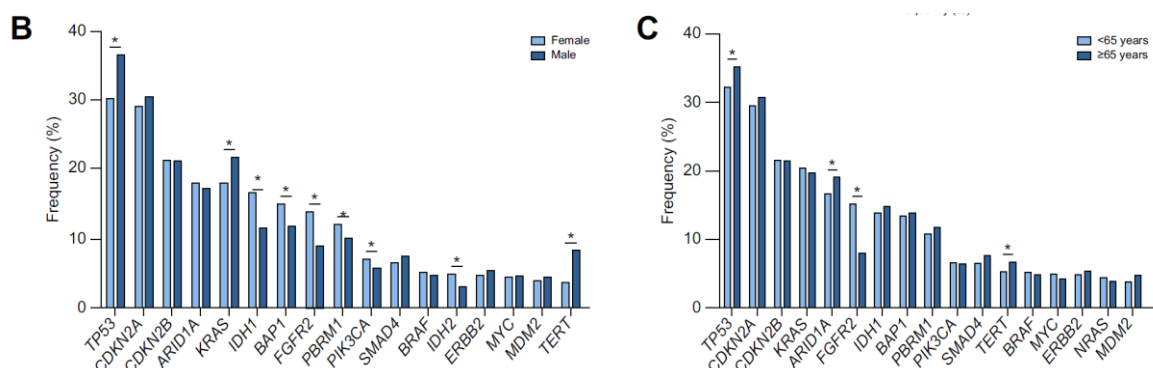


Abbildung 9: Geschlechts- und altersspezifische Unterschiede in der Ausprägung genetischer Alterationen.(14)

## 1.6. Epidemiologie, Risikofaktoren, Klinik, charakteristische molekulare Alterationen und Therapiestrategien biliärer Tumore auf einen Blick

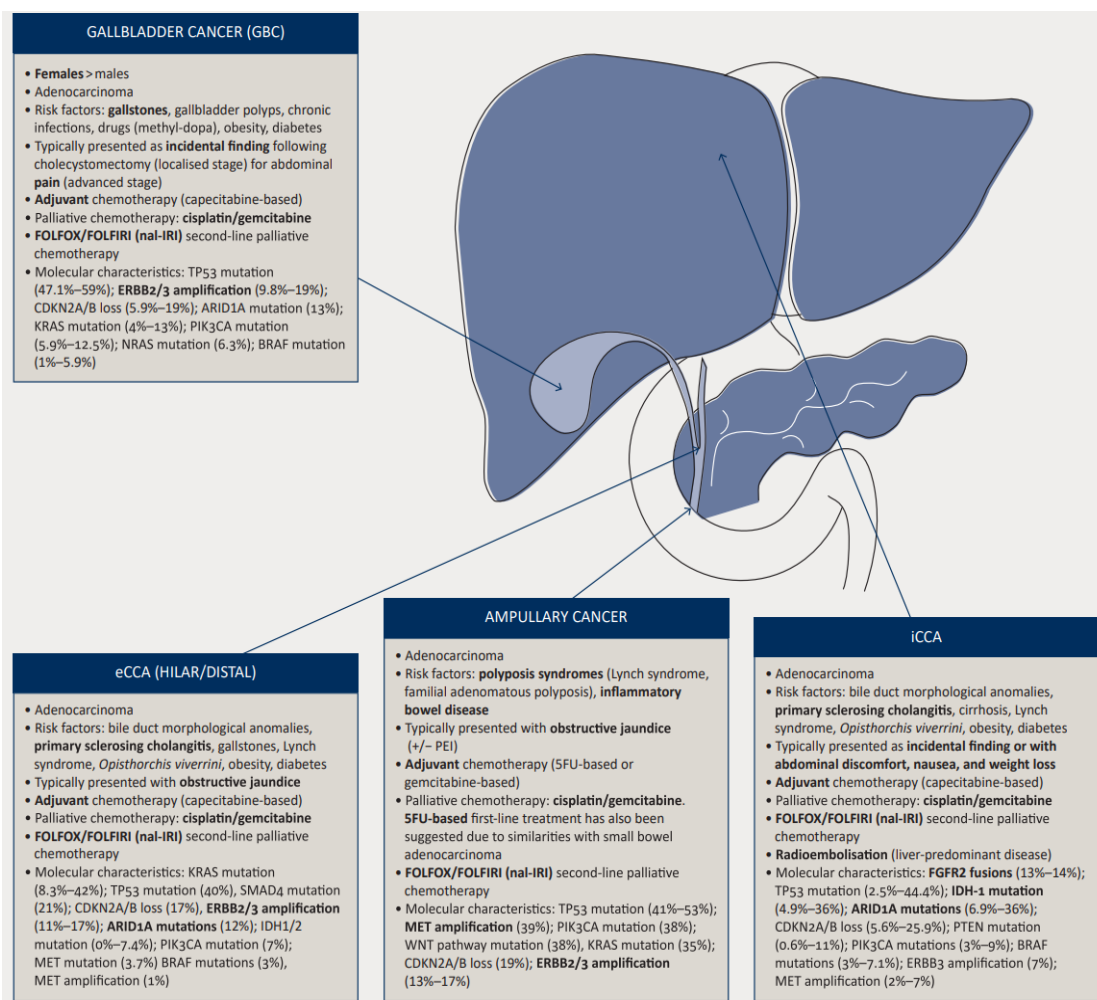


Abbildung 10: Die Heterogenität biliärer Tumore auf einen Blick. Ampulläre Karzinome stellen eine besondere Subgruppe dar, die je nach molekularem Profil entweder den Gallenwegskarzinomen zugeordnet werden oder aber wie intestinale Tumore imponieren. Bei Ursprung aus dem Gallenwegssystem lassen sich oft *MET* Amplifikationen oder *ERBB2* Amplifikationen nachweisen, die entsprechen gezielt adressiert werden können.(16)

## 1.7. Diagnosestellung und Staging

Die Sonographie fungiert primär als Screening-Methode zur Untersuchung unklarer Leberwerte. Für die Ausbreitungsdiagnostik maligner gastrointestinaler Erkrankungen hat sich jedoch die kontrastmittelverstärkte Computertomographie (CT) des Thorax, Abdomens und Beckens als Standard etabliert. Bei der

Beurteilung von intrahepatischen Cholangiokarzinomen (iCCA), insbesondere in Bezug auf die Ausbreitung entlang der Gallenwege, bietet das mehrphasige Magnetresonanztomogramm (MRT) eine überlegene Auflösung im Vergleich zur Leber-CT und ist somit zur Einschätzung einer potenziellen Resektabilität bevorzugt einzusetzen. Die Magnetresonanztomographie in Kombination mit Cholangio-Pankreatographie (MRT/MRCP) ermöglicht eine detaillierte Visualisierung des Gallengangsystems und der Gefäßstrukturen und liefert somit präzise Informationen zur anatomischen Tumorausdehnung. Die Endoskopie, insbesondere zur Biopsie oder Endosonographie, spielt eine entscheidende Rolle bei der Diagnostik von eCCA-Tumoren. Der Stellenwert eines zusätzlichen FDG-PET-Scans ist in der klinischen Routine kontrovers und nicht überall verfügbar. Lamarca et al. und Kiefer et al. berichteten jedoch von einer Therapieanpassung bei 15% bis 60% der Patienten, wobei in den meisten Fällen ein Upstaging zu einer palliativen Situation erfolgte. Die FDG-PET-Technik überzeugt insbesondere durch ihre erhöhte Sensitivität und Spezifität für Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen (vgl. Abbildung 11).(17)

Dennoch stellt die genaue Diagnosestellung von iCCA eine erhebliche Herausforderung dar. Dies ist hauptsächlich auf das Fehlen klar definierter bildgebender Diagnosekriterien sowie das Fehlen spezifischer Serum- und immunhistochemischer Tumormarker zurückzuführen. Die Kernproblematik bei der iCCA-Diagnose besteht in der klinischen Abgrenzung zu anderen Leberläsionen, wie dem hepatozellulären Karzinom (HCC) oder metastatischen Läsionen, insbesondere von Pankreaskarzinomen. Bildgebende Verfahren sind für die Diagnosestellung von iCCA essenziell. In dynamischen CT- oder MRT-Untersuchungen zeigt das iCCA typischerweise eine Venenphasen-Kontrastmittelanreicherung, während das HCC eine arterielle Phasenanreicherung und einen verzögerten Washout in der Venenphase aufweist. Diese Eigenschaften können zur Unterscheidung zwischen iCCA und HCC beitragen.(18)

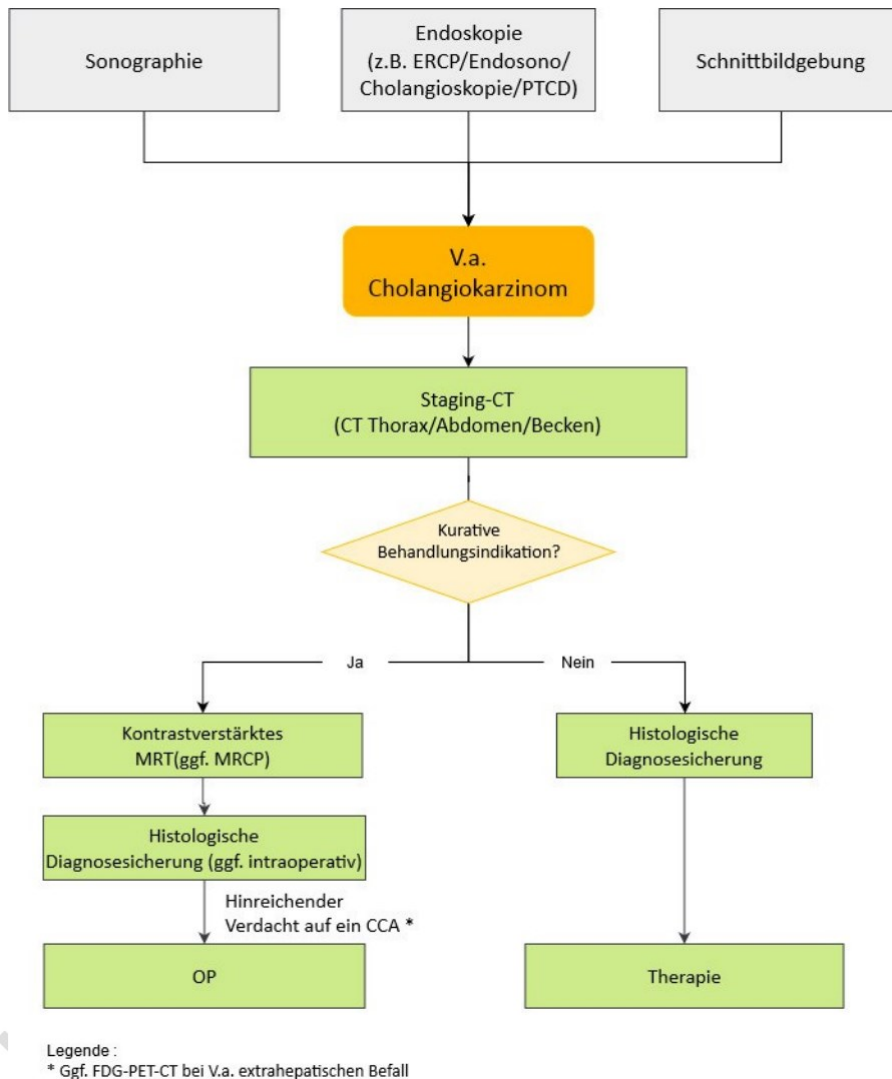


Abbildung 11: Work-flow der Diagnosestellung und Ausbreitungsdiagnostik um in multidisziplinären Tumorboards individualisierte Therapieempfehlung beschließen zu könne. Wenn potentiell eine kurative Situationen im Raum steht, sind MR/MRCP der Leber unabdingbar für den Lokalstatus. Die Wertigkeit des PET-CTs bleibt noch kontroversiell.(17)

Die klinische Nutzung von zirkulierenden Tumormarkern wie CA19-9 bietet nur eingeschränkte Hilfe aufgrund ihrer begrenzten Sensitivität und Spezifität, die jeweils 62% und 63% betragen. Die histologischen Befunde von iCCA sind oft unspezifisch und können leicht mit anderen Adenokarzinomen verwechselt werden, was die Diagnosestellung weiter erschwert. Das Vorhandensein einer ausgeprägten stromalen Desmoplasie kann charakteristisch sein, aber auch hier gibt es Überschneidungen mit anderen Tumortypen. Dasselbe gilt für das immunhistochemische Profil, das sich stark mit anderen Karzinomen überschneidet.

In jüngster Zeit hat sich die kombinierte Nutzung optimierter MRI-basierter Bildgebung und erweiterter molekularer Profilierung als wertvolles Instrument zur Diagnosestellung erwiesen. Eine kürzlich durchgeführte Studie von Kollegen aus dem Vereinigten Königreich und Spanien hat gezeigt, dass diese kombinierte Ansatz bei AdenoCUP-Patienten mit einer leberdominanten Erkrankung in der Mehrzahl der Fälle zu einer endgültigen Diagnose von iCCA geführt hat (siehe Abbildung 12).(19) In klinischer Hinsicht ist es daher bei starkem Verdacht auf iCCA ratsam, unmittelbar nach einer Core-Biopsie eine umfassende molekulare Charakterisierung durchzuführen, ähnlich wie es bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) der Fall ist. Dies ist nicht nur aus diagnostischer Sicht wichtig, sondern hat auch erhebliche therapeutische Auswirkungen, insbesondere im Hinblick auf die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie. Gemäß den Empfehlungen der European Society for Medical Oncology (ESMO) sollte eine solche breit angelegte molekulare Charakterisierung bereits bei der Erstdiagnose eines biliären Tumors durchgeführt werden. (20–22)

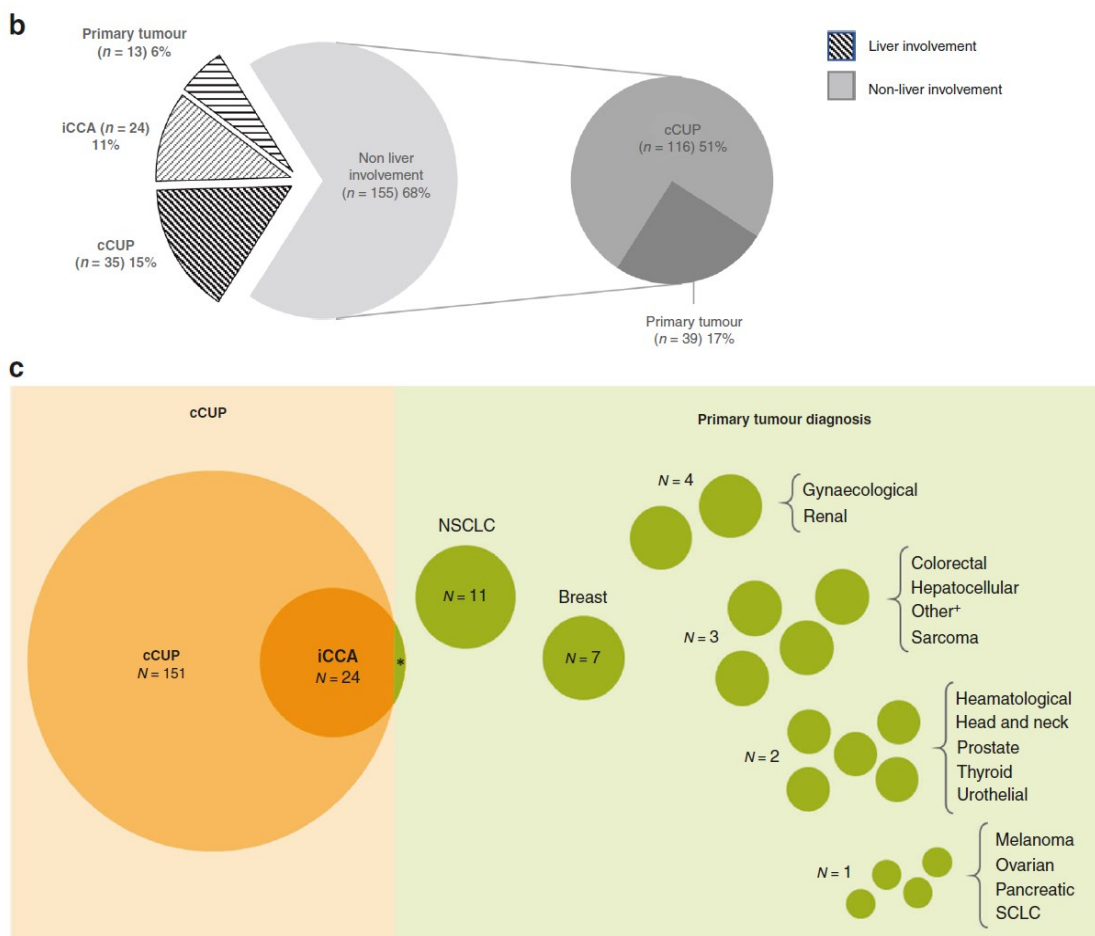


Abbildung 12: iCCA machen den Großteil der bislang als AdenoCUP's der Leber diagnostizierten malignen Läsionen aus. (19)

Die Beschaffung qualitativ hochwertiger Gewebeproben für Biomarker-Tests bei biliären Tumoren bleibt ein kritischer Schritt in der therapeutischen Entscheidungsfindung. Aufgrund der anatomischen Position und der einzigartigen histologischen Eigenschaften des intrahepatischen Cholangiokarzinoms (iCCA) wird der Gewinnungsprozess häufig durch den suboptimalen Tumorzellgehalt in den Biopsien erschwert.

Die in der Literatur zitierte Datenlage, basierend auf der Untersuchung von 123 Gewebeproben von Patienten mit fortgeschrittenem BTC, bei denen iCCA mit 68,2% dominierte, unterstreicht die inhärente Schwierigkeit dieser Aufgabe. Ein erheblicher Anteil dieser Proben (26,8%) war für die Next-Generation Sequencing (NGS)-Analyse unzureichend, hauptsächlich wegen des geringen Tumorerhalts. Darüber hinaus war die Qualitätssicherung für RNA-Fusionen in 35,3% der Fälle nicht zufriedenstellend. Die MOSCATO-1-Studie bestätigt diesen Befund weiter, wobei die Biomarker-Testung bei etwa einem Fünftel der Patienten fehlgeschlagen ist.

Die empirisch festgestellte Problematik legt nahe, dass die Methoden zur Biopsieentnahme verbessert werden müssen.

Ein weiterer strategischer Lösungsansatz besteht in der Einrichtung eines integrierten Feedback-Systems zwischen den verschiedenen klinischen Disziplinen (siehe Abbildung 13). Dieses kooperative Netzwerk würde es den beteiligten Experten ermöglichen, ihre Techniken in Echtzeit zu optimieren und zu verfeinern. Die direkte Kommunikation zwischen Radiologen, Gastroenterologen, Chirurgen, Pathologen, medizinischen Onkologen und Molekularbiologen würde nicht nur die Qualität der Biopsien verbessern, sondern auch die Gesamtdauer vom Diagnosezeitpunkt bis zur Identifizierung eines molekularen Targets verkürzen. Diese Reduktion in der Turnaround-Zeit wird voraussichtlich zu verbesserten klinischen Ergebnissen für die Patienten führen und unnötige Verzögerungen und wiederholte invasive Verfahren minimieren.

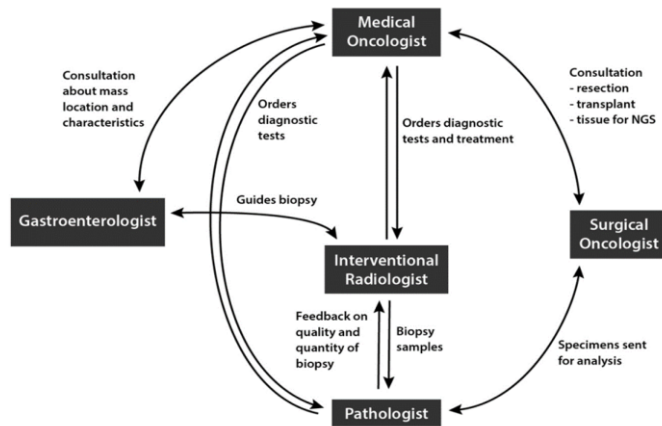


Abbildung 13: Möglicher feedback loop um die Probenqualität bei biliären Tumoren zu verbessern.(23)

## 1.8. Analyseverfahren

Die Analyse genetischer Alterationen (GAs) hat in den letzten Jahren in der Onkologie erhebliche Bedeutung erlangt, wobei diverse Testmethoden zur Identifizierung dieser Alterationen entwickelt wurden. Innerhalb der klinischen Routine dominieren gewebebasierte Testverfahren, insbesondere die Next-Generation-Sequencing (NGS)-Technologie, Immunhistochemie (IHC) sowie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).(24) Parallel dazu gewinnt das NGS-Verfahren, das auf Liquid Biopsy basiert, immer mehr an Bedeutung. Die Wahl der am besten geeigneten Technik hängt in hohem Maße von der jeweiligen Zielstruktur ab. Beispielsweise bietet die IHC eine schnelle und kostengünstige Methode zur Identifizierung von Proteinexpressionen oder -verlusten, während FISH sich besonders für die Detektion von Genfusionen oder Amplifikationen eignet. NGS hingegen ermöglicht eine umfassende genomweite Analyse, die mehrere genetische Veränderungen gleichzeitig erfassen kann. Die Liquid Biopsy-basierte NGS liefert dabei Informationen über zirkulierende Tumor-DNA, was bei Patienten, bei denen eine Gewebebiopsie nicht machbar oder riskant ist, besonders vorteilhaft sein kann. Abbildung 14 illustriert eindrücklich die Vielzahl relevanter Zielstrukturen im Kontext des CCC und präsentiert die bevorzugten Teststrategien für jede dieser Strukturen in der klinischen Routine. Es wird deutlich, dass die effektive Auswahl von Diagnosetools und Teststrategien wesentlich für die präzise Charakterisierung und die anschließende therapeutische Entscheidungsfindung ist.

Gen	Alteration	Prevalence		Method	Level of evidence ESCAT <sup>1</sup> /ASCO <sup>2</sup>	Drugs
		EH and gallbladder	IH			
IDH1	Mutation	3%	10–20%	NGS		HMPL-306, IDH-305, FT2012 (olutasidenib), AG881 (vorasidenib), LY3410738
IDH2	Mutation	1%	6%	NGS	IIIB <sup>1</sup>	Enasidenib, LY3410738, AG881 (vorasidenib)
FGFR2	Fusion/rearrangement	1%	4–15%	NGS	IB <sup>1</sup>	Futibatinib (TAS120), erdafitinib, derazantinib
FGFR2	Other alterations					Futibatinib (TAS120), erdafitinib, derazantinib
NTRK	Fusion/rearrangement	2%	2%	NGS/IHC	IC <sup>1</sup> Moderate recommendation <sup>2</sup> Low quality of evidence <sup>2</sup>	LOXO-195 (selitrectinib) and TPX-00005 (reprotrectinib)
MET	Amplification	2–3%	5%	NGS	IIIA <sup>1</sup>	Tivantinib/crizotinib
PIK3CA	Access point mutation	7%	6%	NGS	IIIA <sup>1</sup>	MK2206, alpelisib and buparlisib
BRAF	Mutation	3-5%	3%	NGS	IIB <sup>1</sup>	Dabrafenib and trametinib Belvarafenib
BRCA1/2	Mutations	3%	3–5%	NGS	IIIA <sup>1</sup>	Olaparib and rucaparib
ERBB2	Amplification/mutation	10–15%	7%	NGS/FISH	IIIA <sup>1</sup>	Trastuzumab and pertuzumab Zanidatamab Trastuzumab-deruxtecan
TMB	TMB-H	3%	6%-12%	NGS	IIIA <sup>1</sup>	Pembrolizumab
IDH1	Mutation	3%	10–20%	NGS	IA <sup>1</sup> Strong recommendation <sup>2</sup> High quality of evidence <sup>2</sup>	Ivosidenib
FGFR2	Fusion/rearrangement	1%	4–15%	NGS	IB <sup>1</sup>	Pemigatinib, infigratinib
NTRK	Fusion/rearrangement	2%	2%	NGS/IHC	IC <sup>1</sup> Moderate recommendation <sup>2</sup> Low quality of evidence <sup>2</sup>	Larotrectinib and entrectinib
MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM	Mutation (MSI-H)	0.5-2%	1%	NGS/IHC	IA <sup>1</sup> Strong recommendation <sup>2</sup>	Pembrolizumab (aPD1)

Abbildung 14: Überblick über relevante molekulare Targets beim CCC und das bevorzugte Testverfahren zur Identifizierung im klinischen Alltag.(25)

Die traditionellen Methoden zur genetischen Analyse, wie die Immunhistochemie (IHC) zur Quantifizierung der Proteinexpression und die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zur Detektion von CNV oder bekannten Fusionen, sind zwar kosteneffizient, leicht zugänglich und zeitsparend, haben jedoch ihre Einschränkungen. Sie sind prädestiniert für die Identifikation etablierter und klinisch gut charakterisierter genetischer Alterationen, wie *ERBB2* oder *BRAF* V600E. Ihre Kapazität, simultan mehrere therapeutisch relevante Alterationen zu screenen, ist beschränkt, insbesondere im Vergleich zur Next-Generation Sequencing (NGS) Diagnostik, die einen umfassenderen Einblick in das genetische Profil bietet. Bei der Evaluierung von Begleitalterationen, die potenzielle Resistenzen vorhersagen könnten (z.B. Co-Amplifikation von *EGFR* bei *ERBB2* 3+ IHC im cholangiozellulären Karzinom (CCC)), zeigt die NGS ihre Überlegenheit. Nicht zuletzt erlauben aktuelle FISH- oder IHC-Techniken nicht immer die Erkennung von unbekanntem

Fusionspartnern, wie im Fall von *FGFR2*; hier sind DNA- oder besser noch RNA-Fusionspanels deutlich effektiver. Vor diesem Hintergrund empfiehlt die ESMO die Implementierung von NGS zur umfassenden Beurteilung relevanter genetischer Veränderungen.(26,27)

Mit der Einführung von NGS-Technologien wurde das Spektrum erkennbarer genetischer Alterationen (GA) erheblich erweitert. Es ist essentiell zu berücksichtigen, dass die Sensitivität von DNA-basierten Tests maßgeblich von der Größe des verwendeten Genpanels und der Art des untersuchten genetischen Materials (DNA im Vergleich zu RNA) beeinflusst wird. DNA-NGS erkennt eine breite Palette von genetischen Veränderungen, einschließlich Punktmutationen, Insertionen/Deletionen und Genamplifikationen (vgl. Abbildung 15 und 16). Im Gegensatz dazu ermöglicht RNA-basiertes NGS die Detektion von Transkriptomalterationen, darunter Genfusionen und alternative Splicing-Ereignisse, die mittels DNA-NGS oder FISH oft unerkannt bleiben. Besonders die Sequenzierung von m-RNA kann zur Identifikation von Genfusionen in Proben mit negativen DNA-NGS-Ergebnissen beitragen. Aktuell verfügbare NGS-Assays nutzen verschiedene Methoden, einschließlich Hybrid-Capture, Amplicon-Techniken und Multiplex-PCR. Die Hybrid-Capture-Technologie, wie beispielsweise der Illumina TruSight Tumor170/500, erfasst spezifische DNA-Bereiche und ihre angrenzenden Regionen. Amplicon-Verfahren erlauben die Detektion von Genfusionen selbst bei minimaler DNA- oder RNA-Verfügbarkeit, können jedoch bei bisher unbekanntem Fusionspartnern versagen.(11,24,28)

Im Kontext der Identifikation verschiedener FGFR-Fusionen im CCC wurden spezifische Primer eingesetzt, die an Exon-Intron-Grenzen verankert sind, um sowohl bekannte als auch unbekannte Fusionspartner gezielt zu amplifizieren. Dieser Ansatz ermöglicht die Detektion jeglicher Fusionspartner, auch wenn das

dazugehörige Gen bisher nicht identifiziert wurde.

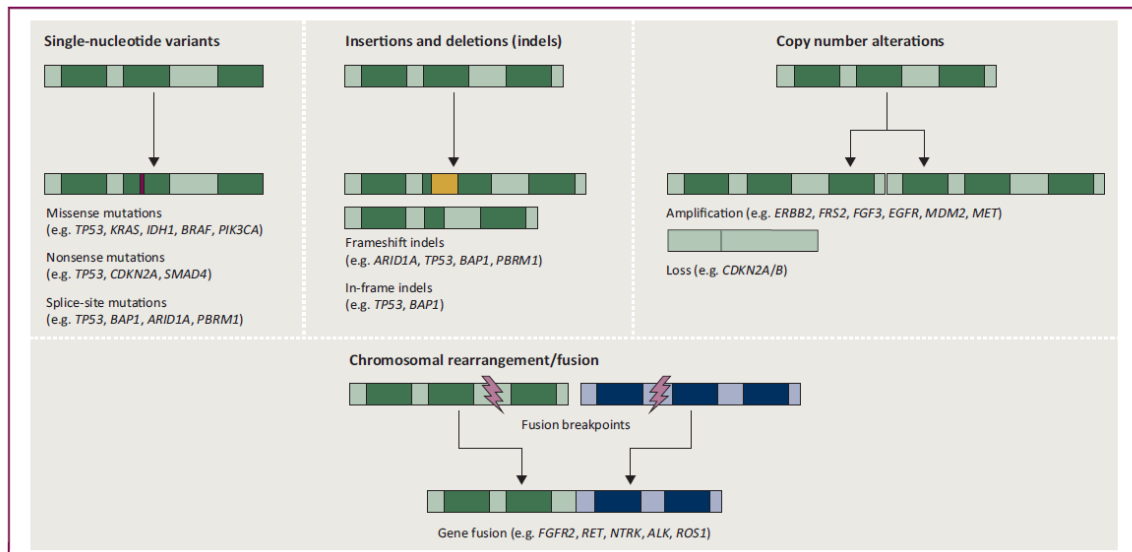


Abbildung 15: Die Entstehung der verschiedenen genetischen Alteration beim CCC.(24)

Die Qualität der zu untersuchenden Probe stellt einen zentralen Faktor bei der Generierung zuverlässiger Ergebnisse mittels Next-Generation Sequencing (NGS) dar. Sollte keine qualitativ hochwertige Gewebeprobe verfügbar sein, bietet sich die Liquid Biopsy – aus Blut oder neuerdings auch aus Gallensaftaspiraten – zur Erfassung zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) als Alternative an. Ein vergleichender Studienansatz, der sowohl Blut-ctDNA als auch Tumorgewebsproben von Patienten mit Gallengangstumoren analysierte, konnte eine bemerkenswerte Konkordanzrate von etwa 74% hinsichtlich der identifizierten genetischen Veränderungen zwischen beiden Probenarten feststellen. Einer der Hauptvorteile des ctDNA-Profilings besteht in der erheblichen Reduzierung der Zeit, die für das Genotyp-Screening während des Einschreibeprozesses in klinische Studien benötigt wird. Dieses beschleunigte Verfahren ermöglicht eine effizientere und zügigere Identifikation von klinisch relevanten Biomarkern bei Patienten mit CCA. Weiterhin bietet das Monitoring von ctDNA die Möglichkeit, erworbene Resistenzen gegenüber spezifischen Therapieansätzen serienmäßig und nicht invasiv zu detektieren. Ein Beispiel hierfür ist die Identifizierung von Punktmutationen im *FGFR2*-Gen, die während der Behandlung mit gezielten Therapeutika gegen *FGFR2*-Fusionen auftreten können.

Allerdings weist die Anwendung von ctDNA auch Limitierungen auf. Das so genannte Tumورشedding, also das Freisetzen von DNA aus Tumorzellen in den

Blutkreislauf, hängt stark von der Tumorlast und der Lokalisation des Primärtumors oder dessen Metastasen ab. Insbesondere bei hoher Tumorlast und günstiger Lokalisation (z. B. Leber gegenüber Lunge) kann eine ausreichende Menge an ctDNA detektiert werden. Darüber hinaus ist die Sensitivität von ctDNA-Analysen hinsichtlich bestimmter genetischer Veränderungen, wie beispielsweise CNVs oder Fusionen, im Vergleich zum aktuellen Goldstandard – der NGS-Analyse von Gewebeproben – potenziell eingeschränkt. Es ist also essenziell, die jeweilige Methode und ihre möglichen Limitierungen im Kontext der klinischen Fragestellung und der verfügbaren Probenqualität zu evaluieren.

Table 3. Targeted NGS-based molecular profiling assays										
Company	Test	Specimen	Template	Enrichment technology	Gene panel size	Genetic alterations	FDA approved <sup>a</sup>	Turnaround	Cost <sup>b</sup>	
Memorial Sloan Kettering Cancer Center	MSK-IMPACT <sup>146</sup>	FFPE	DNA	Hybrid capture	468	SNVs, indels, MSI	Yes	NR	NR	
Foundation Medicine	FoundationOne CDx <sup>147</sup>	FFPE	DNA	Hybrid capture	324	SNVs, substitutions, indels, CNAs, rearrangements, MSI, TMB, LOH	Yes <sup>c</sup>	~ 2 weeks	US\$3500	
	FoundationOne Liquid CDx <sup>112</sup>	Whole-blood plasma	cfDNA	Hybrid capture	311	SNVs, substitutions, indels, CNAs, rearrangements; blood TMB, MSI	Yes	~ 2 weeks	US\$3500	
	FoundationOne Heme <sup>148</sup>	Whole blood, bone marrow aspirate	DNA + RNA	Hybrid capture	406 (DNA), 265 (RNA)	SNVs, substitutions, indels, CNAs, rearrangements, MSI, TMB	No	~ 2 weeks	US\$3500	
Guardant Health	Guardant360 CDx <sup>113</sup>	Whole-blood plasma	cfDNA	Hybrid capture	55	SNVs, indels, CNAs, fusions	Yes	1 week	€3500	
ArcherDX	FusionPlex Solid Tumor <sup>121</sup>	FFPE	RNA	Anchored multiplex PCR	53	Fusions	No	3-5 days	NR	
Tempus	Tempus xT <sup>130</sup>	FFPE	DNA + RNA (for transcriptome sequencing)	NR	596	SNVs, indels, CNAs, rearrangements, MSI, TMB	No	~ 2 weeks	NR	
ThermoFisher Scientific	Oncomine Comprehensive Assay Plus <sup>128</sup>	FFPE	DNA, RNA	AmpliSeq	>500	SNVs, indels, CNA, fusions, MSI, TMB	No	5 days	US\$14 570	
	Oncomine Dx Target Test <sup>119</sup>	FFPE	DNA + RNA (for fusions only)	AmpliSeq	23	SNVs, deletions, ROS1 fusions	Yes	4 days	NR	
Illumina	TruSight Oncology 500 <sup>149</sup>	FFPE	DNA + RNA (for transcriptome sequencing)	Hybrid capture	523	SNVs, indels, CNA, rearrangements, MSI, TMB	No	4-5 days	US\$17 999	
NeoGenomics Laboratories	NeoType Discovery Profile for Solid Tumors <sup>131</sup>	FFPE	DNA, RNA	NR	323	SNVs, indels, rearrangements, MSI, TMB	No	~ 2 weeks	NR	
KEW	CANCERPLEX <sup>132</sup>	FFPE, biopsy, aspirate	DNA	NR	435	SNVs, indels, CNA, rearrangements, MSI, TMB	No	7-10 days	NR	
Caris Life Sciences	CARIS Molecular Intelligence <sup>149</sup>	FFPE, biopsy aspirate	DNA, RNA	Microdissection	~ 22 000	SNVs, indels, CNA, fusions, MSI, TMB	No	10-14 days	NR	
Paradigm	PCDx <sup>150</sup>	FFPE	DNA, RNA	NR	234	SNVs, indels, CNA, rearrangements, TMB	No	4-5 days	NR	
OmniSeq Corporation	OmniSeq Comprehensive <sup>151</sup>	FFPE	DNA, RNA		144	SNVs, indels, CNA, fusions, MSI, TMB	No	10-15 days	NR	
PathGroup	SmartGenomics <sup>152</sup>	FFPE	DNA	NR	160	SNVs, indels, fusions	No	NR	NR	

Abbildung 16: Leistungskatalog gebräuchlicher NGS Diagnostik assays im Vergleich(24)

## 1.9. Therapeutische Strategien bei biliären Tumoren

Nach Diagnosestellung und Ausbreitungsdiagnostik muss als erster Schritt bei lokalisierten oder oligometastasierten Tumoren im multidisziplinären Tumorboard ein potentiell kuratives Vorgehen besprochen werden. Abbildung 17 zeigt den Behandlungspfad nach Diagnosestellung und Staging.

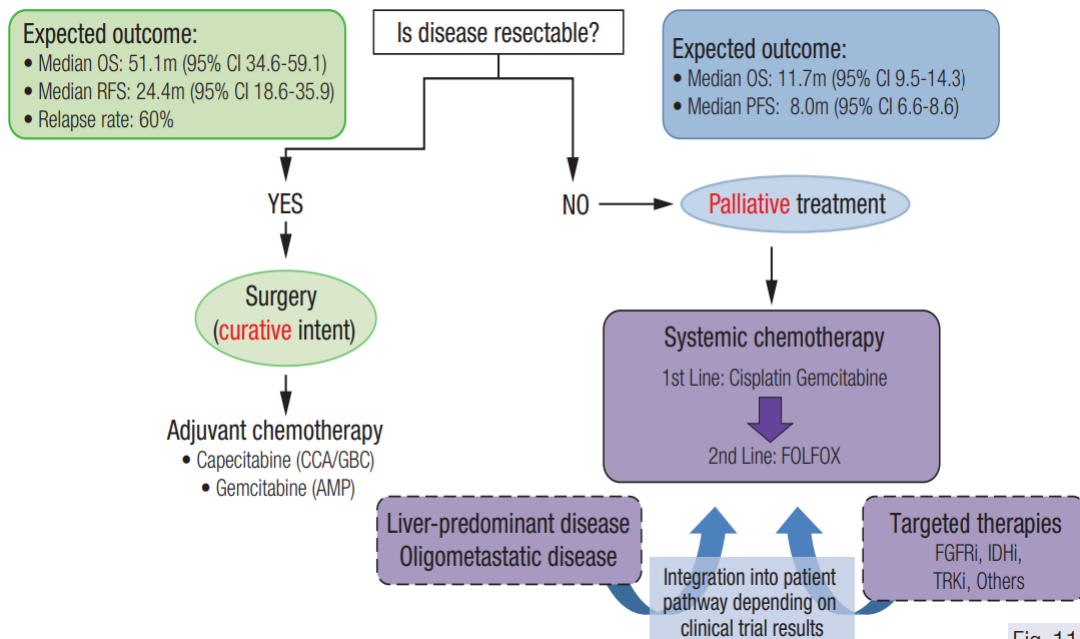


Abbildung 17: Entscheidungsbaum bei der Behandlung von biliären Tumoren. (29)

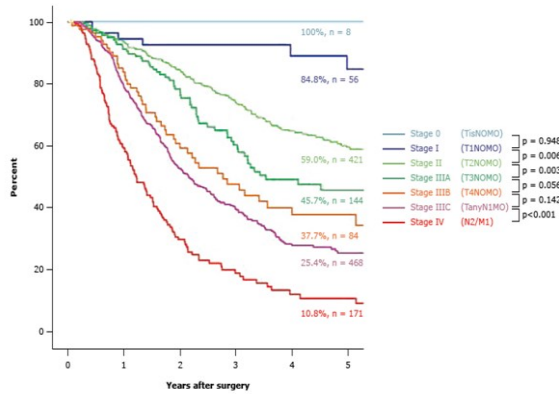
### 1.9.1 Kurative Situation

Ungefähr 30% der Patienten präsentieren sich im Stadium eines lokal begrenzten, resektablen und somit potenziell kurativen Befundes. Neben chirurgischen Eingriffen in einem kurativen Kontext bieten lokalablative Verfahren und in selektierten Fällen die Lebertransplantation alternative Therapieoptionen. Die beachtliche 3-Jahres-Rezidivrate von bis zu 80% nach primär kurativ geplanter Resektion unterstreicht die Relevanz von (neo-)adjuvanten Therapieansätzen. Multifokalität (insbesondere bei iCCA), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N1), eine vaskuläre Invasion sowie eine R0-Resektion zählen zu den bedeutsamsten prognostisch relevanten Faktoren (siehe Abbildung 18). Drei adjuvante prospektive Studien – BILCAP, PRODIGE 12 und BCAT – untersuchten den Stellenwert einer adjuvanten Therapie. In der BILCAP-Studie

konnte durch eine adjuvante Therapie mit Capecitabin im Vergleich zum Beobachtungsarm ein verlängertes medianes Gesamtüberleben (mOS) von 53 Monaten gegenüber 36 Monaten erzielt werden. Für ampulläre Karzinome legt die ESPAC3-Studie mit Gemcitabin/Capecitabin den gegenwärtigen Therapiestandard fest.(30)

Es ist zu postulieren, dass insbesondere Patienten mit einem hohen Risiko für ein sehr frühzeitiges Rezidiv von adjuvanten und/oder neoadjuvanten Therapieansätzen profitieren könnten. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass bei annähernd 25% der iCCA-Patienten Frührezidive innerhalb von 6 Monaten postoperativ auftreten. Diese Patientengruppe weist ein besonders ungünstiges Überleben auf, mit einem mOS von 13,8 Monaten und einer 5-Jahres-Überlebensrate von 8,9%, verglichen mit 59,7 Monaten bzw. 49,8% bei Patienten ohne Frührezidiv (p < 0,001). Es ist sehr wahrscheinlich, dass in der Zukunft der Nachweis zirkulierender Tumor-DNA dazu beitragen wird, Patienten mit hohem Rezidivrisiko zu identifizieren. Diese könnten dann gezielt adjuvanten Therapien zugeführt und/oder einer intensivierten postoperativen Überwachung unterzogen werden.(30)

Overall survival after resection of a perihilar cholangiocarcinoma in a series of 1352 patients, stratified according to AJCC 8th edition prognostic stage groupings



Overall survival after surgical resection of perihilar cholangiocarcinoma at Nagoya University, Japan. Changes from the 7th Edition include removal of Bismuth-Corlette type IV tumors from the T4 category and downstaging of T4 tumors from stage IVA to IIIB.

Stage-stratified comparison in 5-year survival outcomes between the 7th (2010) and 8th (2017) edition of the AJCC staging system, Kaplan-Meier analysis

	N (%)	5-year (%)	95% CI
<b>AJCC 7th edition*</b>			
I	93 (18.1)	58.8	44.9-70.3
II	110 (21.4)	38.8	26.5-51.0
III	70 (13.6)	39.7	24.1-54.9
IVa	242 (46.9)	18.4	11.9-6.1
<b>AJCC 8th edition†</b>			
Ia	15 (5.1)	90.0	47.3-98.5
Ib	18 (6.1)	50.6	19.9-75.0
II	37 (12.5)	55.1	34.5-71.7
IIIa	22 (7.4)	49.7	16.6-76.2
IIIb	204 (68.9)	16.2	9.5-24.5

AJCC: American Joint Committed on Cancer; N: number of patients.

\* N = 515.

† N = 296.

From: Spolverato G, Bagante F, Weiss M, et al. Comparative performances of the 7th and the 8th editions of the American Joint Committee on Cancer staging systems for intrahepatic cholangiocarcinoma. J Surg Oncol 2017; 115:696.

Abbildung 18: Überlebenskurven von Klatskin Tumoren und iCCA nach kurativer Resektion zeigt das hohe Rezidivrisiko. (31,32)

## 1.9.2. Palliative Situation

### 1.9.2.1 Chemotherapie + Immuntherapie

Mehr als ein Jahrzehnt nach der Etablierung von Cisplatin und Gemcitabin als Erstlinientherapie durch die ABC-02 Studie, erleben wir eine Neukonzeptionierung dieses Therapiestandards durch die Resultate der TOPAZ-1- und KEYNOTE-966-Studien. Die TOPAZ-1-Studie, welche den Chemotherapie-Standard aus Gemcitabin und Cisplatin um den PD-L1-Inhibitor Durvalumab ergänzte, und die KEYNOTE-966-Studie, welche durch den Zusatz des PD-1-Inhibitors Pembrolizumab ergänzt wurde, liefern positive Daten hinsichtlich des Gesamtüberlebens in umfangreichen, multizentrischen Phase-III-Studien. Bemerkenswerterweise sind diese Ergebnisse unabhängig vom PD-L1-Status. Es bleibt zu klären, inwieweit das molekulare Profil den therapeutischen Nutzen von Checkpoint-Inhibitoren beeinflusst.

Trotz dieser therapeutischen Fortschritte und der Einführung eines neuen Therapiestandards bleibt das mediane Gesamtüberleben in beiden Studien mit etwas über 12 Monaten hinter den Erwartungen zurück. Dies stellt, zusammen mit dem Pankreaskarzinom, weiterhin den niedrigsten Wert bei gastrointestinalen Tumoren im metastasierten Setting dar.

Die limitierte Wirksamkeit bei metastasierten Cholangiokarzinomen ist maßgeblich auf die begrenzten therapeutischen Möglichkeiten in der Zweitlinientherapie zurückzuführen. In umfangreichen Phase-II- oder Phase-III-Studien standen hauptsächlich Chemotherapie-Regime im Fokus. Das FOLFOX-Regime (bestehend aus Folinsäure, 5-FU und Oxaliplatin), angelehnt an die ABC-06-Studie, zeigte lediglich bescheidene Erfolge. Ursprünglich vielversprechende Ergebnisse aus der koreanischen NIFTY-Studie für das liposomale Irinotecan in Kombination mit 5-FU fanden in der deutschen NALIRICC-Studie keine Bestätigung. Daher bleibt der therapeutische Wert einer Irinotecan-basierten Therapie weiterhin ungewiss.(33,34)

### 1.9.2.2. Molekular informierte Therapiestrategien an nicht selektionierten Patienten

Bisher zeigten alle Untersuchungen zu molekularen Therapien, einschließlich solcher mit antiangiogenetischer Wirkung, bei nicht-selektierten Patientengruppen mit biliären Tumoren keinen Erfolg.(35)

### 1.9.2.3 Therapiestrategien an molekular selektionierten Patienten

In jüngster Zeit konnte eine detaillierte Charakterisierung der molekularen Landschaft biliärer Tumoren erzielt werden. Die Vielzahl der molekularen Angriffspunkte erinnert an das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, weshalb einige Experten das Cholangiokarzinom (CCC) als "NSCLC des Gastrointestinaltrakts" bezeichnen. (36) Besonders bei Patient:innen mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (iCCA) sind häufig (in bis zu 40% der Fälle) molekulare Veränderungen nachweisbar, die als potenzielle Ziele für präzisionsonkologische Therapieansätze dienen könnten. Um zielgerichtete Therapieoptionen so früh wie möglich zu bewerten, wird empfohlen, eine molekulare Analyse, sofern Tumorgewebe verfügbar ist, bereits während der Erstlinientherapie durchzuführen. Diese Empfehlung findet sich sowohl in den Leitlinien der European Society for Medical Oncology (ESMO) aus dem Jahr 2023 als auch in der deutschen S3-Leitlinie von 2023 (vgl. Abbildung 19).

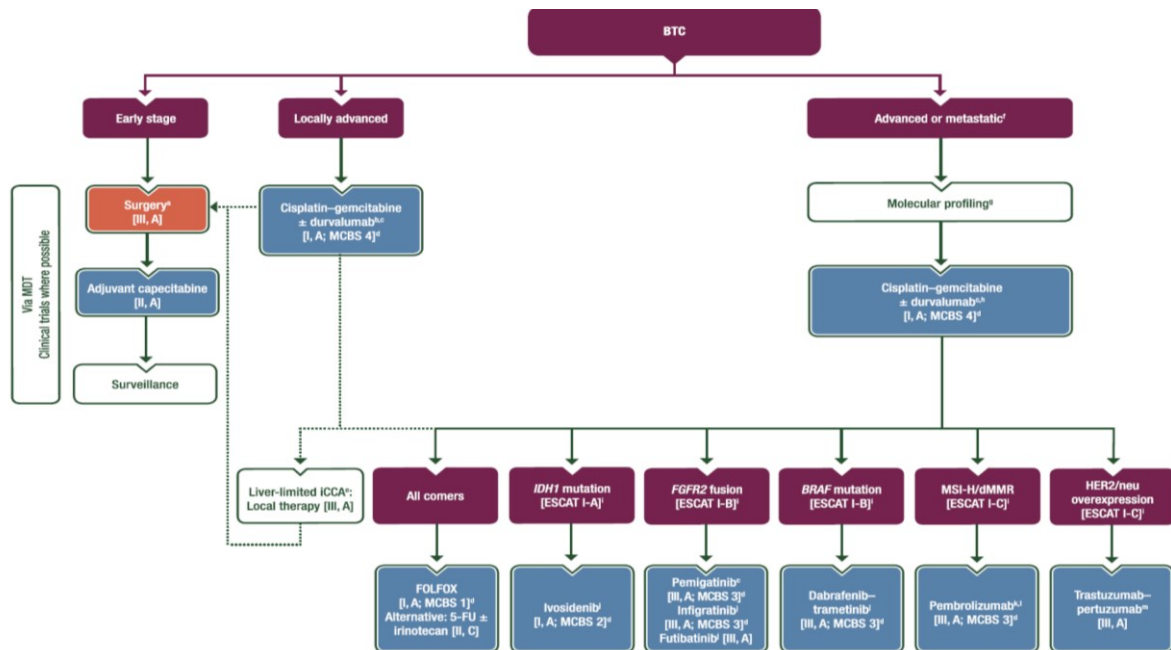


Abbildung 19: Aktuelle Therapieempfehlungen aus der ESMO Leitlinie zur Therapie biliärer Tumore betonen den frühen Einsatz molekularer Therapiestrategien in der 2nd line.(20)

Die Implementierung präzisionsonkologischer Studienansätze bei biliären Tumoren ist jedoch anspruchsvoll. Die genetischen Subgruppen dieser noch immer seltenen Tumorentität sind klein. Die von den regulierenden Behörden bisher geforderten Studien sind aufgrund von langen Rekrutierungszeiten oft nicht in kurzer Zeit realisierbar. Mit Ausnahme von Zweitlinientherapien, wie dem Einsatz des *FGFR2*-Inhibitors Pemigatinib, dem *IDH1*-Inhibitor Ivosidenib oder Therapieansätzen, die gegen *ERBB2* gerichtet sind (z.B. T-DXd oder Zanidatamab), basieren die meisten Behandlungsempfehlungen auf positiven Daten aus sogenannten Basket-Studien. Diese Daten untermauern jedoch klar den klinischen Nutzen zielgerichteter Therapieansätze bei Patient:innen mit biliären Tumoren.(22,37,38)

#### 1.9.2.4. Ausgewählte molekulare Targets

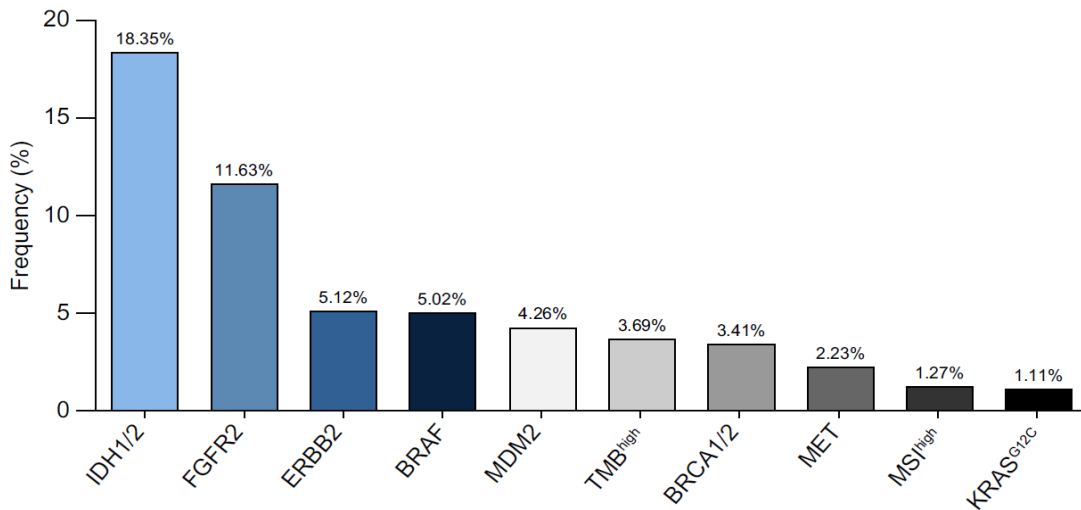


Abbildung 20: Häufigkeit der relevantesten genetischen Alteration beim iCCA aus einer Kohorte von über 6000 iCCA Patient:innen(14)

#### *IDH1*

Mutationen der Isocitratdehydrogenase 1 (*IDH1*) finden sich bei circa 15% der Patient:innen mit intrahepatischem Cholangiokarzinom (iCCA). Diese genetischen Aberrationen im *IDH1*-Gen resultieren in einer modifizierten enzymatischen Aktivität, die zur Akkumulation des Onkometaboliten (R)-2-Hydroxyglutarat führt. Dieser Metabolit beeinträchtigt wiederum die Funktion verschiedener  $\alpha$ -Ketoglutarat-abhängiger Enzyme (Abbildung 21).(39) Basierend auf aktuellen Daten scheint das Vorhandensein einer *IDH1*-Mutation keine prognostische Relevanz zu besitzen; zudem zeigen betroffene Patient:innen eine ähnliche Reaktion auf platinbasierte Chemotherapien in der ersten Therapielinie wie jene ohne diese Mutation. In der Phase-III-Studie ClarIDHy wurde die Effektivität des *IDH1*-Inhibitors Ivosidenib gegenüber einem Placebo nach Progression unter Erstlinientherapie analysiert. Der primäre Studienendpunkt, eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (PFS), wurde deutlich erreicht, mit einer Hazard Ratio (HR) von 0,37. Dennoch betrug das mediane PFS unter Ivosidenib lediglich 2,7 Monate im Vergleich zu 1,4 Monaten unter Placebo. Die radiologische

Ansprechrate auf Ivosidenib war gering. Die Auswirkung auf das Gesamtüberleben (OS) ist aufgrund des Einsatzes von Crossover-Protokollen schwierig einzuschätzen, zeigte sich jedoch – nach statistischer Korrektur bezüglich des Crossovers – als signifikant verbessert.(40) Die primären und sekundären Resistenzmechanismen gegenüber der gezielten Therapie bei *IDH1*-mutierten Patient:innen sind aktuell noch unzureichend charakterisiert. Aus den translationalen Analysen der ClarIDHy-Studie ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen klinischen oder molekularen Kovariaten und therapeutischer Effektivität. Basierend auf präklinischen Daten werden aktuell Kombinationen mit Checkpoint-Inhibitoren in klinischen Studien erprobt. Aktuell ist Ivosidenib für die Behandlung von biliären Tumoren sowohl von der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) als auch von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) zugelassen.

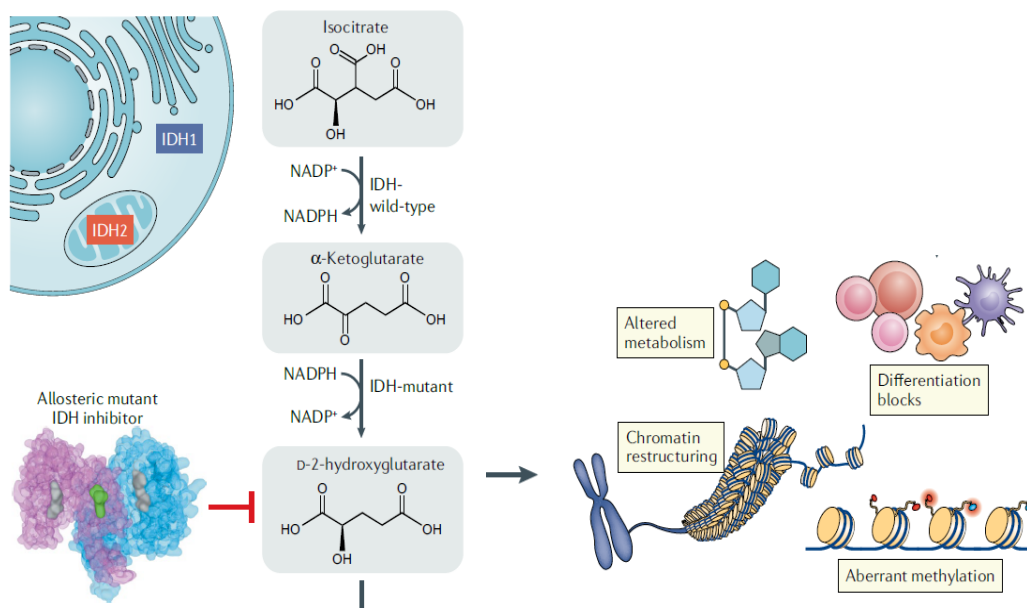


Abbildung 21: Konsequenzen einer *IDH1* Mutation mit Akkumulation des Onkometabolits (R)-2-Hydroxyglutarat. Die Wirkungsweise von *IDH1* Inhibitoren konnte vor allem auf einer Transdifferenzierung in eine mit besserer Prognose behafteten hepatischen Phänotyp beruhen.(39)

## FGFR2

Intrahepatische Cholangiozelluläre Karzinome (iCCA) zeigen in circa 10% der Fälle *FGFR2*-Fusionen, die durch Translokationen zwischen dem 5'-Bereich des *FGFR2*-Gens und dem 3'-Bereich eines von mittlerweile über 200 identifizierten Fusionspartnern resultieren (vgl. Abbildung 23 und 25). Diese führen zu einem überschießendem *FGFR* signaling mit Einfluss auf viele downstream geschaltete Signalwege (siehe Abbildung 22).

Verschiedene Phase-II-Studien demonstrierten die Wirksamkeit der Pan-*FGFR*-Inhibitoren Pemigatinib, Infigratinib, Erdafitinib, Derazantinib und Futibatinib. Trotz der teilweisen schweren Vorbehandlung der Studienteilnehmer lagen die Ansprechraten zwischen 21 und 42% und die Krankheitskontrollraten bei über 80%. Die medianen Werte für das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) betragen in diesen Studien zwischen 7-9 Monaten bzw. 12-22 Monaten, was konventionelle 2nd Chemotherapie im Quervergleich signifikant übertraf.(41–43)

Eine häufig beobachtete Nebenwirkung bei allen *FGFR* Inhibitoren ist die Hyperphosphatämie, welche auf die physiologische Rolle von *FGF23/FGFR1* in der Phosphathomöostase zurückzuführen ist. Zudem tritt häufig eine Diarrhoe auf, die vermutlich mit dem *FGFR4* Signalweg in Zusammenhang steht.

In Europa wurde Pemigatinib 2022 für die Zweitlinientherapie bei *FGFR2*-fusionierten CCA zugelassen. In den USA hat auch Futibatinib eine Zulassung erhalten. Die Entwicklung von *FGFR*-Inhibitoren deutet darauf hin, dass präzisionsonkologische Sequenzstrategien in der Zukunft umsetzbar sein könnten: Unterschiedliche Bindungseigenschaften könnten einen sequenziellen Einsatz spezifischer *FGFR*-Inhibitor-Klassen ermöglichen, selbst wenn bereits therapieinduzierte Punktmutationen als Resistenzmechanismus aufgetreten sind. Ein wiederholtes Monitoring, zum Beispiel mittels Liquid Biopsy, könnte therapieinduzierte Veränderungen frühzeitig identifizieren und den gezielten Einsatz weiterer Therapielinien ermöglichen (Abbildung 25)

Neuere *FGFR*-Inhibitoren, wie beispielsweise RLY-4008, könnten nicht nur gegen die Fusionen, sondern auch gegen primäre und sekundäre *FGFR2*-Resistenzmutationen wirksam sein. Insbesondere ist zu betonen, dass solche neueren Inhibitoren eine gesteigerte *FGFR2*-Selektivität aufzeigen, was zu einer

reduzierten Nebenwirkung, insbesondere im Hinblick auf den Phosphathaushalt, führen könnte.(44)

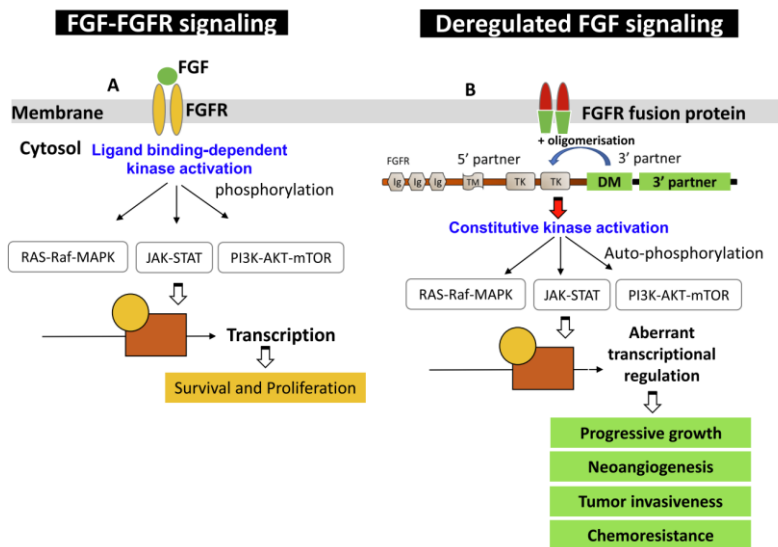


Abbildung 22: Zelluläre Folgen eines deregulierten *FGFR* signalings.(45)

*FGFR* fusions identified in iCCA.

<i>FGFR</i> fusion	Frequency	References
<b>Recurrent <i>FGFR2</i> fusions</b>		
• <i>FGFR2-BICC1</i>	2 cases 3.0% (2/66) 12.7% (8/63) 28.9% (31/107)	Wu 2013 [19] Arai 2014 [20] Jain 2018 [27] Abou-Alfa 2020 [49]
• <i>FGFR2-AHCYL1</i>	10.6% (7/66)	Arai 2014 [20]
• <i>FGFR2-PPHLN1</i>	16.8% (18/107)	Sia 2015 [29]
<b>Less frequently observed <i>FGFR</i> fusions</b>		
• <i>FGFR2-AFF4</i>	• <i>FGFR2-MGEA5</i>	References Abou-Alfa 2020 [49]; Borad 2014 [21]; Ross 2014 [25]; Jusakul 2017 [13]; Jain 2018 [27]; Javle 2017 [48]; Goyal 2019 [30]; Kongpetch 2020 [28]
• <i>FGFR2-AFF4, R678G</i>	• <i>FGFR2-MYPN</i>	
• <i>FGFR2-AMPD2</i>	• <i>FGFR2-NOL4</i>	
• <i>FGFR2-ARHGAP24</i>	• <i>FGFR2-NRAP</i>	
• <i>FGFR2-C10</i>	• <i>FGFR2-PARK2</i>	
• <i>FGFR2-CCDC6</i>	• <i>FGFR2-PCMI</i>	
• <i>FGFR2-CELF2</i>	• <i>FGFR2-Rearrangement intron 17</i>	
• <i>FGFR2-CGNL1</i>	• <i>FGFR2-RNF41</i>	
• <i>FGFR2-CTNNA3</i>	• <i>FGFR2-SH3GLB1</i>	
• <i>FGFR2-DCTN2</i>	• <i>FGFR2-SLMAP</i>	
• <i>FGFR2-DNAJC12</i>	• <i>FGFR2-SORBS1</i>	
• <i>FGFR2-DZIP1</i>	• <i>FGFR2-STK26</i>	
• <i>FGFR2-f118</i>	• <i>FGFR2-STK3</i>	
• <i>FGFR2-FOXP1</i>	• <i>FGFR2-TACC3</i>	
• <i>FGFR2-INA</i>	• <i>FGFR2-TBC1D1</i>	
• <i>FGFR2-KCTD1</i>	• <i>FGFR2-UBQLN1</i>	
• <i>FGFR2-KIAA1217</i>	• <i>FGFR2-WAC</i>	
• <i>FGFR2-KIAA1598</i>	• <i>FGFR2-ZMYM4</i>	
• <i>FGFR2-KIF7</i>	• <i>FGFR3-TACC3</i>	
• <i>FGFR2-LGSN</i>		
• <i>FGFR2-LPXN</i>		

Abbildung 23: Übersicht über die bisher publizierten *FGFR2* Fusionspartner.(45)

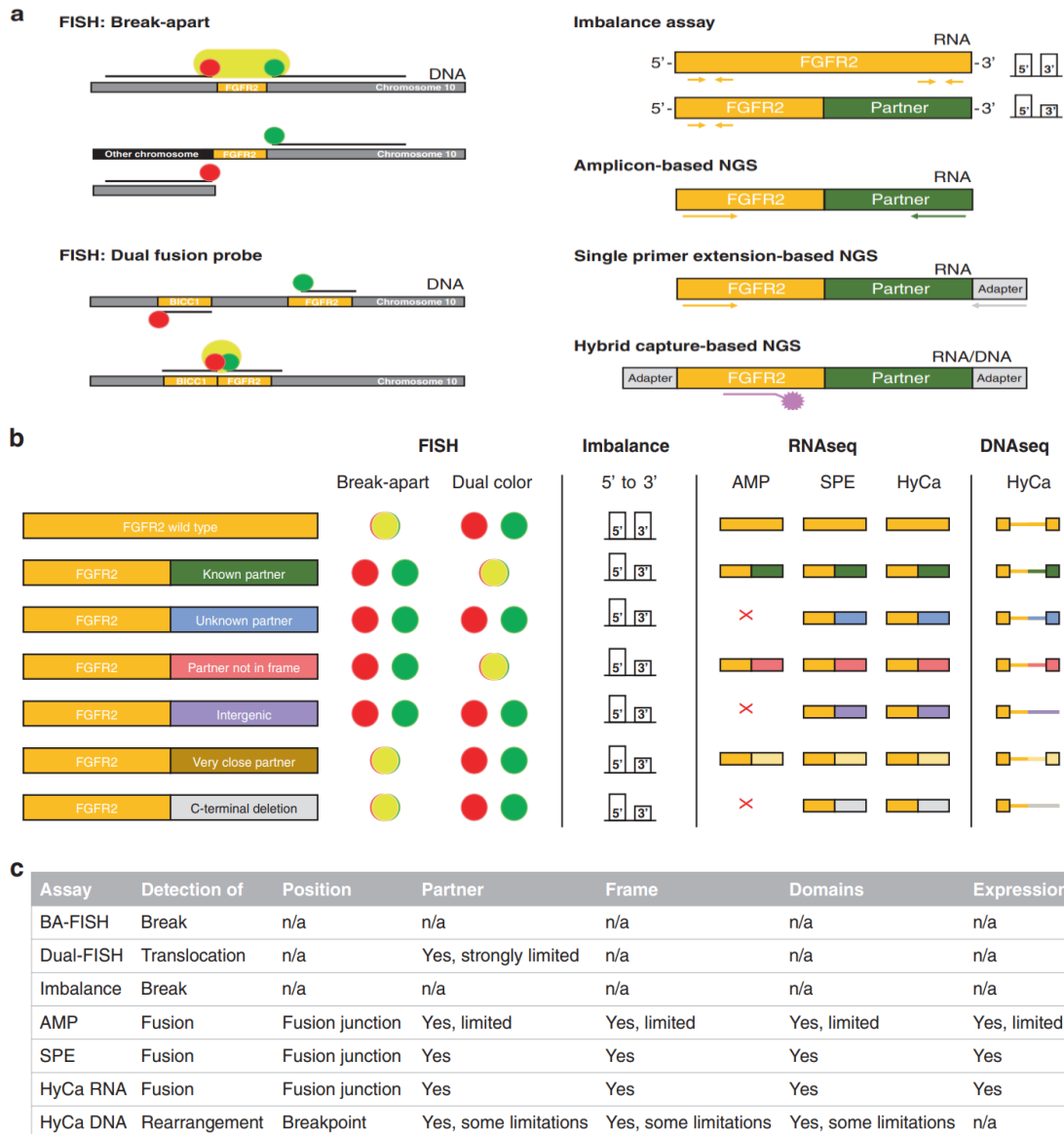


Abbildung 24: Problemfelder der *FGFR2* Fusionsdiagnostik. FISH zeigt Schwächen in der Identifizierung von unbekanntem Fusionspartnern, „C-terminal deletion“ oder „very close partner“.(27)

<i>FGFR2</i> Mutation	Kinase Domain Region	Factor Change in IC <sub>50</sub> vs. Wild-Type <i>FGFR2</i>			
		Futibatinib	Pemigatinib	Infigratinib	Erdaftinib
Wild-type	—	1	1	1	1
N550D	Regulatory triad	2	102	81	10
N550K	Regulatory triad	8	164	68	13
V563L	—	3	5	14	1
V565I	Gatekeeper	4	42	>236	1
V565L	Gatekeeper	44	335	>236	23
E566A	Regulatory triad	3	8	12	1
E566G	Regulatory triad	2	6	10	1
K642I	Regulatory triad	2	20	15	22
K642R	Regulatory triad	2	7	16	1
K660M	Activation loop	5	23	63	19

Abbildung 25: Heat Map der Punktmutationen als Resistenzmechanismus bei gegen *FGFR2* Fusionen gerichteter Therapie und die Sensitivität auf unterschiedliche Kinaseinhibitoren.(41)

## ERBB2

*ERBB2*-zielgerichtete Therapieansätze sind in der Onkologie seit Jahren etabliert und haben sich insbesondere bei soliden Tumoren, wie Mammakarzinom und gastroösophagealen Neoplasien, bewährt. Es lassen sich mehrere therapeutische Strategien differenzieren: Zum einen monotherapeutische Ansätze, die sich auf die Hemmung von *ERBB2* durch Antikörper oder „small molecules“- meist Tyrosinkinaseinhibitoren- stützen, andererseits dient *ERBB2* Andockstelle für antibody drug conjugates (ADC's) wie Trastuzumab deruxtecan (T-DXd) (siehe Abbildung 26)(46)

In der Behandlung von biliären Tumoren zeigten dual-antikörperbasierte Therapien, speziell die Kombination von Trastuzumab und Pertuzumab, Wirksamkeit bei Patienten, die bereits mehrere Therapielinien durchlaufen hatten. Dies wurde sowohl in der MyPathway- als auch in der TAPUR-Studie demonstriert. Zanidatamab, ein bispezifischer Antikörper gegen *ERBB2*, zeigte in der Phase-2-Studie HERIZON-BTC-01 ebenfalls vielversprechende klinische Ergebnisse.(47,48) Darüber hinaus legen die beim ASCO 2023 vorgestellten Daten nahe, dass die Kombination des Tyrosinkinaseinhibitors Tucatinib mit Trastuzumab eine weitere vielversprechende Option darstellt.(49) Hinsichtlich der Kombinationstherapie wurde in einer südkoreanischen Phase-II-Studie die Potenz von Trastuzumab in Verbindung mit dem Chemotherapeutikum FOLFOX hervorgehoben. Dies ermöglicht einen gezielten Angriff auf *ERBB2*-positive Tumorzellen. Für T-DXd zeigen vorläufige Daten der in Korea durchgeführten Phase-II HERB-Studie deuten auf eine gesteigerte Wirksamkeit bei Patienten mit hoher *ERBB2*-Expression hin.(50) Diese Daten konnte am diesjährigen ASCO 2023 durch die DESTINY-PanTumor02 bestätigt werden (Abbildung 27).(51) Ein signifikanter Mechanismus dieses ADC's ist der Bystander-Effekt, induziert durch den Topoisomerase-I-Inhibitor Deruxtecan.

Ein weiterer Unterschied in der Pathophysiologie von biliären Tumoren im Vergleich zu anderen *ERBB2*-alterierten Neoplasien ist das Vorhandensein von *ERBB2*-Mutationen im Gegensatz zu *ERBB2*-Amplifikationen. In diesem Kontext zeigte die SUMMIT-Phase-II-Basket-Studie, dass der Tyrosinkinaseinhibitor Neratinib bei Patienten mit *ERBB2*- und *ERBB3*-Mutationen klinisch aktiv ist, obwohl die

Ansprechrate im Vergleich zu herkömmlichen *ERBB2*-therapierten, *ERBB2*-amplifizierten Tumoren geringer zu sein scheint.(52) Alternative könnte eben wieder T-DXd oder auch Lapatinib hier eingesetzt werden.

Bei der Testung auf *ERBB2* Überexpression ist von Seiten der Pathologie zu beachten, dass die Kriterien des Magenkarzinoms zur Beurteilung einer *ERBB2* Positivität heranzuziehen sind. Die Interobserver Variabilität bei der Beurteilung einer *ERBB2* Positivität bleibt problembehaftet. Ähnliches zeichnet sich hier für die liquid biopsy ab (siehe Abbildung 28)

Inwiefern *ERBB2*-low als Target bei biliären Tumoren spielt bleibt abzuwarten. Die Daten aus der DESTINY-PanTumor02 zeigen jedenfalls vorerst keine positiven ORR Daten (vgl. Abbildung 27)

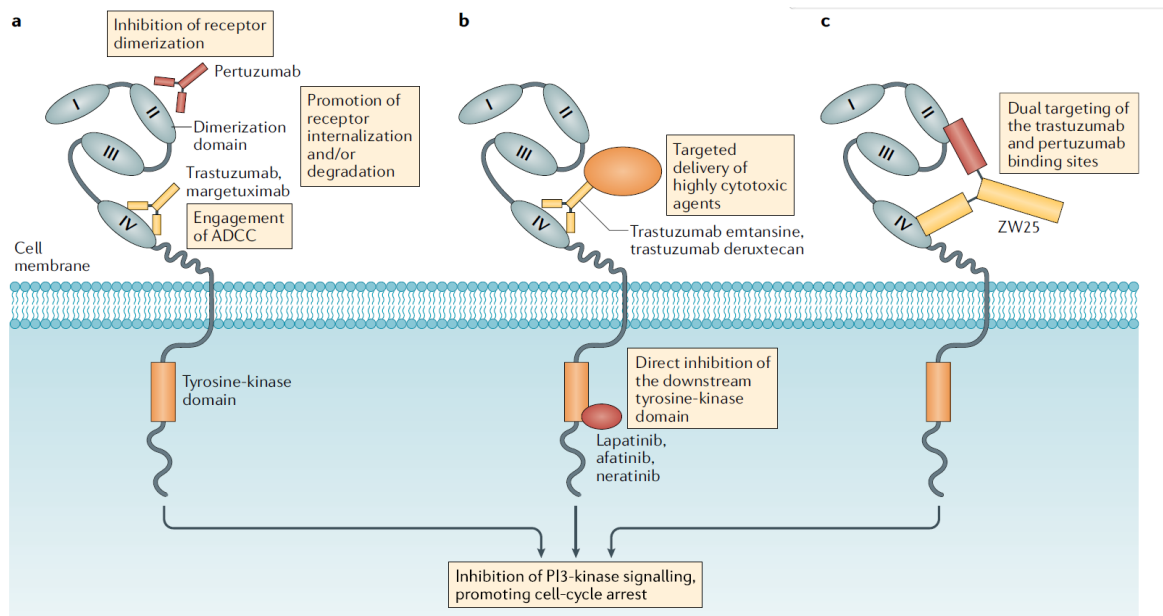


Abbildung 26: Strategien der *ERBB2* Blockade. (46)

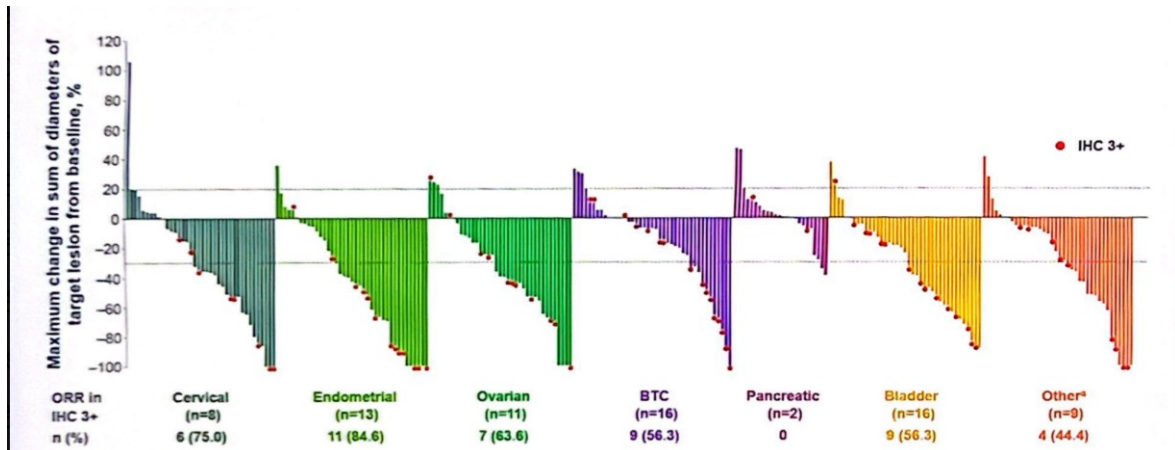


Abbildung 27: Strategien der *ERBB2* als tumoragnostisches Target; DESTINY-PanTumor02 ORR von T-DXd bei verschiedenen Tumorentitäten. Biliäre Tumore in violett.(51)

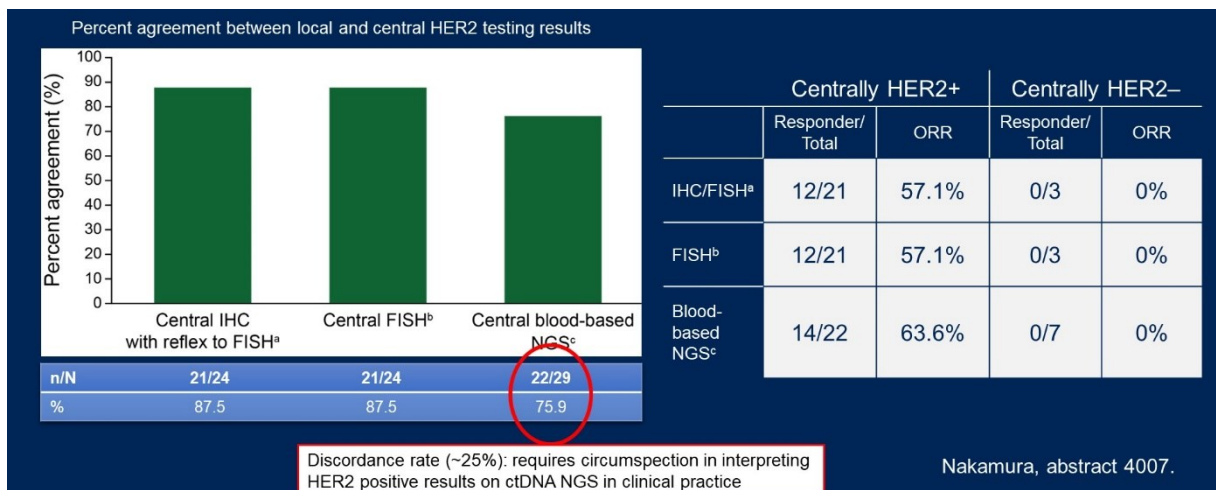


Abbildung 28: Diskordanz der *ERBB2* Testung central vs peripher; Gewebe basiert vs liquid biopsy.(49)

## BRAF

Die Prävalenz von aktivierenden Mutationen im *BRAF*-Gen liegt bei 3–5% in biliären Neoplasien. Über 50% der Patienten mit iCCA zeigen eine typische Klasse-1-*BRAF*-V600E-Mutation. Die verbleibende Patientenpopulation weist schwierig zu adressierbare Klasse-2- und -3-*BRAF*-Mutationen auf. Im Kontext von Melanomen erwies sich eine *BRAF*-gerichtete Monotherapie als effektiv. Jedoch zeigten gastrointestinale Neoplasien nicht dieselbe Ansprechrate. Sequenzielle Inhibition des EGFR-MAPK-Signalweges durch die Kombination von *EGFR*- und *BRAF*- oder

*BRAF*- und *MEK*-Inhibitoren hat sich jedoch als eine effizientere Strategie für *BRAF*-V600E-mutierte GI-Tumoren herausgestellt und ist inzwischen etablierter Bestandteil der Therapie beim *BRAF*-V600E-mutierten Kolorektalkarzinom (Abbildung 29). Für *BRAF*-V600E-mutierte iCCA haben die ROAR-Basket-Studie (Kombination von Trametinib und Dabrafenib) und die TAPUR-Studie (Kombination von Cobimetinib und Vermurafenib) signifikante Wirksamkeit gezeigt, mit Ansprechraten von >40% und Krankheitskontrollraten von >80% (vgl. Abbildung 30).(53) Daten bezüglich der Wirksamkeit von Therapieansätzen für Klasse-2- und -3-*BRAF*-Mutationen sind noch limitiert, daher ist die Einbindung in ein molekulares Tumorboard oder die Einbeziehung in klinische Studien zu empfehlen.

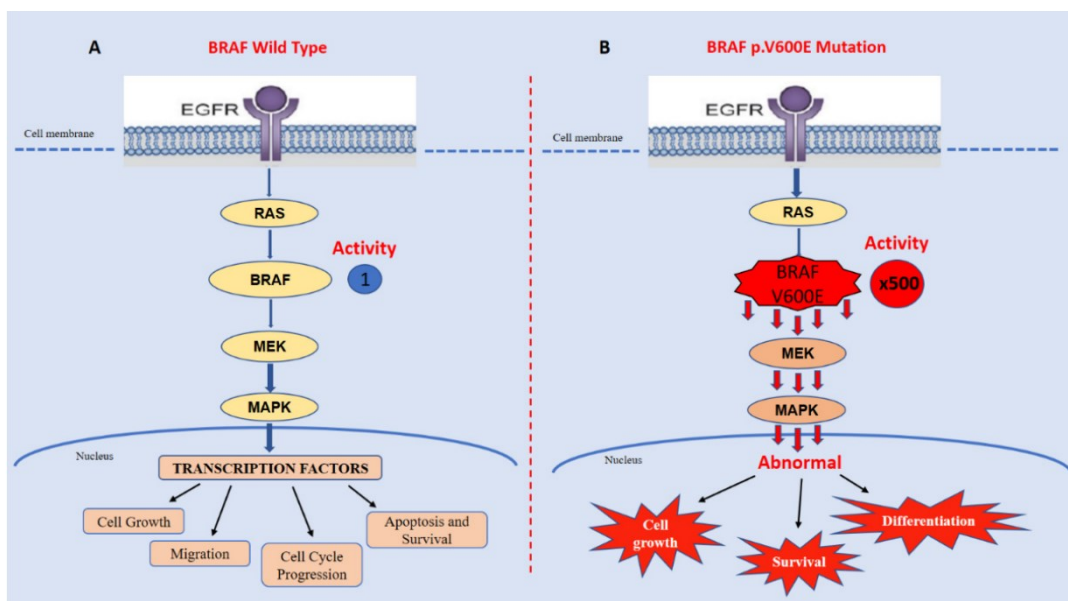


Abbildung 29: *BRAF* V600E führt zu exzessiven MAPK signaling und maligner Transformation. (54)

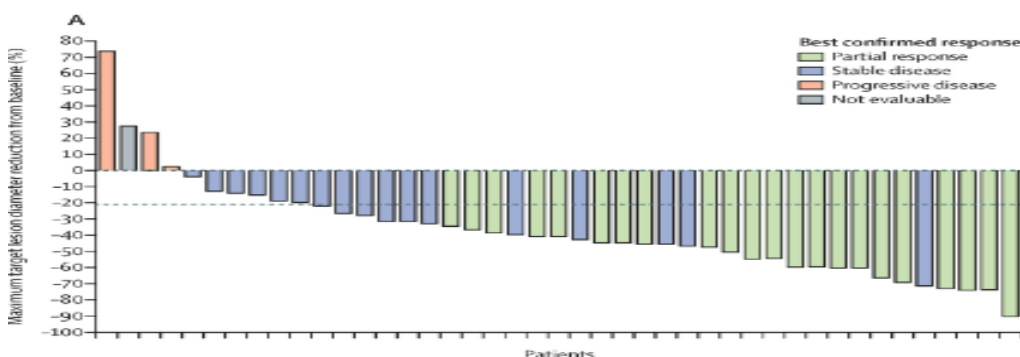


Abbildung 30: Ansprechraten auf kombinierte *BRAF/MEK* Inhibition bei *BRAF* V600E mutierten Tumoren aus der ROAR Studie.(53)

## KRAS

*KRAS* stellt einen prominenten onkogenen Treiber in humanen Tumoren dar. Beachtenswert ist, dass mehr als 80% der *KRAS*-Mutationen im Codon 12 lokalisiert sind, welcher typischerweise ein Glycinrest aufweist. *KRAS* wurde aufgrund der besonderen Proteinstruktur lange als nicht „druggable“ angesehen.(55) Die *KRAS* G12C Mutation war die erste die durch Sotorasib inhibiert werden konnte. Die *KRAS*-G12C-Mutation, die die GTP-assoziierte aktive Konformation von *KRAS* fördert, resultiert in erhöhter Zellproliferation (Abbildung 31). Diese Mutation wird bei zirka 14% der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) Patienten und bei 3-4% der kolorektalen Karzinom (CRC) Patienten festgestellt. Zudem wurde sie sporadisch, mit einer Prävalenz von 1-2%, in Gallengangskarzinomen identifiziert. Adagrasib agiert als ein oral applizierter, kovalenter Inhibitor, welcher selektiv und irreversibel an *KRAS*-G12C bindet und somit dessen inaktiven, GDP-assoziierten Zustand stabilisiert. In der multizentrischen Phase-I/II-Studie KRYSTAL-1 wurde Adagrasib bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren und *KRAS*-G12C-Mutationen getestet. Bisherige Daten aus dieser Studie zeigten positive Ergebnisse sowohl bei NSCLC als auch bei CRC. Vorläufige Ergebnisse wiesen auch auf therapeutisches Potenzial bei biliären Tumoren hin, wobei 5 von 12 Patienten mit biliären Karzinomen eine Remission zeigten, was einer Gesamtansprechrate (ORR) von 42% entspricht. Das mediane progressionsfreie Überleben (PFS) betrug 7,4 Monate.(56)

Trotz der ermutigenden Resultate ist es wahrscheinlich, dass zukünftige therapeutische Ansätze verstärkt Kombinationstherapien in Erwägung ziehen werden, um potentiellen Resistenzmechanismen entgegenzuwirken. Ein Variante wäre die Kombination mit einem EGFR Inhibitor analog dem CRC.

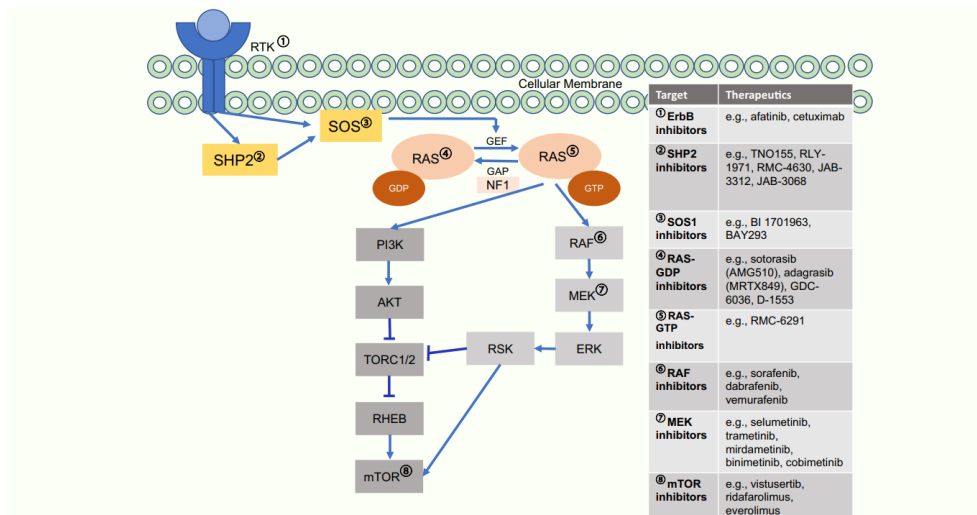


Abbildung 31: RAS Mutationen führen zu einem konstitutiv gesteigerten MAPK signaling. Diese kann an mehreren Ebenen unterbunden werden. Neue KRAS Inhibitoren greifen am GDP-GTP Austausch an (Ebene 4).(55)

## MSI

Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und Mismatch-Repair-Defizienz (dMMR) repräsentieren molekulare Anomalien, die mit einer defizienten DNA-Reparaturfähigkeit in Zusammenhang stehen (siehe Abbildung 32) Bei Gallenwegstumoren sind diese Anomalien selten und betreffen nur etwa 1% der Patienten. Dennoch stellt MSI in gastrointestinalen Tumoren einen der bestätigten prädiktiven Biomarker für ein Ansprechen auf Immuntherapie dar (vgl. KN 158 Studie; Abbildung 33)

Die Phase-III-Studien TOPAZ-1 und KEYNOTE-966 haben die Bedeutung der Immuntherapie als Erstlinientherapie hervorgehoben.(57,58) Dennoch bleibt die Frage offen, inwiefern eine Intensivierung der Immuntherapie, durch z.B. die Zugabe eines CTLA4-Inhibitors, den Therapieerfolg bei MSI-Patienten potenzieren könnte. Eine duale Checkpoint-Inhibition ohne die Verwendung von Chemotherapie wäre dabei besonders reizvoll, da sie eine potenzielle Steigerung der Therapieeffizienz mit einer möglichen Reduktion der Toxizität verbindet.

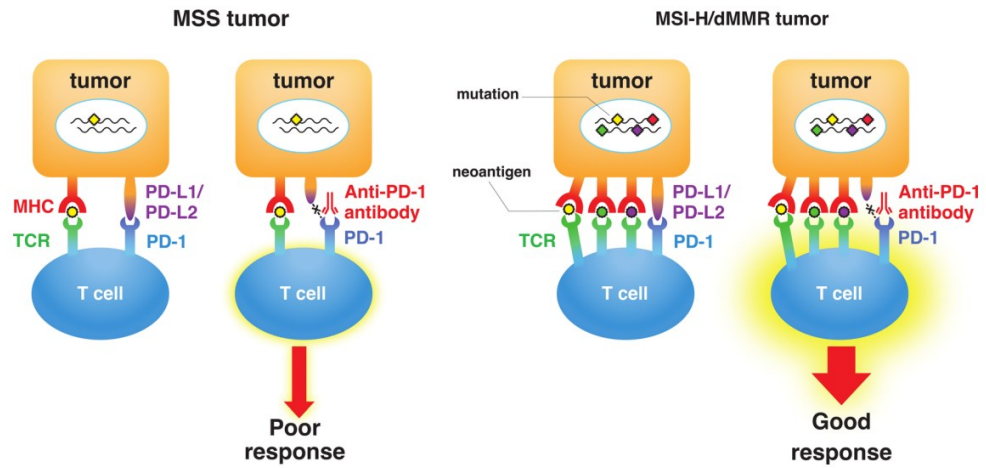


Abbildung 32: Wirkungsweise von PD-1/PD-L1 Inhibitoren bei MSI Tumoren. MSI Tumoren sind oft mit erhöhtem TMB vergesellschaftet. Diese Neoantigen werden den T-Zellen präsentiert. Checkpoint Inhibitoren lösen die PD-1/PD-L1 Interaktion („release the brakes“) und führen zu einer verstärkten Immunreaktion.(59)

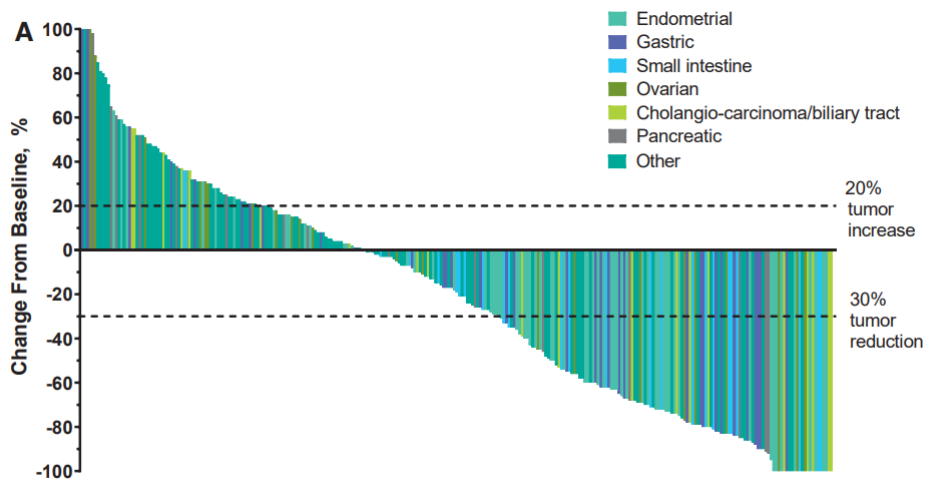


Abbildung 33: ORR in der Keynote 158 Studie. CCC in hellgrün.(60,61)

### *Weitere therapeutisch relevante genetische Alterationen*

Einige der bislang diskutierten genetischen Veränderungen gehören zu den häufigsten und therapeutisch relevantesten in dieser Tumorentität. Jedoch existieren auch niedrigfrequente Alterationen, die als potenzielle therapeutische Zielstrukturen im Rahmen präzisionsonkologischer Ansätze dienen könnten.

Zu den selteneren, aber dennoch therapeutisch relevanten genetischen Veränderungen gehören diverse Fusionsproteine. Beispielsweise sind *NTRK*-Fusionen für ihre entitätsunabhängige therapeutische Relevanz bekannt, wobei die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) die Inhibitoren Larotrectinib und Entrectinib bereits zugelassen hat.<sup>(62)</sup> *RET*-Fusionen, die primär im Kontext von Lungenkarzinomen beschrieben werden, sowie *NRG1*-Fusionen können ebenfalls als mutmaßliche Treibermutationen in biliären Tumoren fungieren. Es ist erwähnenswert, dass Patienten mit Cholangiokarzinom in Basket-Studien, die *RET*-Inhibitoren (Selpercatinib und Pralsetinib) sowie *NRG1*-Fusionen (Seribantumab und Zenocutuzumab) betreffen, eingeschlossen waren.<sup>(63,64)</sup> Afatinib kann bei *NRG1* Fusionen außerhalb von Studien erwogen werden. Weitere lohnenswerte, aber selten Targets sind *MET* Amplifikation (Tepotinib) oder *MDM2* Amplifikationen (Milademetan).

Jedenfalls ist bei diesen seltenen Alterationen eine Besprechung in einem molekularem Tumorboard zu empfehlen.

Studie	Phase	Linie	Therapie	Molekulare Alteration	Anzahl n	ORR (%; 95%-KI)	DCR (%; 95%-KI)	mPFS (Monate; 95%-KI)	mOS (Monate; 95%-KI)	Referenz
<b>Immuntherapie</b>										
KEYNOTE-158	II	2	Pembrolizumab	–	104	5,8 (2,1–12,1)	22,1 (N/A)	2,0 (1,9–2,1)	7,4 (5,5–9,6)	[4]
TOPAZ-1	III	1	Gemcitabin/Cisplatin/ Durvalumab	–	685	26,7 vs. 18,7	–	7,2 (6,7–7,4) vs. 5,7 (5,6–6,7)	12,8 (11,1–14,0) vs. 11,5 (10,1–12,5)	[3]
KEYNOTE-966	III	1	Gemcitabin/Cisplatin/ Pembrolizumab	–	1069	29 (25–33) beide Studienarme	75 (71–79) vs. 76 (72–80)	6,5 (5,7–6,9) vs. 5,6 (5,1–6,6)	12,7 (11,5–13,6) vs. 10,9 (9,9–11,6)	[6]
<b>Molekulare Therapie</b>										
Fight-202	II	≥2	Pemigatinib (FGFR 1–3)	FGFR2-Fusionen/ Rearrangements	107	35,5 (26,5–45,4)	82,0 (74–89)	6,9 (6,2–9,6)	21,1 (14,8– nicht erreicht)	[10]
NCT02150967	II	≥2	Infigratinib (FGFR 1–3)	FGFR2-Fusionen	122	23,1 (15,6–32,2)	84,3 (76,0–90,6)	7,3 (5,6–7,6)	12,2 (10,7–14,9)	[11]
RAGNAR	II	≥2	Erdafitinib (Pan-FGFR)	FGFR2-Aberationen/ Fusionen	11	66,7 (N/A)	100 (N/A)	5,59 (1,87–nicht erreicht)	N/A	[12]
FIDES-02	II	≥2	Derazantinib (Pan-FGFR)	FGFR2-Fusionen	29	20,7 (N/A)	82,8 (N/A)	5,7 (4,0–9,2)	Nicht erreicht	[13]
FOENIX-CCA2	II	≥2	Futibatinib (Pan-FGFR)	FGFR2-Fusionen/ Rearrangements	103	42 (32–52)	83 (74–89)	9,0 (6,9–13,1)	21,7 (14,5– nicht erreicht)	[14]
REFOCUS	II	≥2	RLY-4008 (FGFR2)	FGFR2-Fusions/ Rearrangements	17	82,4 (56,6–96,2)	100 (80,5–100,0)	N/A	N/A	[15]
ClarIDHy	III	2	Ivosidenib	IDH1-Mutationen	185	2,4 (N/A)	53 (N/A)	2,7 vs. 1,4 (1,6–4,2)	10,3 (7,8–12,4) vs. 7,5 (4,8–11,1)	[16]
MyPathway	II	≥2	Pertuzumab/ Trastuzumab	Her2-Amplifikation/ Überexpression	39	23 (11–39)	51 (35–68)	4,0 (1,8–5,7)	10,9 (5,2–15,6)	[17]
TAPUR	II	≥2	Pertuzumab/ Trastuzumab	Her2-Mutation/ Amplifikation/ Überexpression	29	32 (16–52)	40 (29–53)	2,5 (1,8–3,7)	6,9 (3,9–11,3)	[18]
KCSG-HB19-14	II	≥2	FOLFOX/Trastuzumab	Her2-Amplifikation/ Überexpression	34	29,4 (16,7–46,3)	79,4 (62,9–89,9)	5,1 (3,6–6,7)	10,7 (7,9– nicht erreicht)	[19]
HERB	II	≥2	Trastuzumab- Deruxtecan	Her2-Amplifikation/ Überexpression	22	36,4 (19,6–56,1)	81,8 (59,7–94,8)	5,1 (3,0–7,3)	7,1 (4,7–14,6)	[20]
HERIZON-BTC	II	≥2	Zanidatamab	Her2-Amplifikation/ Überexpression	86	41,3 (30,4–52,8)	68,8 (57,4–78,7)	5,5 (3,7–7,3)	N/A	[21]
SGNTUC-019	II	≥2	Trastuzumab/Tucatinib	Her2-Überexpression/ Amplifikation	30	46 (30,8–63,0)	76,7	5,5 (3,9–8,1)	15,5 (6,5–16,7)	[22]
SUMMIT	II	≥2	Neratinib	Her2-Mutation/ Amplifikation/ Überexpression	25	16 (4,5–36,1)	24 (9,3–45,1)	2,8 (1,1–3,7)	5,4 (3,7–11,7)	[23]
ROAR	II	≥2	Dabrafenib/Trametinib	BRAF-V600E	43	47 (31–62)	N/A	7,2 (N/A)	11,2 (N/A)	[24, 25]
TAPUR	II	≥2	Vemurafenib/ Cobimetinib	BRAF-V600E	31 (2 CCA)	57 (37–76)	68 (90%-Kt: 54–100)	5,8 (N/A)	15,2 (N/A)	[26]
eNRGy	II	≥2	Zenocutuzumab	NRG1-Fusion	83 (3 CCA)	34 (24–46)	N/A	N/A	N/A	[27]
CRESTONE	II	≥2	Seribantumab	NRG1-Fusion	12 (0 CCA)	33 (N/A)	92 (N/A)	N/A	N/A	[28]
NAVIGATE	II	≥2	Larotrectinib	TRK-Fusion	55 (2 CCA)	75 (61–85)	88 (N/A)	Nicht erreicht	Nicht erreicht	[29]
STARTRK	II	≥2	Entrectinib	TRK-Fusion	54 (1 CCA)	57 (43,1–70,8)	–	11,0 (8,0–14,9)	21,0 (14,9– nicht erreicht)	[30]
ARROW	I/II	≥2	Pralsetinib	RET-Fusion	23 (3 CCA)	57 (35–77)	83 (61–95)	7,4 (5,1–13,6)	13,6 (7,5–nicht erreicht)	[31]
LIBRETTO	I/II	≥2	Selpercatinib	RET-Fusion	41 (3 CCA)	43,9 (28,5–60,3)	N/A	N/A	N/A	[32]
KRYSTAL-1	II	≥2 (1 in 1L)	Adagrasib	KRAS-G12C	64 (12 BTC)	35,1 BTC: 41,7 (5/12)	91,7	BTC: 8,6 (2,7–11,3)	15,1 (8,6– nicht erreicht)	[33]

95%-KI 95%-Konfidenzintervall, BTC, biliary tract cancer, biläre Karzinome, CCA Cholangiokarzinom, DCR „disease control rate“, Krankheitskontrollrate, FOLFOX folinsäure, 5-FU, Oxaliplatin, mPFS „mean progression-free survival“, mittleres progressionsfreies Überleben, N/A nicht angegeben, ORR „overall response rate“

Abbildung 34: Synopsis der bisher durchgeführten Studien zu molekular informierten Therapien bei biliären Tumoren.(65)

## 1.10. ESCAT (ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets)

Die fortschreitende Erweiterung genomischer Analysen bis hin zum Whole Genome Sequencing erfordert eine systematische Kategorisierung und Priorisierung hinsichtlich der klinischen Relevanz identifizierter genomischer Alterationen (GAs). Zur Adressierung dieses Bedarfs wurde die ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets (ESCAT) von der European Society for Medical Oncology (ESMO) entwickelt. Ziel dieses Systems ist die systematische Einstufung von GAs basierend auf dem aktuellen Stand wissenschaftlicher Evidenz.(21,22)

Die ESCAT gliedert sich in vier Hauptstufen (Tier I-IV) mit insgesamt elf Unterstufen (Tier I-A bis X), wobei die klinische Relevanz von höchster (I) bis niedrigster (X) abnimmt. Diese Klassifikation zielt darauf ab, molekulare Targets mit handlungsrelevantem Potential in der Onkologie zu identifizieren und Entscheidungsprozesse innerhalb molekularer Tumorboards zu unterstützen. Häufig wird ESCAT III/A als minimales Evidenzniveau für Empfehlungen von Tumorboards herangezogen.

Im Detail charakterisieren sich GAs der Stufe I durch hohe klinische Relevanz und sollten in der klinischen Praxis berücksichtigt werden, da diese durch klinische Studien belegt sind. Die Subkategorisierung (I-A bis I-C) reflektiert die Qualität der zugrunde liegenden Evidenz, insbesondere das Design der unterstützenden Studie.

Die Stufe II umfasst GAs, die möglicherweise klinisch relevant sind, für die jedoch weitere Evidenz erforderlich ist, entweder aufgrund der retrospektiven Natur der Studiendaten oder aufgrund mangelnder Überlebensvorteile.

Die Stufe III charakterisiert GAs, die in anderen Tumorentitäten relevant sein könnten oder ähnliche Signalwege aufweisen, jedoch ohne spezifische klinische Evidenz in der jeweiligen Tumorentität.

Die Stufe IV fokussiert sich auf GAs, die präklinische Evidenz für ihre Relevanz aufweisen und potenziell in zukünftigen klinischen Studien untersucht werden könnten.

Abschließend ist die regelmäßige Überprüfung und Neubewertung des ESCAT-Stufen für individuelle Patienten essentiell, da das Feld der therapeutischen Targets

und deren Evidenzlage dynamisch ist. Dies spiegelt die rasante Entwicklung in der Onkologie wider und betont die Bedeutung einer individualisierten Präzisionsmedizin.

Eine ESCAT Klassifikation der häufigsten molekularen Targets bei biliären Tumoren ist in Abbildung 40 beschrieben.

ESCAT Tiers			Examples
<b>Tier-I</b>	Clinically relevant	A: survival benefit in prospective, randomised trials	ERBB2 amplification in breast cancer, BRCA 1/2 somatic and germline mutation in breast and prostate cancer  PIK3CA mutation in HR+ breast cancer  BRAF mutation in melanoma
		B: clinical benefit in prospective, single-arm trials	ROS1 fusion or BRAF V600E mutation in NSCLC
		C: clinical benefit in basket trials	NTRK1 fusion in NSCLC or gastric cancer
<b>Tier-II</b>	Potentially clinically relevant	A: clinical benefit in retrospective trials	PIK3CA mutation in prostate cancer
		B: increased responsiveness and outcome in prospective trials	ERBB2 mutation in breast cancer
<b>Tier-III</b>		A: clinical benefit in other tumor entities	PIK3CA mutation in NSCLC
		B: biomarker is located in the same gene/pathway as Tier I-III targets	ERBB3 mutation in breast cancer
<b>Tier-IV</b>	Evidence from preclinical studies	A: improved drug sensitivity in in-vitro or in-vivo models	IGF1R, MYC, SF3B1 in breast cancer
		B: actionability shown in in-silico models	CCND1 and FGFR1 amplifications in breast cancer
<b>Tier-V</b>		Improved objective response in prospective trials	PTEN
<b>Tier-X</b>	No relevance	Biomarkers are not actionable	TET2

Abbildung 35: Aufbau der ESCAT Tiers und Beispiele für Annotationen(66)

## 2. Retrospektive Datenerhebung am Tumorzentrum OÖ

### 2.1. Einleitung

Für österreichische Patient:innen existieren bislang wenige prospektive noch retrospektive Daten, die den Stellenwert einer molekular informierten Therapie bei biliären Tumoren beleuchten.

Rezente ESMO Leitlinien zur molekularen Testung bei soliden Tumoren empfehlen bereits zur Therapieentscheidung bei CCC's im inoperablen setting eine NGS Routinetestung in Analogie zum Lungenkarzinom(28). Umso mehr ist eine Charakterisierung des zu erwarteten zusätzlichen klinischen benefits unabdingbar. Die zu erhebenden Daten sollen helfen die Bedeutung und Konsequenz einer umfassenden molekularen Analyse beim CCC darzulegen, damit zukünftig jeder Patient:in mit CCC in OÖ frühzeitigen genetischen Diagnostik unterzogen wird.

#### 2.1.1. Zielsetzung der Studie

Ziel der geplanten retrospektiven Analyse an biliären Tumoren, die in den letzten 3 Jahren am Tumorzentrum OÖ behandelt wurde, soll sein:

1. Die Charakterisierung der Mutationslandschaft biliärer Tumore anhand eines OÖ Kollektives. Anschließend sollen pathogene Varianten anhand der ESCAT Kriterien eingereiht und bewertet werden. Es soll gezeigt werden, dass analog zum Lungenkarzinom eine Reflextestung auf molekular definierte Targets unabdingbar ist.
2. Die Bedeutung des Einsatzes molekular informierter Therapeutika in der Therapiesequenz biliärer Tumore darzustellen. Effektivitätsdaten sollen den Unterschied im Gesamtüberleben von Patienten, die zielgerichtet behandelt werden konnten zu rein chemotherapeutisch behandelten Patient:innen zeigen.
3. Weiters soll das PFS Verhältnis zielgerichtete Therapie zu Chemo- Vortherapie ermittelt werden. Dies ist ein etablierter Parameter, um die Effektivität zielgerichteter Therapieansätze darzustellen.(67)

## 2.2. Methoden

In dieser Studie führten wir eine retrospektive Überprüfung der Krankenakten von Patienten durch, die zwischen September 2015 und Januar 2022 am Tumorzentrum OÖ mit BTC diagnostiziert wurden.

Zur Studie zugelassen wurden Patienten, bei denen eine histologisch gesicherte Diagnose eines BTC vorlag und eine molekulare Profilierung des Tumorgewebes durchgeführt wurde. Entscheidungen für individuelle, molekular abgestimmte therapeutische Optionen basierten auf der aktuellen wissenschaftlichen und klinischen Erfahrung, der Verfügbarkeit klinischer Studien und den zu diesem Zeitpunkt zugelassenen Wirkstoffen. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur molekularen Analyse wurde von jedem Patienten im Rahmen des regulären klinischen Ablaufs eingeholt. Von den elektronischen Patientenakten wurden Daten zu Demografie, Resektion, lokal-therapeutischen Ansätzen, Chemotherapie, zielgerichteten Therapien und Überlebensstatus bis September 2022 gesammelt. Die Stadien wurden gemäß der TNM-Klassifikation, 8. Auflage, definiert. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Stata-Softwarepaket (Stata, Version 17.0; StataCorp) und GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) durchgeführt.

Die Studie wurde im von der Ethikkommission des Land Oberösterreich bestätigt ist im Einklang mit der Deklaration von Helsinki 1975 (Ethikvotum: 1100/2023).

### 2.2.1. Molekulare Profilierung und Klassifikation von Mutationen

Genetische Varianten wurden für die statistische Analyse analog den von Cao et al. festgelegten Kriterien analysiert.

Wir testeten zwei Variantenklassifikationssysteme in der Präzisionsonkologie, die typischerweise in molekularen Tumorboards verwendet werden. ESCAT, als Rahmenwerk für die Handlungsrelevanz molekularer Ziele wurde verwendet, um die klinische Evidenz für die abgestimmten zielgerichteten Therapien zu bewerten. Die Probenentnahme und die NGS-molekulare Profilierung wurden mit Tumorgewebe

durchgeführt, das aus Stanzbiopsien oder chirurgischen Proben gewonnen wurde. Die DNA wurde mit benutzerdefinierten NGS-Panels analysiert: die TruSight Tumor 170 - Illumina-Hybrid-Capture-Plattform (170 Gene für Mutationen, Amplifikationen oder Fusionsprodukte) oder die FoundationOne CDx-Hybrid-Capture-NGS-Serviceplattform (324 Gene sowohl für Mutationen als auch für Fusionsprodukte, Foundation Medicine, Inc.). Zusätzlich wurden Daten zum defekten Mismatch-Repair (dMMR)/Mikrosatelliteninstabilitätsstatus (MSI), PD-1 oder PDL-1 und HER2neu oder EGFR IHC gesammelt, wenn diese berichtet wurden.

Unser Hauptziel war es, das Gesamtüberleben (OS) von Patienten mit ESCAT I-IV Veränderungen, die mit gezielten Medikamenten abgeglichen wurden, im Vergleich zu denen zu bewerten, die mit Chemotherapie behandelt wurden. OS wurde als die Zeit von Beginn der Erstlinien-Systemchemotherapie bis zum Todesdatum definiert; Patienten ohne dokumentierten Tod am Stichtag wurden zum Datum zensiert, an dem bekannt war, dass der Patient zuletzt am Leben war. Die Aktivität der gezielten Behandlung wurde weiterhin mit dem PFS-Verhältnis beschrieben, das als PFS, das bei abgestimmter gezielter Therapie erreicht wurde, dividiert durch PFS oder Zeit bis zum Therapieversagen (TTF), das bei vorheriger Therapie beobachtet wurde, definiert wurde. Ein PFS-Verhältnis von  $\geq 1,3$  wurde auf Grundlage der Überlegungen von Bailey et al. und Von Hoff et al. als vorteilhaft erachtet, wobei jeder Patient als seine eigene Kontrolle dient, was ein Studienendpunkt für Präzisionsmedizinstudien ist, wie er von Gesundheitsbehörden wie der Europäischen Arzneimittel-Agentur empfohlen wird.

### 2.2.2. Statistik

Deskriptive Statistiken wurden verwendet, um die Basisdaten aller Patienten mit den molekularen Testergebnissen zusammenzufassen. Zeit-bis-Ereignis-Endpunkte wurden mit der Kaplan-Meier-Methode geschätzt und der Log-Rank-Test für den statistischen Vergleich verwendet

## 2.3. Ergebnisse

### 2.3.1. Patientencharakteristika

Insgesamt war das molekulare Profil von 88 Patienten mit biliären Tumoren verfügbar. Die Beschreibung der molekularen Landschaft basiert auf dieser Kohorte.

66 Patienten davon erhielten eine palliative Systemtherapie und wurden für nachfolgende Effizienz- und Lebenszeitanalysen verwendet. 22 Patienten wurden von einer weiteren Analyse ausgeschlossen; entweder wurde keine Systemtherapie durchgeführt oder es lag noch eine kurative Situation vor (Abbildung 36)

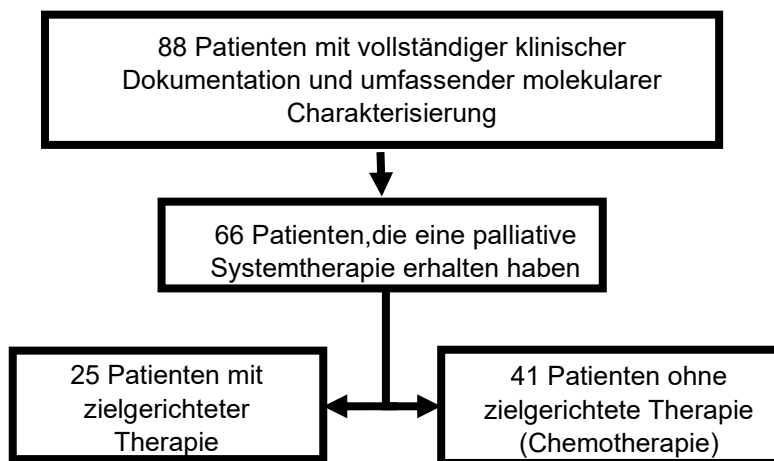


Abbildung 36: Consort Diagramm

Patienten, die eine zielgerichtete Therapie erhielten, waren jünger als diejenigen, die nur Chemotherapie erhielten; 60.96 vs. 68.29 Jahre. Das Geschlechterverhältnis war ausgeglichen. In der Chemotherapie Kohorte waren mehr Patienten mit ECOG- performance Status 1 oder 2 inkludiert, hingegen waren in der targeted therapy Gruppe bei 84% der Patienten ein ECOG 0 vorhanden. Wir beobachteten einen höheren Anteil von iCCA (80% vs 51.2%) in der Gruppe der Patienten, die für eine zielgerichtete Therapie in Frage kamen, während in der Chemotherapiegruppe mehr Patienten mit eCCA auftraten; Gallenblasenkarzinome waren nur 2 dokumentieren Es wurde kein relevanter Unterschied in der Tumorstadienverteilung zwischen den beiden Gruppen festgestellt. Patienten mit zielgerichteter Behandlung neigten häufiger zur primären Tumorresektion (36% vs 29.3%) und zur ablative Therapie (Strahlentherapie, RFA, SIRT, Metastasenresektion) (24% vs 2.4%) im Verlauf der Erkrankung (Abbildung 37).

Die meisten Patienten erhielten eine platinbasierte Kombination als erste systemische Behandlung Die Chemotherapie der zweiten Linie bestand meist aus Irinotecan (FOLFIRI, NALIRI+5FU oder platinbasierter Chemotherapie (FOLFOX). Insgesamt erhielten die Patienten in der Gruppe der zielgerichteten Therapie mehr Therapielinien: range [2-5] vs [1-4] als die Chemotherapiegruppe (Abbildung 37).

N	41 (62.1%)	25 (37.9%)
	Chemotherapie	Targeted Therapy
SEX		
m	27 (65.9%)	17 (68.0%)
w	14 (34.1%)	8 (32.0%)
Alter	68.29	60.96
Lokalisation		
eCCA&GBC	20 (48.8%)	5 (20.0%)
iCCA	21 (51.2%)	20 (80.0%)
Resektion Primum		
nein	29 (70.7%)	16 (64.0%)
ja	12 (29.3%)	9 (36.0%)
ECOG		
0	15 (36.6%)	21 (84.0%)
1	20 (48.8%)	4 (16.0%)
2	6 (14.6%)	0 (0.0%)
Stadium		
II	8 (19.5%)	4 (16.0%)
III	11 (26.8%)	9 (36.0%)
IV	22 (53.7%)	12 (48.0%)
Lokal ablative Verfahren		
ja	1 (2.4%)	6 (24.0%)
nein	40 (97.6%)	19 (76.0%)
Platin haltige Erstlinientherapie	34 (82.9%)	20 (80%)

Anzahl der Therapielinien range	1-4	2-5
Etablierung der targeted therapy		
2nd line		14 (56%)
3rd line		9 (36%)
4th line		1 (4%)
5th line		1 (4%)

Abbildung 37: „Table 1“ der Patientencharakteristika

### 2.3.2. Charakterisierung der genetischen Alterationen und klinische Annotation analog ESCAT

Die drei am häufigsten veränderten Gene waren *TP53* (43.18%), *KRAS* (29.55%) und *CDKN2A* (27.27%). Die derzeit bei biliären Tumoren in Diskussion stehenden Alterationen von *FGFR2* (13.64%) oder *IDH1* (2.27%) waren deutlich seltener (Abbildung 39). Abbildung 38 zeigt im Überblick das Spektrum an genetischen Alterationen pro Patient. Auffallend ist, dass bei *FGFR2/3* Alterationen Fusionen dominieren, während bei *ERBB2* oder *MET* Amplifikation hervorstechen; ansonsten sind meist Punktmutation zu beschreiben.

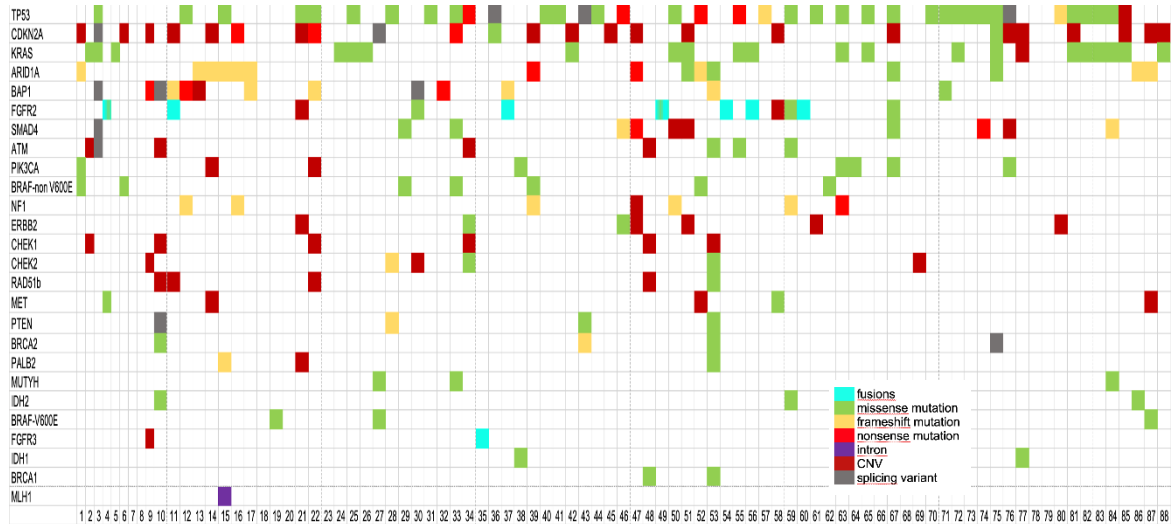


Abbildung 38: Spektrum der genetischen Alterationen in der Kohorte des Tumorzentrum OÖ

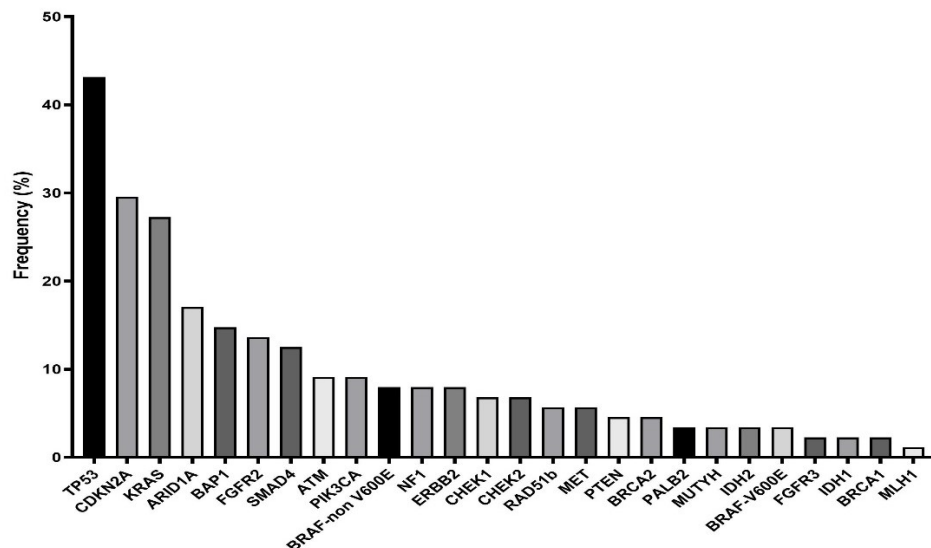


Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung relevanter, weil potentiell zielgerichtet adressierbar, Alterationen in der Kohorte des Tumorzentrum OÖ

Die verschiedenen Alterationen wurden klinisch annotiert und analog den ESCAT Kriterien gereiht. Abbildung 40 gibt einen Überblick über die Einordnung der molekularen Targets und die korrespondierende durchgeführte Therapie. Die Mehrheit der Patienten, die mit molekular informierter Therapie behandelt wurden, weisen ESCAT I oder II Targets auf; Alterationen in *FGFR2/3*, *ERBB2*, *IDH1*, *BRAF V600E* oder MSI. Targets mit ESCAT III oder IV wurden nur vereinzelt adressiert und hier kam meist ein Checkpointinhibitor bei hohem CPS/TPS score zum Einsatz.

ESCAT tier	gene alteration	N patients	prevalence	targeted therapy	N patients	
I-B; N= 20 23%	FGFR2 fusion	9	10.2	Pemigatinib	7	
				None		2
	FGFR2/3 mut	3	3.4	Pemigatinib	1	
				Pazopanib	1	
				None		1
	FGFR2 Amplifikation	2	2.3	Temsirolimus	1	
				None		1
	FGFR3 Rearrangement	1	1.1	FGFR2i	1	
IDH1 mut	2	2.3	None		2	
IDH2 mut	3	3.4	None		3	
I-C; N=3 3,4%	MSI	3	3.4	Anti PD-1	3	
				None		0
II-B; N=11 12,5%	BRAF V600E mut	3	3.4	BRAFi/MEKi	1	
				None		2
	ERBB2 amp	4	4.5	Trastuzumab	2	
				None		2
ERBB2 mut	4	4.5	None		4	

III-A; N=35 40%	BRCA1 mut	2	2,3	PARPi	1	
				None		1
	BRCA2 mut	5	5,7	PARPi	1	
				None		4
	PIK3CA mut	9	10,2	Alpelisib	1	
				None		8
	KRAS mut G12C	3	3,4	None		3
	ATM mut	3	3,4	None		3
	ATM del	6	6,8	None		6
	PALB2 mut	2	2,3	None		2
	PALB2 del	1	1,1	None		1
CPS, TPS Immunoscore	4	4,5	Anti PD-1	4		
IV-A; N=78 89%	ARID1A mut	17	19,3	None		17
	BAP1 mut	15	17,0	None		15
	CDKN2A del	30	34,1	None		30
	MUTYH mut	3	3,4	Anti PD-1	1	
				None		2
	RAD51b del	6	6,8	None		6
	CHEK1 del	7	8,0	None		7

Abbildung 40: Annotation der genetischen Alterationen anhand der ESCAT Klassifikation und eingesetzte molekulare Strategien

### 2.3.3. Charakterisierung der Effektivität von zielgerichteten Therapiestrategien in der klinischen Routine

Bei den meisten Patienten (56%) wurde die zielgerichtete Therapie als zweite systemische Behandlungslinie verabreicht. Ein kleiner Prozentsatz (36%) erhielt sie in der dritten Linie. Für den Rest wurde sie in einer späteren Behandlungslinie gegeben. Die Aktivität der zielgerichteten Therapie lässt sich Vergleich mit der vorangegangenen Chemotherapielinie darstellen. Das Balkendiagramm in Abbildung 41 zeigt, dass einige Patienten (ins. FGFR2 Fusion mit Pemigatinib bzw. MSI mit Pembrolizumab) eine Therapiedauer von mehr als 24 Monaten aufweisen und als long term responder zu bezeichnen sind. Um die Aktivität einer zielgerichteten Therapie besser zu quantifizieren, wurde die PFS Ratio (PFS targeted therapy/PFS der Prä-Chemotherapie) jedes einzelnen Patienten berechnet. Hier zeigt sich, dass 52% eine PFS Ratio von zumindest 1 aufweisen (in Abbildung werden log2 ausgewiesen); 10 Patienten weisen eine PFS Ratio von  $\geq 1.3$  auf.

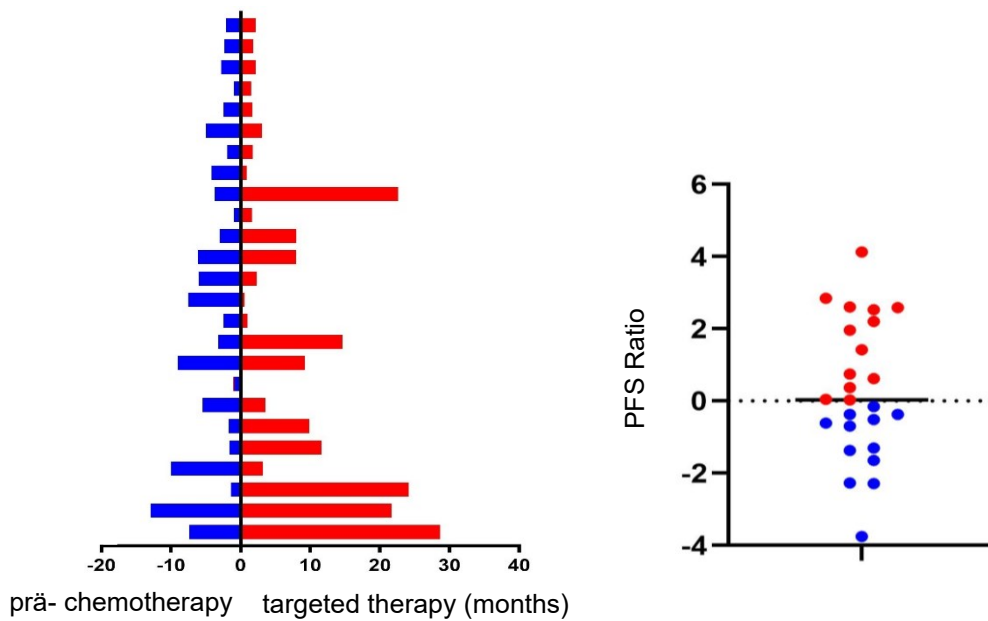


Abbildung 41: Vergleich der PFS Zeiten der vorrangegangenen Chemotherapie mit der darauffolgenden targeted Therapie (links). Log2 der PFS Ratio (targeted Therapie/Chemotherapie). Die roten Punkt signalisieren eine positive PFS Ratio und somit einen klinischen benefit (rechts).

Das mediane Überleben von Patienten mit zielgerichteter Therapie betrug 22.68 Monate 95%CI (12.79-NR). Patienten, die eine zytotoxische Chemotherapie erhielten, lebten median 10.95 Monate 95%CI (5.52-16.64). Im Vergleich der Überlebenszeiten mit log rank Test zeigt sich eine HR Vorteil von 0.44 95%CI (0.236-0.847)  $p= 0.013$  für die zielgerichtete Therapie (siehe Abbildung 42)

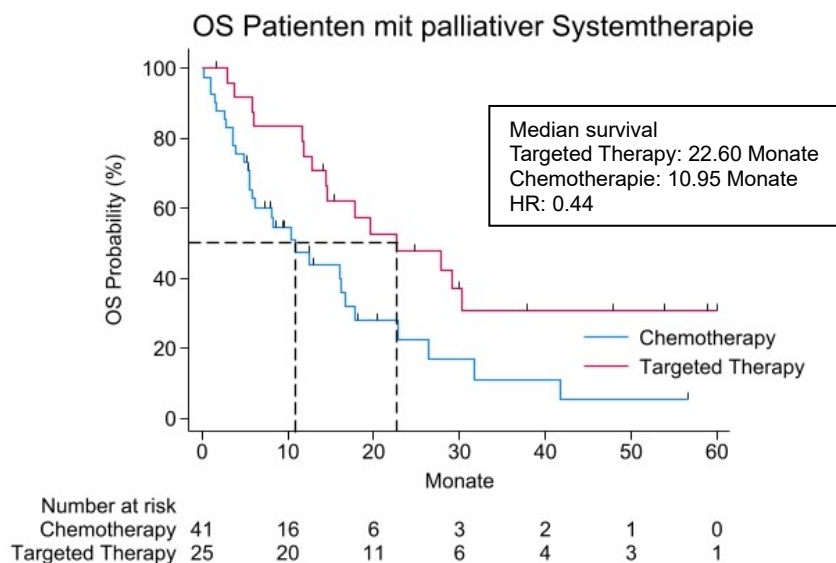


Abbildung 42: Kaplan-Meier Kurven des Gesamtüberlebens von Patienten mit targeted Therapie und Chemotherapie im Vergleich

## 2.4. Diskussion

Der Hauptanliegen dieser Studie war, die Wirksamkeit von Präzisionsmedizin bei biliären Tumoren in der klinischen Routine zu demonstrieren. In unserer Kohorte konnte 37.9% der Patienten im metastatischen Stadium eine zielgerichtete Therapie angeboten werden. Dieser Prozentsatz liegt gering unter den angenommenen 40-50% potenziell nutzbarer Ziele bei BTC. In unserem Setting könnten lange turn around Zeiten bis zum definitiven Einsatz einer zielgerichteten Therapie verantwortlich sein. Dies unterstreicht die Empfehlung der aktuellen ESMO Guidelines eine molekulare Analyse schon bei Diagnosestellung vor Einleitung der Erstlinie zu veranlassen, um in der 2nd oder 3rd line ein evtl. vorhandenes molekulares Target zeitnah adressieren zu können. Entsprechende awareness zur molekularen Testung jedes metastasierten CCC's wird in zunehmenden Maße am Tumorzentrum OÖ sowohl bei Klinikern (Chirurgen, Onkologie) wie auch in den diagnostischen Fächern (Radiologie, Pathologie und Molekularbiologie) geschaffen. Obwohl einige der in dieser Arbeit beschrieben durchgeführten Therapiekonzepte auf compassionate use beruhen, waren doch nicht für alle potentiell adressierbaren Alterationen entsprechende Therapiemöglichkeiten realisierbar, z.b.: *IDH1/2*, *KRAS G12C*, *MET*-Amplifikation oder *MDM2* Amplifikation. Weiters wurde der Großteil der Proben mittels TSO170 panel analysiert, was sicherlich nicht mehr dem aktuellen Diagnostik Standard entspricht. Ob konsequenterweise immer ein RNA Fusionspanel inkludiert war, konnte nicht mit letzter Sicherheit aus den Krankenakten entnommen werden.

Weiters waren teilweise lange Latenzzeiten, bis die gesamte molekulare Zusammensetzung unserer Kohorte spiegelte die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse wider. Der Grund für die niedrigere Häufigkeit von *IDH1/2*-Mutationen bei unseren Patienten bleibt unklar.

### Vorteil im PFS gegenüber der vorangegangenen Chemotherapie bei Einsatz molekular informierte Therapie

Normalerweise nimmt die Dauer bis zur Progression auf eine Therapie von Therapielinie zu Therapielinie ab. An unserer Kohorte waren bei einem

überwiegenden Teil der Patienten das PFS der zielgerichteten Therapie mindestens genauso lang wie bei der vorangegangenen Chemotherapie. Nimmt man die PFS Ratio von 1.3 oder auch 1.5 wie von Von Hoff et al. heran um die Wirksamkeit molekular informierter Therapiestrategien zu bewerten, so zeigte sich bei 66.7% eine PFS Ratio von 1.3 und mehr.(67,68) Somit ist hier in der Gesamtkohorte von einem doch erheblichen Benefit auszugehen, der sich schlussendlich auch in einem verlängertem Gesamtüberleben niederschlägt.

#### Vorteil im Gesamtüberleben bei Einsatz molekular informierte Therapie

Unsere Studie zeigt, dass der Einsatz molekular informierter Therapiestrategien das Gesamtüberleben fast verdoppelte. Eine multivariate Analyse unter Einschluss von relevanten Ko-Faktoren wie Alter, ECOG-Status, Geschlecht, Tumorlokalisation, primäre Tumorsektion, Stadium bei Diagnose und lokale ablativ Therapie ist noch ausständig und soll an einer größeren Kohorte nachgeholt werden. Es ist aber aufgrund des sehr deutlichen OS Vorteils keine wesentliche Befundänderung zu erwarten. Ein wesentlicher Bias unserer Studie ist, dass in der Chemotherapie Kohorte auch Patienten eingeschlossen wurde, die keine 2nd Line erhalten haben. Der klinische Benefit des Einsatzes von Chemotherapie in der 2nd line oder 3rd line ist zwar in prospektiven Studien gezeigt; jedoch ist der absolute Benefit sehr moderat und es gibt durchaus Experten, die den Einsatz von Chemotherapie nach Versagen der Erstlinientherapie nicht als zwingend betrachten.

#### Wirksamkeit gemäß ESCAT-Klassifikation

André et al. zeigten, dass der klinische Nutzen der gezielten Therapie bei Brustkrebs auf die ESCAT I/II-Stufen beschränkt zu sein scheint.(69) Die Ergebnisse von Verdaguer et al. deuten darauf hin, dass ein Nutzen für eine Kohorte von BTC aus höher eingestuftem ESCAT-Empfehlungen abgeleitet wird.(22) In unserer Kohorte zeigen vor allem Patienten mit *FGFR2* Fusion bzw. MSI Patienten eine deutliche Überlebenszeitverlängerung und es ist davon auszugehen, dass der Haupteffekt der Kohorte mit targeted Therapie auf das Gesamtüberleben von Patienten mit *FGFR2* Fusion oder MSI getragen wird.

## Einschränkungen

Ein Nachteil unserer Studie war, dass MSI- und TMB-Tests nicht routinemäßig bei jedem Patienten durchgeführt wurden; so wurden möglicherweise Patienten, die Kandidaten für Checkpoint-Inhibitoren hätten sein können, übersehen. Darüber hinaus war das Ausmaß des NGS-Panels bei unseren Patienten nicht konsistent. Dies spiegelt die diagnostischen Fortschritte in molekularen Techniken über die Zeit und die unterschiedliche Verfügbarkeit von NGS-Panel-Diagnostik in verschiedenen Partnern des Tumorzentrums OÖ wider. Weiters nimmt die Zahl möglicher adressierbarer Targets ständig zu und reflektiert den enormen Wissenszuwachs in der Präzisionsonkologie. Weiters einschränkend ist zu erwähnen, dass ein molekulares Tumorboard in dem multidisziplinär molekular basierte Therapiestrategien entwickelt, werden bei einem Großteil der Patienten noch nicht angewendet wurde. Entsprechendes MTB wurde am Tumorzentrum OÖ erst kürzlich implementiert.

Weitere Einschränkungen ergeben sich aus der retrospektiven Natur unserer Analyse und vermutlich der räumlichen und zeitlichen Heterogenität des Tumors. Ct-DNA, die aus Blut- oder Gallenproben isoliert wurde, könnte diese Einschränkungen überwinden.

### 3. Synopsis und Ausblick

Unsere Ergebnisse unterstreichen den Wert einer umfassenden molekularen Testung für BTC und verstärken die Aussage der ESMO-Richtlinien, dass jeder Patient mit BTC einer molekularen Charakterisierung unterzogen werden sollte. Wir haben deutlich gezeigt, dass im Gegensatz zur nicht abgestimmten zytotoxischen Chemotherapie die Anwendung von molekular zielgerichteter Therapie zu einem OS-Vorteil im realen klinischen Umfeld führt. Weitere Anstrengungen müssen auf eine Verbesserung diagnostischer Abläufe und dem Zusammenspiel Chirurgie/interventionelle Radiologie- Onkologie sowie Pathologie/Molekularbiologie gerichtet sein. Möglicherweise ist eine Reflextestung analog dem NSCLC ein durchaus erstrebenswerter Routineablauf. Die ct-DNA Analyse bei schwieriger histo- oder zytologischer Diagnosestellung bleibt eine interessante Option, jedoch ist eine Implementierung in der klinischen Routine noch nicht absehbar. Eine unmittelbare Wertigkeit hat die ct-DNA Analyse jedoch bei Aufspüren von Resistenzentwicklungen auf zielgerichtete Therapie, bspweise: FGFR2 Inhibitoren. Erste klinische Versuche in der Routine an unserem Haus sind am Laufen und bei einem Patienten konnte schon eine entsprechende Punktmutation als Resistenzmechanismus auf Pemigatinib mittels liquid biopsy detektiert werden.

## 4. Referenzen

1. Valle JW, Kelley RK, Nervi B, Oh DY, Zhu AX. Biliary tract cancer. *Lancet*. 2021;397(10272):428–44.
2. Brindley PJ, Bachini M, Ilyas SI, Khan SA, Loukas A, Sirica AE, et al. Cholangiocarcinoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2021;7(1):65.
3. Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, Kelley RK, Gores GJ. Cholangiocarcinoma — evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):95–111.
4. Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, Rodrigues PM, Khan SA, Roberts LR, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(9):557–88.
5. Vithayathil M, Khan SA. Current epidemiology of cholangiocarcinoma in western countries. *J Hepatol*. 2022;77(6):1690–8.
6. Taghizadeh H, Schmalfluss T, Maj-Hes A, Singer J, Prager GW. Austrian tricentric real-life analysis of molecular profiles of metastatic biliary tract cancer patients. *Front Oncol*. 2023;13:1143825.
7. Rahman R, Ludvigsson JF, Seth E von, Lagergren J, Bergquist A, Radkiewicz C. Age trends in biliary tract cancer incidence by anatomical subtype: A Swedish cohort study. *Eur J Cancer*. 2022;175:291–8.
8. Clements O, Eliahoo J, Kim JU, Taylor-Robinson SD, Khan SA. Risk factors for intrahepatic and extrahepatic cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *J Hepatol*. 2020;72(1):95–103.
9. Izquierdo-Sanchez L, Lamarca A, Casta AL, Buettner S, Utpatel K, Klumpen HJ, et al. Cholangiocarcinoma landscape in Europe: Diagnostic, prognostic and therapeutic insights from the ENSCCA Registry. *J Hepatol*. 2022;76(5):1109–21.
10. Lowery MA, Ptashkin RN, Jordan EJ, Berger MF, Zehir A, Capanu M, et al. Comprehensive molecular profiling of intra- and extrahepatic cholangiocarcinomas: potential targets for intervention. *Clin Cancer Res*. 2018;24(17):clincanres.0078.2018.
11. Normanno N, Martinelli E, Melisi D, Pinto C, Rimassa L, Santini D, et al. Role of molecular genetics in the clinical management of cholangiocarcinoma. *Esmo Open*. 2022;7(3):100505.
12. Jusakul A, Cutcutache I, Yong CH, Lim JQ, Huang MN, Padmanabhan N, et al. Whole-Genome and Epigenomic Landscapes of Etiologically Distinct Subtypes of Cholangiocarcinoma. *Cancer Discov*. 2017;7(10):1116–35.
13. Chan-on W, Nairismägi ML, Ong CK, Lim WK, Dima S, Pairojkul C, et al. Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers. *Nat Genet*. 2013;45(12):1474–8.
14. Kendre G, Murugesan K, Brummer T, Segatto O, Saborowski A, Vogel A. Charting co-mutation patterns associated with actionable drivers in intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 2023;78(3):614–26.

15. Pappas L, Baiev I, Reyes S, Bocobo AG, Jain A, Spencer K, et al. The Cholangiocarcinoma in the Young (CITY) Study: Tumor Biology, Treatment Patterns, and Survival Outcomes in Adolescent Young Adults With Cholangiocarcinoma. *JCO Precis Oncol.* 2023;7(7):e2200594.
16. Lamarca A, Edeline J, Goyal L. How I treat biliary tract cancer. *Esmo Open.* 2022;7(1):100378.
17. Leitlinie (Langversion).
18. Zhang H, Zhu J, Ke F, Weng M, Wu X, Li M, et al. Radiological Imaging for Assessing the Respectability of Hilar Cholangiocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res Int.* 2015;2015:497942.
19. Conway AM, Morris GC, Smith S, Vekeria M, Manoharan P, Mitchell C, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma hidden within cancer of unknown primary. *Brit J Cancer.* 2022;127(3):531–40.
20. Vogel A, Bridgewater J, Edeline J, Kelley RK, Klumpen HJ, Malka D, et al. Biliary tract cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up †. *Ann Oncol.* 2022;
21. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol.* 2018;29(9):1895–902.
22. Verdaguer H, Saurí T, Acosta DA, Guardiola M, Sierra A, Hernando J, et al. ESMO Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets driving targeted treatment in patients with cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2022;28(8):clincanres.2384.2021.
23. Cho MT, Gholami S, Gui D, Tejaswi SL, Fananapazir G, Abi-Jaoudeh N, et al. Optimizing the Diagnosis and Biomarker Testing for Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma: A Multidisciplinary Approach. *Cancers.* 2022;14(2):392.
24. Bekaii-Saab TS, Bridgewater J, Normanno N. Practical considerations in screening for genetic alterations in cholangiocarcinoma. *Ann Oncol.* 2021;32(9):1111–26.
25. Vera R, Ibarrola-de-Andrés C, Adeva J, Pérez-Rojas J, García-Alfonso P, Rodríguez-Gil Y, et al. Expert consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology on the determination of biomarkers in pancreatic and biliary tract cancer. *Clin Transl Oncol.* 2022;24(11):2107–19.
26. Heydt C, Wölwer CB, Camacho OV, Wagener-Rydzek S, Pappesch R, Siemanowski J, et al. Detection of gene fusions using targeted next-generation sequencing: a comparative evaluation. *BMC Méd Genom.* 2021;14(1):62.
27. Neumann O, Burn TC, Allgäuer M, Ball M, Kirchner M, Albrecht T, et al. Genomic architecture of FGFR2 fusions in cholangiocarcinoma and its implication for molecular testing. *Brit J Cancer.* 2022;127(8):1540–9.
28. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: A report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020;31(11):1491–505.
29. India AP Dept of Pathology, Shri Bhausaheb Hire Government Medical College, Dhule, Maharashtra, A BS, D HR, India AP Dept of Pathology, Dr SCGMC Nanded, Maharashtra, S BK, India EP and H Dept of Pathology and Ex Dean, GMC Aurangabad, Maharashtra,. Clinicopathological Study of Gastrointestinal Tract Tumours. *Indian J Pathol: Res Pr.* 2017;6(3 (part-1)):608–13.
30. Kefas J, Bridgewater J, Vogel A, Stein A, Primrose J. Adjuvant therapy of biliary tract cancers. *Ther Adv Méd Oncol.* 2023;15:17588359231163784.

31. Nagorney DM, Pawlik TM, Chun YS, Ebata T, Vauthey JN. AJCC Cancer Staging Manual. 2016;311–6.
32. Aloia T, Pawlik TM, Taouli B, Rubbia-Brandt L, Vauthey JN. AJCC Cancer Staging Manual. 2016;295–302.
33. Lamarca A, Palmer DH, Wasan HS, Ross PJ, Ma YT, Arora A, et al. Second-line FOLFOX chemotherapy versus active symptom control for advanced biliary tract cancer (ABC-06): a phase 3, open-label, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* 2021;22(5):690–701.
34. Yoo C, Kim K pyo, Jeong JH, Kim I, Kang MJ, Cheon J, et al. Liposomal irinotecan plus fluorouracil and leucovorin versus fluorouracil and leucovorin for metastatic biliary tract cancer after progression on gemcitabine plus cisplatin (NIFTY): a multicentre, open-label, randomised, phase 2b study. *Lancet Oncol.* 2021;22(11):1560–72.
35. Valle JW, Vogel A, Denlinger CS, He AR, Bai LY, Orlova R, et al. Addition of ramucirumab or merestinib to standard first-line chemotherapy for locally advanced or metastatic biliary tract cancer: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2021;22(10):1468–82.
36. Gupta A, Kurzrock R, Adashek JJ. Evolution of the Targeted Therapy Landscape for Cholangiocarcinoma: Is Cholangiocarcinoma the ‘NSCLC’ of GI Oncology? *Cancers.* 2023;15(5):1578.
37. Tomczak A, Springfield C, Dill MT, Chang DH, Kazdal D, Wagner U, et al. Precision oncology for intrahepatic cholangiocarcinoma in clinical practice. *Brit J Cancer.* 2022;127(9):1701–8.
38. Bhamidipati D, Subbiah V. Impact of tissue-agnostic approvals for patients with gastrointestinal malignancies. *Trends Cancer.* 2022;
39. Pirozzi CJ, Yan H. The implications of IDH mutations for cancer development and therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(10):645–61.
40. Zhu AX, Macarulla T, Javle MM, Kelley RK, Lubner SJ, Adeva J, et al. Final Overall Survival Efficacy Results of Ivosidenib for Patients With Advanced Cholangiocarcinoma With IDH1 Mutation. *Jama Oncol.* 2021;7(11):1–10.
41. Goyal L, Meric-Bernstam F, Hollebecque A, Valle JW, Morizane C, Karasic TB, et al. Futibatinib for FGFR2-Rearranged Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *N Engl J Med.* 2023;388(3):228–39.
42. Javle M, Roychowdhury S, Kelley RK, Sadeghi S, Macarulla T, Weiss KH, et al. Infigratinib (BGJ398) in previously treated patients with advanced or metastatic cholangiocarcinoma with FGFR2 fusions or rearrangements: mature results from a multicentre, open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2021;6(10):803–15.
43. Abou-Alfa GK, Sahai V, Hollebecque A, Vaccaro GM, Melisi D, Al-Rajabi RMT, et al. Pemigatinib for previously treated locally advanced/metastatic cholangiocarcinoma (CCA): Update of FIGHT-202. *J Clin Oncol.* 2021;39(15\_suppl):4086–4086.
44. Subbiah V, Sahai V, Maglic D, Bruderek K, Toure BBarry, Zhao S, et al. RLY-4008, the first highly selective FGFR2 inhibitor with activity across FGFR2 alterations and resistance mutations. *Cancer Discov.* 2023;13(9):2012–31.
45. Goyal L, Kongpetch S, Crolley VE, Bridgewater J. Targeting FGFR inhibition in cholangiocarcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2021;95:102170.
46. Oh DY, Bang YJ. HER2-targeted therapies — a role beyond breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(1):33–48.

47. Weisser NE, Sanches M, Escobar-Cabrera E, O'Toole J, Whalen E, Chan PWY, et al. An anti-HER2 biparatopic antibody that induces unique HER2 clustering and complement-dependent cytotoxicity. *Nat Commun.* 2023;14(1):1394.
48. Meric-Bernstam F, Beeram M, Hamilton E, Oh DY, Hanna DL, Kang YK, et al. Zanidatamab, a novel bispecific antibody, for the treatment of locally advanced or metastatic HER2-expressing or HER2-amplified cancers: a phase 1, dose-escalation and expansion study. *Lancet Oncol.* 2022;23(12):1558–70.
49. Nakamura Y, Mizuno N, Sunakawa Y, Hamilton EP, Hayashi H, Kim ST, et al. Tucatinib and trastuzumab for previously treated HER2-positive metastatic biliary tract cancer (SGNTUC-019): A phase 2 basket study. *J Clin Oncol.* 2023;41(16\_suppl):4007–4007.
50. Ohba A, Morizane C, Kawamoto Y, Komatsu Y, Ueno M, Kobayashi S, et al. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients (pts) with HER2-expressing unresectable or recurrent biliary tract cancer (BTC): An investigator-initiated multicenter phase 2 study (HERB trial). *J Clin Oncol.* 2022;40(16\_suppl):4006–4006.
51. Meric-Bernstam F, Makker V, Oaknin A, Oh DY, Banerjee SN, Martin AG, et al. Efficacy and safety of trastuzumab deruxtecan (T-DXd) in patients (pts) with HER2-expressing solid tumors: DESTINY-PanTumor02 (DP-02) interim results. *J Clin Oncol.* 2023;41(17\_suppl):LBA3000–LBA3000.
52. Harding JJ, Cleary JM, Quinn DI, Braña I, Moreno V, Borad MJ, et al. Targeting HER2 ( ERBB2 ) mutation-positive advanced biliary tract cancers with neratinib: Results from the phase II SUMMIT 'basket' trial. *J Clin Oncol.* 2021;39(3\_suppl):320–320.
53. Subbiah V, Lassen U, Élez E, Italiano A, Curigliano G, Javle M, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF V600E-mutated biliary tract cancer (ROAR): a phase 2, open-label, single-arm, multicentre basket trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(9):1234–43.
54. Capuozzo M, Santorsola M, Landi L, Granata V, Perri F, Celotto V, et al. Evolution of Treatment in Advanced Cholangiocarcinoma: Old and New towards Precision Oncology. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):15124.
55. Palma G, Khurshid F, Lu K, Woodward B, Husain H. Selective KRAS G12C inhibitors in non-small cell lung cancer: chemistry, concurrent pathway alterations, and clinical outcomes. *NPJ Precis Oncol.* 2021;5(1):98.
56. Bekaii-Saab TS, Yaeger R, Spira AI, Pelster MS, Sabari JK, Hafez N, et al. Adagrasib in Advanced Solid Tumors Harboring a KRASG12C Mutation. *J Clin Oncol.* 2023;41(25):4097–106.
57. Oh DY, He AR, Qin S, Chen LT, Okusaka T, Vogel A, et al. Durvalumab plus Gemcitabine and Cisplatin in Advanced Biliary Tract Cancer. *Nejm Évid.* 2022;1(8).
58. Kelley RK, Ueno M, Yoo C, Finn RS, Furuse J, Ren Z, et al. Pembrolizumab in combination with gemcitabine and cisplatin compared with gemcitabine and cisplatin alone for patients with advanced biliary tract cancer (KEYNOTE-966): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2023;401(10391):1853–65.
59. Eso Y, Shimizu T, Takeda H, Takai A, Marusawa H. Microsatellite instability and immune checkpoint inhibitors: toward precision medicine against gastrointestinal and hepatobiliary cancers. *J Gastroenterol.* 2020;55(1):15–26.
60. Marabelle A, Le DT, Ascierto PA, Giacomo AMD, Jesus-Acosta AD, Delord JP, et al. Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair–Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol.* 2020;38(1):1–10.

61. Maio M, Ascierto PA, Manzyuk L, Motola-Kuba D, Penel N, Cassier PA, et al. Pembrolizumab in microsatellite instability high or mismatch repair deficient cancers: updated analysis from the phase II KEYNOTE-158 study. *Ann Oncol.* 2022;33(9):929–38.
62. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion–Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 2018;378(8):731–9.
63. Carrizosa DR, Burkard ME, Elamin YY, Desai J, Gadgeel SM, Lin JJ, et al. CRESTONE: Initial efficacy and safety of seribantumab in solid tumors harboring NRG1 fusions. *J Clin Oncol.* 2022;40(16\_suppl):3006–3006.
64. Schram AM, Odintsov I, Espinosa-Cotton M, Khodos I, Sisso WJ, Mattar MS, et al. Zenocutuzumab, a HER2xHER3 Bispecific Antibody, Is Effective Therapy for Tumors Driven by NRG1 Gene Rearrangements. *Cancer Discov.* 2022;12(5):1233–47.
65. Vogel A, Gerdes C, Saborowski A. Zielgerichtete Therapie biliärer Tumoren. *Die Onkol.* 2023;29(9):793–800.
66. Wolff L, Kiesewetter B. Applicability of ESMO-MCBS and ESCAT for molecular tumor boards. memo - *Mag Eur Méd Oncol.* 2022;15(3):190–5.
67. Hoff DDV, Jr JJS, Rosen P, Loesch DM, Borad MJ, Anthony S, et al. Pilot Study Using Molecular Profiling of Patients' Tumors to Find Potential Targets and Select Treatments for Their Refractory Cancers. *J Clin Oncol.* 2010;28(33):4877–83.
68. Bailey CH, Jameson G, Sima C, Fleck S, White E, Hoff DDV, et al. Progression-free Survival Decreases with Each Subsequent Therapy in Patients Presenting for Phase I Clinical Trials. *J Cancer.* 2011;3:7–13.
69. Andre F, Filleron T, Kamal M, Mosele F, Arnedos M, Dalenc F, et al. Genomics to select treatment for patients with metastatic breast cancer. *Nature.* 2022;610(7931):343–8.