

Aus dem
CharitéCentrum für Tumormedizin
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt
Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie
Direktor: Prof. Dr. S. Stintzing

Habilitationsschrift

Therapieoptimierung des metastasierten kolorektalen Karzinoms durch Präzisionsonkologie basierend auf mRNA-Genexpressions- und DNA- Sequenzierungsanalysen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Experimentelle Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Arndt Stahler

Eingereicht: Januar 2023

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim Spranger

1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Christian Junghanß, Rostock

2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Ralf-Dieter Hofheinz, Mannheim

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Abkürzungen	3
1. Einleitung.....	4
1.1. Medikamente zur Therapie des irresektablen, metastasierten KRK	6
1.1.1. Zytostatika	6
1.1.2. Prognostische / prädiktive Biomarker und zielgerichtete Therapien.....	7
1.2. Therapiealgorithmen des metastasierten <i>RAS/BRAF</i> -Wildtyp, <i>RAS</i> -mutierten sowie <i>BRAF</i> V600E-mutierten KRK	11
1.2.1. <i>RAS/BRAF</i> -Wildtyp-Tumore	11
1.2.2. <i>RAS</i> -mutierte Tumore.....	12
1.2.3. <i>BRAF</i> V600E-mutierte Tumore.....	12
1.3. Zielsetzung	13
2. Originalarbeiten	15
2.1. Amphiregulin Expression Is a Predictive Biomarker for <i>EGFR</i> Inhibition in Metastatic Colorectal Cancer: Combined Analysis of Three Randomized Trials	15
2.2. First-line fluoropyrimidine plus bevacizumab followed by irinotecan-escalation versus initial fluoropyrimidine, irinotecan and bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer – final survival and per-protocol analysis of the randomized XELAVIRI trial (AIO KRK 0110).....	25
2.3. Consensus molecular subtypes in metastatic colorectal cancer treated with sequential versus combined fluoropyrimidine, bevacizumab and irinotecan (XELAVIRI trial) 36	
2.4. Single-nucleotide variants, tumour mutational burden and microsatellite instability in patients with metastatic colorectal cancer: Next-generation sequencing results of the FIRE-3 trial	47
2.5. Mutational profiles of metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab before and after secondary resection (AIO KRK 0306; FIRE-3) 58	
3. Diskussion	69
3.1. Genexpressionsbasierte Biomarker in der Therapie des metastasierten KRK und deren Integration in die klinische Praxis (2.1., 2.3.)	69
3.2. Therapieoptimierung durch Präzisionsonkologie (2.2., 2.4.)	72
3.3. Longitudinales Biomarker-Monitoring durch Gewebe und Flüssigbiopsie zur Therapieoptimierung (2.5.).....	74
4. Zusammenfassung	77
5. Literaturangaben	79
Danksagung	88
Eidesstattliche Versicherung	90

Abkürzungen

5-FU	5-Fluoruracil
AREG	Amphiregulin
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
Bspw.	Beispielsweise
CAPIRI	Capecitabin, Irinotecan
CAPOX	Capecitabin, Oxaliplatin
CMS	Consensus Molecular Subtypes
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4
DGE	Differential gene expression
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
EREG	Epiregulin
ESMO	European Society of Medical Oncology
FU/FA	5-Fluoruracil, Folinsäure
FOLFIRI	5-Fluoruracil, Folinsäure, Irinotecan
FOLFOX	5-Fluoruracil, Folinsäure, Oxaliplatin
FOLFOXIRI	5-Fluoruracil, Folinsäure, Oxaliplatin, Irinotecan
GO	Gene Ontology
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
HAIC	intra-arterielle hepatische Chemotherapie
HER	Human epidermal growth factor receptor
IFL	5-Fluoruracil (Bolus), Folinsäure, Irinotecan
KRAS	Kirsten rat sarcoma
KRK	kolorektales Karzinom
MAPK	mitogen activated protein kinase
MEK	mitogen activated protein kinase kinase
mIrx	modifiziertes Irinotecan, Oxaliplatin
MLH1	MutL Homolog 1
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MSH2	MutS Homolog 2
MSH6	MutS Homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NGS	Next Generation Sequencing
NRAS	Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog
NTRK	Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase
OS	Gesamtüberleben
PD-(L)1	Programmed death (ligand) 1
PFS	Progressions-freies Überleben
PLGF	Placental Growth Factor
PMS2	PMS1 Homolog 2
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
RFA	Radiofrequenzablation
SBRT	Stereotactic Body Radiation Therapy
SIRT	Selektive Interne Radiotherapie
TACE	Trans-arterielle Chemoembolisation
TGFβ	Transforming Growth Factor Beta
VEGF(R)	Vascular Endothelial Growth Factor (Receptor)

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom (KRK) stellt die dritthäufigste maligne Tumorerkrankung sowohl weltweit als auch in der Bundesrepublik Deutschland dar (1). Gemäß aktueller Daten des Robert-Koch-Instituts traten in Deutschland im Jahr 2018 33.920 Neuerkrankungen bei Männern und 26.710 Neuerkrankungen bei Frauen auf (2). Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 72 und 75 Jahren. Die Diagnose von Fernmetastasen erfolgt in etwa 20% der Fälle mit der Tumorerkrankung (synchron), hingegen entwickeln sich bei Patient*innen mit lokaler Erkrankung in 20-50% der Fälle Fernmetastasen (metachron) (3). Die 5-Jahres-Überlebensrate eines metastasierten KRK beträgt ca. 14% (4). Die aktuelle Mortalität der Erkrankung in Deutschland wird mit knapp 24.000 Sterbefällen pro Jahr angegeben (2).

Die häufigsten Lokalisationen für Fernmetastasen sind Leber, Lunge und Lymphknoten. Peritoneum, Knochen und andere Organe sind seltener befallen. Das Risiko für Hirnmetastasen steigt mit der Dauer der Therapie und beträgt in etwa 10% (5). Die Letalität der Erkrankung ist häufig bedingt durch Therapieversagen trotz Kombination von klassischen zytostatischen Medikamenten mit zielgerichteten Therapien, d. h. gegen tumorspezifische Rezeptoren/Signalmoleküle gerichtete Antikörper, Tyrosinkinase-Rezeptoren und Small Molecules. Durch die Evaluation molekularer Subgruppen, die Entwicklung neuer Medikamente und den Einsatz interdisziplinärer (d. h. Chirurgie und Strahlentherapie involvierende) Therapieentscheidungen konnten die Überlebensraten signifikant gesteigert werden. In Abhängigkeit der molekularen Subgruppe wird aktuell ein medianes Gesamtüberleben von 24,5 (RAS-mutierte Tumore) bis über 43,4 Monaten (RAS/BRAF-Wildtyp-Tumore) erreicht (6, 7).

Unter Berücksichtigung aller Aspekte werden folgende Patientensubgruppen nach der aktuellen Leitlinie der European Society of Medical Oncology (ESMO) unterschieden (3).

Patienten mit resektabler Erkrankung: Patienten mit resektablen, vorwiegend Lebermetastasen, wobei die Funktionalität des verbleibenden Restorgans der entscheidende limitierende Faktor ist. Durch die Resektion von Metastasen kann eine Verbesserung des 5-

Jahres-Überlebens auf bis zu 45% erreicht werden (8). Bei ungünstigen prognostischen Faktoren (bspw. synchrone Metastasierung, Lebermetastasen > 3, bilobäre Erkrankung oder extrahepatische Erkrankungslast) kann eine perioperative Therapie mit FOLFOX erwogen werden, wobei sich lediglich ein Vorteil im krankheits-freien, nicht jedoch im Gesamtüberleben zeigte (9, 10). Liegen diese Kriterien nicht vor, sollte eine primäre Intervention der Metastasen angestrebt werden (8). Eine zielgerichtete peri-operative Chemotherapie bei initial resektablen Metastasen verbesserte die Prognose der Patienten nicht (11).

Patienten mit potenziell resektabler Erkrankung nach Konversionstherapie: Patienten mit initial irresektabler Erkrankung, welche unter einer Chemotherapie eine Option zur sekundären Intervention erreichen. Die Konversionschemotherapie soll die „beste systemische Therapie“ umfassen und richtet sich nach der Molekularbiologie und der Primärtumorlokalisierung (s. unten). Die individualisierte Intervention oder Folge von Interventionen sollte in einer interdisziplinären Tumorkonferenz festgelegt werden und umfasst neben der Resektion auch lokal-ablative Verfahren (RFA, SBRT) sowie intraarterielle Therapien (SIRT, TACE, HAIC) (12-18).

Patienten mit irresektabler Erkrankung: Patienten mit Erkrankungslast, die auch unter dem Aspekt eines Therapieansprechens nicht sekundär interventionell adressierbar ist. Die individualisierte Therapie sollte in Abhängigkeit der Tumorcharakterisierung sowie der biologischen (Alter, Allgemeinzustand, Komorbiditäten) und sozialen Faktoren des jeweiligen Patienten in einer interdisziplinären Tumorkonferenz festgelegt werden. Fitte Patienten sollten eine Chemotherapie-Doublette, in selektiven Fällen ein Triplet, mit monoklonalem Antikörper erhalten, in Abhängigkeit der Toxizität und Lebensqualität unter Therapie. Nicht-fitte Patienten können mit Fluorpyrimidin und monoklonalen Antikörpern behandelt werden, um die Lebensqualität zu verbessern (3, 19).

1.1. Medikamente zur Therapie des irresektablen, metastasierten KRK

Die Therapie des metastasierten KRK basiert auf der Kombination von zytostatischen Medikamenten und monoklonalen Antikörpern bzw. Tyrosinkinase-Inhibitoren, in Abhängigkeit der Molekularpathologie des Tumors sowie der Primärtumorlokalisation.

1.1.1. Zytostatika

Die Basis zytostatischer Regime bilden 5-Fluoruracil (5-FU) oder Capecitabin, die als Pyrimidinanaloga anti-metabolisch agieren (20, 21). In Kombination mit Folinsäure als kontinuierliche Infusion über 46h („FU/FA“) konnte eine signifikante Verlängerung des progressions-freien Überlebens (PFS) bei geringerer Toxizität im Vergleich zur Bolus-Applikation erreicht werden (22). 5-FU, Folinsäure und Irinotecan („FOLFIRI“ bzw. „CAPIRI“ falls kombiniert mit Capecitabin), ein Topoisomerase-1-Inhibitor, führte gegenüber FU/FA zur Steigerung der Remissionsrate auf 41% vs. 23%, einem PFS von 8,6 Monaten und einem Gesamtüberleben von 20 Monaten (23, 24). Die Kombination von FU/FA mit Oxaliplatin („FOLFOX“ bzw. „CAPOX“ in Kombination mit Capecitabin), einem Platinderivat, konnte ebenfalls Remissionsrate und PFS verbessern (25, 26). Die dosislimitierende Toxizität von Oxaliplatin in Abhängigkeit der Kumulativdosis ist die Polyneuropathie, sodass sich neben Dosisreduktion von Oxaliplatin De- und Re-Eskalationsvorgehen bzw. kontinuierliche Erhaltungstherapien etablierten (27-32). Die Kombination aus FU/FA, Irinotecan und Oxaliplatin („FOLFOXIRI“) gegenüber FOLFIRI verlängerte das PFS (9,8 vs. 6,9 Monate) sowie das Gesamtüberleben (22,6 vs. 16,7 Monate) signifikant und wurde mit einer höheren Rate sekundärer Resektionen assoziiert (15% vs. 6%), allerdings bei deutlich höherer Rate an schweren Polyneuropathien und Neutropenien (33).

Mit Trifluridin / Tipiracil (TAS102) existiert ein weiteres orales 5-FU-Analogon, welches ab der Drittlinientherapie des metastasierten KRK nach Progress auf irinotecan- und oxaliplatin-haltige Schemata eingesetzt wird. Gegenüber alleiniger Supportivtherapie zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens um 1,1 bis 2,7 Monate in Abhängigkeit der Subgruppe, sowie eine Verbesserung des PFS um 0,2 bis 1,0 Monate (34).

1.1.2. Prognostische / prädiktive Biomarker und zielgerichtete Therapien

1.1.2.1. Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen *VEGF(R)*

Angiogenese ist ein Prozess zur Formation und Erhaltung von Blutgefäßen während der Embryogenese, der Wundheilung sowie der Inflammation und Tumorgenese (35, 36). Die Inhibition des *vascular endothelial growth factor (VEGF)*-Rezeptors bzw. seiner Liganden *VEGF-A* und *VEGF-B* führte in präklinischen Untersuchungen zu einer Normalisierung der tumor-bedingten Hypervaskularisation mit Reduktion des übermäßigen Sauer- und Nährstoffangebots und geregelteren Aufnahme von Zytostatika in die Zelle (37-39). Bislang existieren keine validierten prädiktiven Biomarker für den Einsatz einer anti-*VEGF*-Therapie.

Bevacizumab ist ein monoklonaler, *VEGF*-gerichteter Antikörper und wurde 2005 für den Einsatz im metastasierten KRK zugelassen. Der Einsatz von Bevacizumab in Kombination mit Irinotecan, Bolus-5-FU und Folinsäure (IFL) führte zu einer Verbesserung des PFS, Gesamtüberlebens sowie des Therapieansprechens gegenüber IFL alleine (40). In der Erst- oder Folgelinientherapie führte die Kombination von Bevacizumab mit Chemotherapie-Doublette oder -Triplet gegenüber alleiniger Chemotherapie zur Verbesserung des PFS, nicht jedoch des Gesamtüberlebens (41, 42). Im Falle eines Tumorprogress kann Bevacizumab mit Wechsel des zytostatischen Regimes fortgeführt werden (43).

Bei **Aflibercept** handelt es sich um ein gegen *VEGF* sowie den *placental growth factor (PLGF)* gerichtetes Fusionsprotein, welches in einer Zweitlinientherapie nach Progress auf FOLFOX in Kombination mit FOLFIRI das Gesamtüberleben signifikant verbesserte (44). Der monoklonale, gegen *VEGF-R2* gerichtete Antikörper **Ramucirumab** konnte in Kombination mit FOLFIRI ähnliche Ergebnisse erzielen (45).

1.1.2.2. *RAS*-Mutationen und anti-*EGFR*-Antikörper

Der sog. *mitogen activated protein kinase (MAPK)* Signalweg gilt als einer der Hauptsignalwege zur Entstehung des kolorektalen Karzinoms, welcher durch Ligandenbindung wie Amphiregulin und Epiregulin an den transmembranösen *epidermal*

growth factor receptor (EGFR) aktiviert wird (46). Durch Alterationen von in diesen Signalweg integrierten Genen wie *KRAS* oder *NRAS* kommt es zur kontinuierlichen Aktivierung des Signalwegs und damit gesteigerter Proliferationsaktivität der Zellen (47). 50-60% der Tumore sind *RAS*-mutiert. *RAS*-Mutationen sind negative prognostische und prädiktive Biomarker für eine anti-*EGFR*-Therapie (48-52). Mit Sotorasib und Adagrasib existieren die ersten, gegen das Proteinprodukt einer *KRAS* G12C Mutation gerichteten small molecules, welche in ersten Phase I/II-Studien des schwer vorbehandelten metastasierten KRK eine gute Tolerabilität und Effektivität zeigten (53, 54).

Cetuximab wurde als erster monoklonaler, chimärer Antikörper zunächst für den Einsatz im *KRAS* Exon 2-Wildtyp, später für *RAS* (*KRAS* Exon 2-4 und *NRAS* Exon 2-4)-Wildtyp KRK in Kombination mit FOLFIRI oder FOLFOX zugelassen (55). Neben der Molekularpathologie ist auch die Primärtumor-Lokalisation entscheidend für das Therapieansprechen, da Tumore des rechten Hemikolons (definiert als Tumore des Caecum bis zu den proximalen zwei Drittel des Colon transversum) trotz *RAS*-Wildtyp-Status in retrospektiven Untersuchungen mit einem schlechteren Ansprechen auf Cetuximab assoziiert wurden (7, 56, 57). Dies wurde erklärt durch die geringere Prävalenz der *EGFR*-Liganden Amphiregulin und Epiregulin sowie Anreicherung von *BRAF* V600E-Mutationen, Hypermethylierung und Mikrosatelliteninstabilität (58).

Panitumumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen den *EGFR* mit Zulassung in der Erstlinientherapie in Kombination mit FOLFOX oder FOLFIRI für das metastasierte *RAS*-Wildtyp KRK (59, 60), in Zweitlinientherapie in Kombination mit FOLFIRI (61) oder nach Versagen von fluorpyrimidin-, oxaliplatin- und irinotecan-haltiger Regime als Monotherapie (62). Als Erhaltungstherapie in Kombination FU/FA gegenüber FU/FA alleine kam es zu einer Verlängerung PFS nach dreimonatiger Induktionstherapie mit Panitumumab und FOLFOX (63). Die Kombination mit FU/FA ist hierbei einer Panitumumab-Monotherapie überlegen (64). Die PARADIGM-Studie zeigte darüber hinaus als erste Studie prospektiv, dass eine linksseitige Primärtumor-Lokalisation für die Effektivität von Panitumumab entscheidend ist (65).

1.1.2.3. **BRAF V600E-Mutation und Inhibition**

Das *RAF*-Protein ist im *MAPK*-Signalweg dem *RAS*-Protein nachgeschaltet (66). *BRAF*-Mutationen treten mit einer Prävalenz von 6-10% auf und lassen sich in drei Klassen unterteilen (67, 68). Während Klasse I Mutationen (*BRAF* V600D, E, K, R) am Häufigsten auftreten, die höchste Kinaseaktivität aufweisen und prognostisch ungünstig mit einem Gesamtüberleben von ca. 12 Monaten sind (52), zeigen die selteneren Klasse II und III Mutationen eine wesentlich geringere Kinaseaktivität und bessere Prognose (67-69).

Encorafenib ist ein *BRAF*-gerichteter Tyrosinkinase-Inhibitor, der in Kombination mit Cetuximab für die Zweitlinientherapie des *BRAF* V600E mutierten metastasierten KRK nach Versagen einer vorherigen Strategie zugelassen wurde (70). Es zeigte sich ein signifikant verbessertes Therapieansprechen, PFS und Gesamtüberleben für Cetuximab/Encorafenib mit und ohne den *MEK*-Inhibitor Binimetinib gegenüber einer Standard-Chemotherapie mit FOLFIRI+Cetuximab. Die Verträglichkeit der Doublette war mit gleicher Effektivität zur Triplette jedoch deutlich höher (70).

1.1.2.4. **Mikrosatelliten-Instabilität und Checkpoint-Inhibition durch PD-(L)1**

Antikörper und CTLA4-Inhibitoren

Mikrosatelliten-Instabilität (*MSI*) kommt bei ca. 5% aller metastasierten KRK vor und ist definiert als Ausfall der DNA-Mismatch-Repair-Gene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* basierend auf Mutationen oder entsprechender Methylierung der Genregion (71). Hierdurch kommt es zur übermäßigen Anhäufung von Mutationen in der Tumor-DNA (sog. tumor mutational burden, TMB), welche als Neo-Antigene durch Immunzellen erkannt werden können. Eine gezielte Therapie durch gegen den sog. *programmed death 1* (*PD-1*) Rezeptor bzw. dessen Liganden *PD-L1* hebt in diesen Tumoren des KRK die tumorbedingte T-Zell-Erschöpfung auf und führt zu einer antineoplastischen Immunantwort (72).

Pembrolizumab ist ein monoklonaler *PD-1*-Antikörper und wurde im hochgradig mikrosatelliten-instabilen (*MSI-H*, definiert als gesicherter Ausfall zweiter Mismatch-

Reparaturgene) metastasierten KRK als Erstlinientherapie (73) sowie nach Vorbehandlung mit einer fluorpyrimidin-haltigen Therapie zugelassen (74). Gegenüber der Standardtherapie mit FOLFOX oder FOLFIRI mit Cetuximab oder Bevacizumab in Erstlinie zeigte sich eine signifikante PFS-Verlängerung auf 16 Monate. Die Daten des Gesamtüberlebens sind allerdings noch nicht ausgereift (73). Mit einem Therapieansprechen von 33% und einem Gesamtüberleben von 31,4 Monaten wies die Immuntherapie eine signifikante Verbesserung zu alternativen Drittlinentherapie-Optionen wie TAS102 auf (74).

Der *PD-1*-Antikörper **Nivolumab** ist bislang nur in Kombination mit dem *CTLA4*-Antikörper **Ipilimumab** im *MSI-H* metastasierten KRK nach vorheriger fluorpyrimidin-haltiger Therapie zugelassen. Aktuelle Daten der Phase-II Checkmate-142 Studie zeigen in Erstlinientherapie ein Therapieansprechen von 69%. Allerdings ist auch die Rate an Grad-3-Toxizitäten mit 22% (Erstlinie Nivolumab/Ipilimumab) bzw. 30% (Folgelinie Nivolumab/Ipilimumab) gegenüber einer Monotherapie erhöht (75).

1.1.2.5. ***NTRK*- und *HER2/neu*-Inhibition**

Ein Fusion der Tropomyosin-Rezeptor-Kinase (*TRK*) - Gene *NTRK1*, *NTRK2* oder *NTRK3* wird in 0,5% aller metastasierten KRK diagnostiziert (76). Aufgrund hoher Kosten für Sequenzierungsverfahren in der Routinediagnostik empfiehlt die ESMO Leitlinie ein Screening via Immunhistochemie, gefolgt von einer Bestätigung durch Sequenzierungsanalyse (3). Eine zielgerichtete Therapie kann mit **Larotrectinib** oder **Entrectinib** erfolgen und führte in zwei Basket-Studien ausgeprägt vorbehandelten soliden Tumore mit positiver *NTRK*-Fusion zu einem Therapieansprechen von 57 bzw. 79% für 10,0 Monate (77, 78).

Der *HER2/neu*-Rezeptor wird durch das *ERBB2*-Gen kodiert und zählt mit dem *EGFR*, *HER3* und *HER4* zur Familie der *HER*-Rezeptoren (46). *HER2/neu* formt bei Ligandenbindung ein Heterodimer mit *HER3* und aktiviert die nachgeschalteten *MAPK* sowie Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (*PI3K*) Signalwege (79). Eine übermäßige Expression tritt in ca. 5 % aller Patienten mit metastasierten KRK auf. Während Monotherapien keine Effektivität zeigten, wurde in der HERACLES Studie duale *HER2/neu*-Blockade durch eine Kombination des monoklonalen

Antikörpers Trastuzumab mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Lapatinib in stark vorbehandelten, *HER2/neu*-positiven bzw. amplifizierten *KRAS*-Wildtyp-Tumoren mit einem verlängerten Gesamtüberleben und PFS assoziiert (80). Diese Ergebnisse wurden für die Kombination der Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab bestätigt. Der positive Effekt einer *HER2/neu*-Blockade war jedoch auf (*K*)*RAS*-Wildtyp-Tumore beschränkt (81). Das sog. Antibody-Drug-Conjugate Trastuzumab-deruxtecan, ein Molekül aus dem o.g. Antikörper und einem Topoisomerase-Inhibitor, welcher nach intrazellulärer Aufnahme seine Wirkung entfaltet, führte in ausgeprägt vorbehandelten Patienten zu einem Therapieansprechen von 45,3% (82).

1.2. Therapiealgorithmen des metastasierten *RAS/BRAF*-Wildtyp, *RAS*-mutierten sowie *BRAF V600E*-mutierten KRK

Unter Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse ergeben sich daher in Abhängigkeit der Molekularpathologie und Primärtumorlokalisation individuelle Therapiealgorithmen, auf die im Nachfolgenden kurz eingegangen werden soll.

1.2.1. *RAS/BRAF*-Wildtyp-Tumore

Sofern sich keine *RAS*- oder *BRAF V600E*-Mutationen nachweisen lassen, wird in der Erstlinientherapie linksseitiger Primärtumore die Anwendung einer Chemotherapie-Doublette mit anti-*EGFR*-Antikörpern empfohlen (65, 83-85). Die Anwendung von Chemotherapie-Triplets mit anti-*EGFR*-Antikörpern in linksseitigen *RAS*-Wildtyp-Primärtumoren ist nicht effektiver als eine Doublette (86, 87). In rechtsseitigen Primärtumoren konnte keine Verlängerung des PFS oder des Gesamtüberlebens durch die Hinzunahme von anti-*EGFR*-Antikörpern beobachtet werden, jedoch ein besseres Therapieansprechen. In Einzelfällen, bspw. zur Konversionstherapie, kann daher der Einsatz von anti-*EGFR*-Antikörpern in rechtsseitigen Primärtumoren erwogen werden (7, 84, 88). Die Standardtherapie rechtsseitiger *RAS*-Wildtyp-Tumore umfasst anti-*VEGF*-Antikörper mit Chemotherapie-Doublette oder -Triplet (6, 89-91). Die Kombination von anti-*EGFR*- und anti-*VEGF*-Antikörper zeigte keinen

Vorteil im Hinblick auf PFS, Gesamtüberleben oder Therapieansprechen gegenüber anti-*VEGF*-Antikörpern alleine (92, 93).

In der zweiten Therapielinie sollte ein Wechsel des zytostatischen Regimes (d.h. FOLFIRI zu FOLFOX respektive FOLFOX zu FOLFIRI) erfolgen, sowie eine anti-*VEGF*-gerichtete Therapie (43). Linksseitige Tumore ohne Erstlinientherapie mit anti-*EGFR*-Antikörper können diesen in der Zweitlinie erhalten (94, 95).

In der Drittlinie stehen die Optionen TAS102, eine Re-Challenge mit anti-*EGFR*-Antikörpern nach vorherigem Therapieansprechen, oder Regorafenib zur Verfügung, wobei Regorafenib den Zulassungsstatus in Deutschland verloren hat (34, 96-98).

1.2.2. *RAS*-mutierte Tumore

RAS-mutierte Tumore sollten ungeachtet der Primärtumorlokalisation in Erstlinie mit einer Chemotherapie-Doublette oder -Triplet in Kombination mit einem anti-*VEGF*-Antikörper behandelt werden (3). Die Kombination von Bevacizumab mit FOLFOXIRI im Vergleich zu FOLFIRI verbesserte das PFS, Gesamtüberleben und Therapieansprechen (91). Nach einer De-Eskalation auf eine Erhaltungsstrategie war die Re-Challenge mit FOLFOXIRI darüber hinaus effektiver als eine Sequenz zweier Doubletten (FOLFOX gefolgt von FOLFIRI) (99).

In Zweitlinie kann bei Wechsel des Chemotherapie-Regimes die Fortführung von Bevacizumab erfolgen (43). Nach Erstlinientherapie mit FOLFOX+Bevacizumab besteht auch die Möglichkeit der Anwendung von FOLFIRI+Ramucirumab bzw. Afibercept (44, 45).

Die Drittlinientherapie umfasst TAS102 oder Regorafenib (34, 97, 98).

1.2.3. *BRAF V600E*-mutierte Tumore

BRAF V600E mutierte Tumore sollten in Erstlinie mit einer Chemotherapie-Doublette, oder – bei hohem Remissionsdruck – mit einem Triplet sowie einem anti-*VEGF*-Antikörper behandelt werden (6, 51, 100-103). Die Kombination aus Triplet und anti-*EGFR*-Antikörper zeigte ein niedrigeres PFS im Vergleich zu anti-*VEGF*-Antikörpern bei jedoch gleichem Therapieansprechen und Gesamtüberleben (104). In der Zweitlinientherapie wird die Applikation von Cetuximab+Encorafenib empfohlen (70, 105).

Die Drittlinientherapie entspricht den oben genannten Situationen.

1.3. Zielsetzung

Obwohl prognostische und prädiktive Biomarker die Therapie des metastasierten KRK signifikant verbessert haben, liegt jedoch auch bei bestmöglicher Stratifizierung der Patienten nach *RAS*-Wildtyp-Status und linksseitiger Primärtumorlokalisation unter empfohlener Therapie mit Chemotherapie-Doublette und anti-*EGFR*-Antikörper ein Therapieansprechen von 80% vor, wodurch jeder fünfte Patient keine signifikante Reduktion seiner Tumorlast erlebt (65). Eine plausible Erklärung hierfür stellen möglicherweise weitere primäre (d.h., vor Beginn einer Therapie vorliegende) und sekundäre (d.h. sich im Verlauf der Therapie entwickelnde) Resistenzmechanismen dar, welche nicht durch den aktuellen diagnostischen Standard einer DNA-Mutationsanalyse der Gene *RAS* und *BRAF*, sowie Testung auf Mikrosatelliteninstabilität und *HER2/neu*- bzw. *NTRK*-Expression abgebildet werden. Die Unterteilung der Primärtumorlokalisation nach Seite ist darüber hinaus auch möglicherweise zu grob und würde von einer differenzierteren Charakterisierung der einzelnen Primärtumorlokalisationen profitieren. Die nächsten rationalen Schritte wären demnach eine Identifizierung zusätzlicher Biomarker basierend auf einer mRNA-Genexpression, die Erfassung weiterer DNA-basierter Biomarker mit möglicherweise prädiktiver Relevanz inklusive Beobachtung über den Therapieverlauf und eine nähere molekularbiologische Charakterisierung von Primärtumorlokalisationen.

Dieses Habilitationsprojekt setzte sich daher folgende Ziele:

1. Evaluation neuer Biomarker basierend auf Einzelgen-mRNA-Expression im Hinblick auf deren prognostische und prädiktive therapeutische Relevanz für anti-*EGFR*- und anti-*VEGF*-Antikörper
2. Ableitung von molekularen Subtypen basierend auf mRNA-Genexpressionssignaturen (z.B. anhand der sog. consensus molecular subtypes,

CMS) mit Evaluation als prognostischer und prädiktiver Biomarker im Hinblick auf eine Therapieintensität

3. Optimierung der individuellen Therapie durch Präzisionsonkologie mit Integration bekannter und neuer DNA-basierter Biomarker zusammen mit klinischen Patientencharakteristika inklusive Primärtumorlokalisation
4. Longitudinales Monitoring von DNA-basierten Biomarkern über den Therapieverlauf der Patient*innen und Assoziation mit der individuellen Prognose

Hierfür standen die Daten und das Tumormaterial von insgesamt 1.677 Patienten der folgenden klinischen, randomisierten Studien zur Verfügung:

- **FIRE-1:** Erstlinie mKRK (Phase-III):
FOLFIRI vs. modifiziertes Irinotecan + Oxaliplatin (mIrOx) (106)
- **CIOX (AIO-KRK 0104):** Erstlinie mKRK (Phase II):
CAPIRI + Cetuximab vs. CAPOX + Cetuximab (107)
- **FIRE-3 (AIO-KRK 0306):** Erstlinie KRAS Exon 2 Wildtyp mKRK (Phase-III)
FOLFIRI + Cetuximab vs. FOLFIRI + Bevacizumab (108)
- **XELAVIRI (ML22011; AIO-KRK 0110):** Erstlinie mKRK (Phase-III)
Fluorpyrimidin + Bevacizumab und sequenzielle Eskalation zu FOLFIRI + Bevacizumab im Progress vs. initialer Kombinationstherapie FOLFIRI + Bevacizumab (109)

Die Ergebnisse des Habilitationsprojektes sind im Nachfolgenden aufgeführt und werden jeweils einleitend erläutert.

2. Originalarbeiten

2.1. **Amphiregulin Expression Is a Predictive Biomarker for *EGFR* Inhibition in Metastatic Colorectal Cancer: Combined Analysis of Three Randomized Trials**

Amphiregulin und Epiregulin agieren als Liganden des *EGFR* und aktivieren den nachgeschalteten *MAPK*-Signalweg über ihre Rezeptorbindung. Die Expression der Liganden wird über autokrine Feedback-Mechanismen reguliert, unter anderem durch eine Aktivierung von Integrin $\alpha 6\beta 4$ und Methylierung (110, 111). Die Ligandenexpression ist abhängig von der Primärtumorlokalisation, wobei linksseitige Primärtumore eine hohe und rechtsseitige Primärtumore eine niedrige Expression aufweisen (58, 112). In mehreren retrospektiven Analysen von Patienten, die mit Cetuximab oder Chemotherapie behandelt wurden, wurde ein positiver prognostischer Wert einer hohen gegenüber niedrigen Ligandenexpression beschrieben (113-117). Aufgrund der Studiendesigns war eine Testung als prädiktiver Biomarker für eine anti-*EGFR*-Therapie jedoch bis zu dem Zeitpunkt unserer Analyse nicht erfolgt, da ein jeweiliger anti-*EGFR*-freier Kontrollarm fehlte; weiterhin war die Übertragbarkeit von Daten zwischen Studienkollektiven aufgrund methodologischer Unterschiede (unterschiedliche mRNA-Konzentration, Geräte, Referenzgene) nicht möglich. Dadurch, dass in unseren Studien FIRE-1, CIOX und FIRE-3 jedoch die *AREG*- und *REG*-Expression zwar zu unterschiedlichen Zeitpunkten, jedoch mit ähnlicher Methodik und mRNA-Konzentration gemessen wurde, konnten wir eine gemeinsame Analyse nach Normalisierung der Rohdaten durchführen und den Einfluss einer hohen Expression innerhalb unterschiedlicher Therapiearme (anti-*EGFR* plus Chemotherapie, anti-*VEGF* plus Chemotherapie oder Chemotherapie alleine) prüfen. Prognostisch zeigte sich eine signifikante Verlängerung des PFS und Gesamtüberlebens im Falle einer hohen Amphiregulin-Expression, getestet an zwei Schwellenwerten. Weiterhin beobachteten wir einen signifikanten, positiv prädiktiven Effekt einer hohen Amphiregulin-Expression für die Therapieeffektivität von Cetuximab. Diese Analyse stellte das größte Studienkollektiv bislang in dieser Fragestellung dar (118) (doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2748).

Amphiregulin Expression Is a Predictive Biomarker for *EGFR* Inhibition in Metastatic Colorectal Cancer: Combined Analysis of Three Randomized Trials.

Stahler A, Stintzing S, Modest DP, Ricard I, Giessen-Jung C, Kapaun C, Ivanova B, Kaiser F, Fischer von Weikersthal L, Moosmann N, Schalhorn A, Stauch M, Kiani A, Held S, Decker T, Moehler M, Neumann J, Kirchner T, Jung A, Heinemann V.

Clin Cancer Res. 2020 Dec 15;26(24):6559-6567. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2748. Epub 2020 Sep 17. PMID: 32943459

<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-2748>

2.2. First-line fluoropyrimidine plus bevacizumab followed by irinotecan-escalation versus initial fluoropyrimidine, irinotecan and bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer – final survival and per-protocol analysis of the randomized XELAVIRI trial (AIO KRK 0110)

Vor der Einführung monoklonaler Antikörper wurde eine sequenzielle zytostatische Eskalationsstrategie in mehreren Studien evaluiert, jedoch nicht mit höherer Effektivität assoziiert. Der Vorteil dieser Konzepte lag jedoch in der besseren Steuerung der therapieassoziierten Toxizität (119-121). Mit der Einführung von Bevacizumab in Kombination mit Chemotherapie zeigte sich eine Verbesserung des PFS sowie des Gesamtüberlebens (122). Die Therapielandschaft veränderte sich zugunsten einer Kombination von monoklonalen Antikörpern mit Chemotherapie-Regimen und verließ das Konzept der sequenziellen Therapieeskalation. Die XELAVIRI-Studie griff diese Therapieform in der Ära monoklonaler Antikörper erneut auf und untersuchte als erste Studie die Nicht-Unterlegenheit eines sequenziellen Therapieeskalations-Konzepts mit Fluorpyrimidin und Bevacizumab gefolgt von FOLFIRI plus Bevacizumab im Falle eines Progress gegenüber initialer Kombination mit FOLFIRI plus Bevacizumab (109). Ziel dieser Studie war es unter Anderem, eine auf die Bedürfnisse der Patient*innen angepasste Therapie anbieten zu können: intensiver im Falle einer progredienten Tumorerkrankung und weniger intensiv zur Vermeidung von Toxizitäten im Falle einer stabilen Erkrankungssituation. Mit der finalen Überlebens- und Per-Protokoll-Analyse analysierten wir die Gesamtpopulation und molekulare (*RAS/BRAF* Wildtyp, *RAS*-mutiert und *BRAF* V600E-mutiert) und altersbezogene (≤ 70 und > 70 Jahre) hinsichtlich des primären Endpunkts „Zeit bis zum Therapieversagen“ und der sekundären Endpunkte PFS und Gesamtüberleben. Es zeigte sich weiterhin eine knapp verfehlt Nicht-Unterlegenheit der sequenziellen Therapie im Hinblick auf den primären Endpunkt in der kompletten Studienpopulation. Jedoch wurde eine formale Nicht-Unterlegenheit einer sequenziellen Therapie in *RAS*-mutierten Tumoren und Patienten > 70 Jahre beobachtet, sodass klinische und molekularpathologische Charakteristika in die patienten-individuelle Therapie integriert werden sollten für eine bestmögliche Verträglichkeit und Effektivität (123) (doi: 10.1016/j.ejca.2022.06.019).

First-line fluoropyrimidine plus bevacizumab followed by irinotecan-escalation versus initial fluoropyrimidine, irinotecan and bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer - Final survival and per-protocol analysis of the randomised XELAVIRI trial (AIO KRK 0110).

Stahler A, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Kaiser F, Decker T, Held S, Graeven U, Schwaner I, Denzlinger C, Schenk M, Kurreck A, Heinrich K, Gießen-Jung C, Neumann J, Kirchner T, Jung A, Stintzing S, Heinemann V.

Eur J Cancer. 2022 Sep;173:194-203. doi: 10.1016/j.ejca.2022.06.019. Epub 2022 Aug 5. PMID: 35940054

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2022.06.019>

2.3. Consensus molecular subtypes in metastatic colorectal cancer treated with sequential versus combined fluoropyrimidine, bevacizumab and irinotecan (XELAVIRI trial)

Neben DNA-basierten Biomarkern interessierte auch der Einfluss der Consensus Molecular Subtypes (CMS) 1-4 im Hinblick auf den prognostischen Einfluss und die notwendige Therapieintensität in der XELAVIRI-Studie. Die CMS wurden 2015 als einheitliche Klassifikation von vier molekularen Untergruppen des KRK aus mehreren Vorläuferklassifikationen deriviert und umfassen CMS1 als Immuntyp, welcher mit *BRAF* V600E-Mutationen assoziiert wurde und einer hohen Rate an *MSI-H* Tumoren, CMS2 als kanonischen Typ, welcher mit einer Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs einhergeht, CMS3 als metabolischen Subtyp, welcher jedoch im metastasierten Stadium unterrepräsentiert ist und CMS4 als mesenchymalen Subtyp, der eine starke Assoziation mit bindegewebigen Tumor-Microenvironment und *TGF β* -Aktivierung aufweist (124). In retrospektiven Analysen des metastasierten KRK zeigte sich ein signifikanter prognostischer Unterschied bei den Subgruppen, wobei CMS2 und CMS4 als prognostisch günstig und CMS1 als prognostisch ungünstig beschrieben wurden (125-127). Die prädiktive Aussagekraft ist umstritten, da die Ergebnisse zwei Studien mit ähnlichem Design widersprüchliche Ergebnisse aufwiesen (125, 126). Eine genaue Erklärung ist weiterhin ausstehend, jedoch könnte die Interaktion von Chemotherapie-Doublette und Antikörper in den jeweiligen CMS eine Rolle spielen (128). Eine Herausforderung stellte das Abrufen der CMS-Klassifikation dar, da der originale Ansatz auf einem Random Forest Classifier von Microarray-Daten beruhte, hier jedoch Genexpressionsdaten der sog. Nanostring-Plattform mit einer deutlich reduzierten Genzahl (Microarray: >23.000 Gene; Nanostring PanCancer Progression Panel: 770 Gene) vorlagen. Wir verwendeten daher analog zur CALGB SWOG 80405 Studie (126) einen re-derivierten multinomialen Regressions-Classifer, welchen wir auf die originale Klassifikation von Guinney et al. sowie auf vorbekannte Microarray-Daten der FIRE-3-Studie trainierten (124, 125). Zusammengefasst zeigten sich die CMS in dieser Analyse nicht als prognostischer, wohl aber als Biomarker der Therapieintensität (129) (doi: 10.1016/j.ejca.2021.08.017).

Consensus molecular subtypes in metastatic colorectal cancer treated with sequential versus combined fluoropyrimidine, bevacizumab and irinotecan (XELAVIRI trial).

Stahler A, Heinemann V, Schuster V, Heinrich K, Kurreck A, Gießen-Jung C, Fischer von Weikersthal L, Kaiser F, Decker T, Held S, Graeven U, Schwaner I, Denzlinger C, Schenk M, Neumann J, Kirchner T, Jung A, Kumbrink J, Stintzing S, Modest DP.

Eur J Cancer. 2021 Nov;157:71-80. doi: 10.1016/j.ejca.2021.08.017. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34507244

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2021.08.017>

2.4. Single-nucleotide variants, tumour mutational burden and microsatellite instability in patients with metastatic colorectal cancer: Next-generation sequencing results of the FIRE-3 trial

Die translationale Forschung im metastasierten KRK dient unter Anderem dazu, Biomarker für eine Prädiktion der Effektivität individualisierter Therapien wie monoklonale Antikörper zu evaluieren (3). Die Einführung von Next Generation Sequencing (NGS) im Vergleich zu der vormals verwendeten Pyrosequenzierung steigerte die Sensitivität der Detektion von DNA-Mutationen um ein Vielfaches und umfasste nunmehr ganze Genomabschnitte denn einzelne Genbereiche (130). Hierdurch wurde es möglich, Hyperselektionen von Patient*innen-Subgruppen für die Vorhersage der Therapieeffektivität einzelner Substanzen durchzuführen (131). Insofern sollte für das prätherapeutisch gewonnene Tumormaterial der FIRE-3-Studie evaluiert werden, ob auch Biomarker jenseits der bekannten *RAS*- und *BRAF* V600E-Mutationen, inklusive der Gesamttumorlast (tumor mutational burden) pro Megabase DNA und Mikrosatelliteninstabilität, prognostisch bzw. prädiktiv relevant sind (51, 83). Unsere Fragestellung umfasste weiterhin die Prävalenz der häufigsten Mutationen und deren Verteilung im Hinblick auf die Primärtumorlokalisation. Es zeigten sich okkulte *RAS*-Mutationen, welche vormals durch Pyrosequenzierung nicht detektiert worden waren, sowie vor allem *BRAF* non-V600E und *SMAD4*-Mutationen als neue, prognostische Biomarker des metastasierten KRK. Im Hinblick auf die Mutationsprofile stellten Tumore des Colon transversum in unserer Analyse eine eigenständige Entität dar, verglichen zu links- und rechtsseitigen Primärtumoren (132) (doi: 10.1016/j.ejca.2020.07.003).

Single-nucleotide variants, tumour mutational burden and microsatellite instability in patients with metastatic colorectal cancer: Next-generation sequencing results of the FIRE-3 trial.

Stahler A, Stintzing S, von Einem JC, Westphalen CB, Heinrich K, Krämer N, Michl M, Modest DP, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Heintges T, Kahl C, Kullmann F, Scheithauer W, Moehler M, Kaiser F, Kirchner T, Jung A, Heinemann V.

Eur J Cancer. 2020 Sep;137:250-259. doi: 10.1016/j.ejca.2020.07.003. Epub 2020 Aug 15. PMID: 32810748

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2020.07.003>

2.5. Mutational profiles of metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab before and after secondary resection (AIO KRK 0306; FIRE-3)

Durch die Kombination monoklonaler Antikörper mit Chemotherapie-Regimen zeigte sich eine signifikante Verbesserung des PFS sowie des Gesamtüberlebens, nicht zuletzt auch durch eine Verbesserung der Rate an sekundären Resektionen (49, 91, 133). Die aktuellen Leitlinien empfehlen daher interdisziplinäre Therapiekonzepte für die Optimierung des Langzeitüberlebens (3, 134). Über 50% der Patient*innen können primär oder sekundär durch eine Konversions-Chemotherapie für lokale Verfahren an Metastasen in Frage kommen (133). Jedoch fehlen bislang klare Definitionen, wer von einer sekundären Intervention profitiert. Diese kann durch die Erfahrung des jeweiligen Chirurgen, durch das Ansprechen auf die antineoplastische Therapie, aber auch durch molekulare Biomarker wie das Vorliegen einer *BRAF* V600E-Mutation, beeinflusst werden (135). Biomarker zur frühzeitigen Identifikation von Patient*innen mit einem Nutzen von sekundären Resektionen vor Therapieeinleitung oder während der Therapie (longitudinal) sind daher unbedingt notwendig (130). Wir setzten uns daher zum Ziel, mit einem der bis dato größten zeitlich verbundenen Kollektive NGS-Daten aus Primärtumor oder Metastase vor Therapieeinleitung gegenüber Daten aus Material von sekundären Metastasenresektionen nach Therapie von insgesamt 25 Patienten der FIRE-3-Studie zu vergleichen, um Biomarker für eine sekundäre Intervention zu identifizieren und deren Präsenz über den Therapieverlauf festzuhalten. Interessanterweise zeigte sich nur ein Anteil von n=18 (75%) der Patient*innen mit longitudinalen Tumorproben, deren Mutationsprofil sich über den Therapieverlauf änderte. Insgesamt wurden mehr Veränderungen unter einer Therapie mit Cetuximab beobachtet verglichen zu Bevacizumab. Weiterhin wurden unter Cetuximab bestehende Veränderungen entweder verloren oder neue hinzugewonnen, während lediglich neue Veränderungen unter Bevacizumab auftraten. Nur ein Drittel der mit Cetuximab behandelten Patient*innen entwickelten bekannte Resistenzmechanismen, wodurch sich die günstige Prognose und sekundäre Resektabilität möglicherweise erklärt (136) (10.1002/ijc.33747) .

Mutational profiles of metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab before and after secondary resection (AIO KRK 0306; FIRE-3).

Stahler A, Heinemann V, Holch JW, von Einem JC, Westphalen CB, Heinrich K, Schlieker L, Jelas I, Alig AHS, Fischer LE, Weiss L, Modest DP, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Moehler M, Kaiser F, Kirchner T, Jung A, Stintzing S.

Int J Cancer. 2021 Dec 1;149(11):1935-1943. doi: 10.1002/ijc.33747. Epub 2021 Jul 31. PMID: 34310714

<http://dx.doi.org/10.1002/ijc.33747>

3. Diskussion

3.1. Genexpressionsbasierte Biomarker in der Therapie des metastasierten KRK und deren Integration in die klinische Praxis (2.1., 2.3.)

Aktuell etablierte Biomarker in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms basieren auf Veränderungen der DNA und subsequent Proteinexpression. Die Ergebnisse dieser Analysen werden üblicherweise, nach Vergleich mit dem humanen Referenzgenom, binär berichtet (Wildtyp oder mutiert) (137).

mRNA-Biomarker hingegen basieren auf der metrischen Expression bestimmter Gene innerhalb einer Zelle, welche in Einzelgen-Analysen mittels Fluoreszenz-markierter RT-qPCR quantifiziert wird und auf das Vorhandensein einer Basis-Expression von sog. Referenzgenen normalisiert wird (138). Diese sog. normalisierte Genexpression muss für eine Interpretation im Kontext von Überlebensanalysen „binärisiert“ werden, d.h. es erfolgt eine Einteilung der metrischen normalisierten Genexpression in eine „hohe“ und „niedrige“ Expression nach Maßgabe des Untersuchers. Einheitliche Schwellenwerte hierfür existieren bis heute nicht. Häufige Vorgehen umfassen die Bestimmung von Schwellenwerten über eine sog. Receiver Operator Characteristic (ROC) Analyse oder die Unterleitung nach Expressions-Median bzw. der dritten Quartile (113-116). In Abhängigkeit der zugrundeliegenden Methodik, Referenzgene und Schwellenwerte kann es hierbei zu signifikanten Unterschieden zwischen einzelnen Kollektiven kommen, sodass Ergebnisse nicht übertragbar sind.

Hierdurch könnte sich der teilweise diskrepante prognostische Stellenwert einer Amphiregulin und Epiregulin mRNA-Expression erklären (113, 116, 139). Aufgrund fehlender Vergleichsarme in früheren Untersuchungen war eine Evaluation als prädiktiver Biomarker für anti-EGFR-Antikörper zunächst nicht möglich. Unsere Analyse führte als Erste eine gemeinsame Normalisierung der Einzelgen-Datensätze dreier Studienkollektive durch. Unter Anwendung zweier Schwellenwerte (Median und drittes Quartil der Expression) bestätigten wir den günstigen prognostischen Effekt einer hohen Amphiregulin-Expression und bewiesen die Rolle als prädiktiven Biomarker für Cetuximab. Interessanterweise zeigte sich dieser Effekt unabhängig von der (in unseren Analyse immunhistochemisch erfassten) EGFR-Expression

(140, 141). Analog zu einer Voruntersuchung konnte eine numerisch geringere Amphiregulin-Expression in rechtsseitigen gegenüber linksseitigen Primärtumoren beobachtet werden, welche das verminderte Ansprechen auf anti-EGFR-Antikörper erklären könnte (112). Allerdings war die Korrelation der Gen-Expression mit der Primärtumorlokalisation in dieser Analyse nicht prä-spezifiziert, sodass die Fallzahlen keine sicheren Rückschlüsse zuließen.

Im weiteren Verlauf der Genexpressions-Forschung etablierten sich Hochdurchsatzanalysen wie Microarrays, die Nanostring-Plattform oder RNA-Sequenzierung, welche die gleichzeitige Bestimmung mehrerer hundert bis tausend Gene pro Probe möglich machten (138). Dies erforderte komplexere bioinformatische Analysemethoden, da hier nun die automatisierte Selektion signifikant unterschiedlich exprimierter Gene (differential gene expression, DGE) zwischen zwei oder mehr Zuständen sowie die Funktionalität der Gene (gene ontology, GO) und Zuweisung zu ganzen Funktionsgruppen (gene set enrichment analysis, GSEA) in den Fokus rückten (142, 143). Unter Anwendung dieser Analysen grenzten mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander molekulare Subgruppen von Kolonkarzinomen ab, welche nach gemeinsamer Einigung in die sog. Consensus Molecular Subtypes (CMS) 1-4 mündeten, und kürzlich nochmals re-spezifiziert wurden (124, 144). Die Grundlage für die Klassifikation bildete das Software-Paket *CMSclassifier*, welches als Random Forest Classifier den jeweiligen CMS-Subtyp in Microarray-Daten vorhersagen konnte (124).

Dieses Software-Paket war aufgrund von Unterschieden in der Methodik und zugrundeliegenden Genzahl für die XELAVIRI-Studie jedoch nicht anwendbar. Die Klassifikation wurde daher unter Anwendung von Original-Daten von Guinney et al. und Daten aus der FIRE-3-Studie mittels multinomialer Regressionsanalyse, ähnlich zum Vorgehen in der CALGB SWOG 80405 Studie, re-deriviert (124-126). Im Hinblick auf die Prävalenz zeigten wir Unterschiede der CMS-Häufigkeiten für das metastasierte gegenüber frühen Krankheitsstadien, vor allem für CMS3, auf (124). Diese Unterschiede könnten sich durch unterschiedlich aggressive Tumorbiologien und Rezidivwahrscheinlichkeiten erklären (145). Im Gegensatz zu Analysen der FIRE-3-, CALGB SWOG 80405 und AGITG MAX Studie fand sich kein signifikanter prognostischer Unterschied zwischen den molekularen Subtypen in

unserer Analyse (125-127). In der XELAVIRI-Studie wurde das Gesamtüberleben jedoch möglicherweise ungünstig durch die Abwesenheit eines anti-EGFR-Antikörpers und einen hohen Anteil an *RAS*-mutierten Tumoren beeinflusst, da sich der Vorteil einer initialen Kombinationstherapie nur für CMS2/4 *RAS*-Wildtyp-Tumore zeigte. Für diese Überlegung spricht auch die fehlende prognostische Relevanz der CMS innerhalb der nicht molekular selektionierten TRIBE2-Studie (146). Folglich könnte eine toxizitäts-sparende sequenzielle Therapie in Patienten mit *RAS*-mutierten Tumoren die Lebensqualität der Patienten bei gleicher Effektivität steigern.

Unsere Analysen waren nicht prä-spezifiziert, retrospektiv und explorativ. Um tatsächlich prädiktive Effekte eines genexpressionsbasierten Biomarkers zweifelsfrei bestätigen zu können, wäre eine prospektive Bestimmung der Genexpression bzw. des molekularen Subtyps notwendig. Derzeit hohe Kosten in der Einzeltestung von Patient*innen, eine protrahierte Analysezeit, ggf. schleppende Studienrekrutierung und nicht zuletzt ein erhöhter bioinformatischer Aufwand aufgrund von Unterschieden in der Methodik oder Genpanels machen dies aktuell jedoch nahezu unmöglich. Weiterhin erschweren diese Faktoren ebenfalls die routinemäßige Integration derartiger Biomarker in die klinische Praxis. Potenzielle Lösungen für diese Problematik werden derzeit in der Veröffentlichung weiterer Klassifikationssysteme für andere Plattformen oder auch im methodologischen Transfer zur Immunhistochemie unternommen (147, 148). Dennoch besteht auch hier das Problem kleinster Änderungen an Assay oder Daten-Input, die zu möglicherweise verzerrten Ergebnissen führen würden. Die Entwicklung einer End-zu-End-Lösung zur Prädiktion molekularer Subtypen durch z.B. Hämatoxylin und Eosin gefärbte Tumorschnitte durch Deep Learning könnte die Prozessgeschwindigkeit bis zum Ergebnis signifikant beschleunigen und eine kostengünstige Einzeltestung ermöglichen (149). Sogenannte convolutional neural networks lernen anhand von Bildfragmenten (image tiles) digitalisierter Tumorschnitte basierend auf kleinsten Veränderungen des Immunbegleitinfiltrats, des Tumor Microenvironments oder der Tumormorphologie Biomarker wie bspw. Mikrosatelliteninstabilität zu präzisieren (150). Eine kleinere proof-of-concept Analyse konnte den Nutzen bereits für die Prädiktion von CMS

zeigen (151). Das Hauptproblem Deep Learning basierter Diagnostik liegt derzeit noch in der Generalisierbarkeit, da der Lernprozess durch Diversität des Daten-Inputs wie unterschiedliche Färbeprotokolle, Digitalscanner, Tumorstadien etc. optimiert wird und die Datengrundlage oftmals noch nicht existiert (149). Eine weitere, detailliertere Definition molekularer Subtypen verbessert darüber hinaus zwar die Abgrenzung der Subgruppen, erschwert jedoch die Datenharmonisierung (144).

3.2. Therapieoptimierung durch Präzisionsonkologie (2.2., 2.4.)

Präzisionsonkologie beschreibt das patientenzentrierte Vorgehen, basierend auf dem molekularen Tumorprofil, der aktuellen Symptomatik und den Erwartungen des Patienten die korrekte patienten-individuelle Therapie auszuwählen (152).

Am Beispiel der finalen Überlebensanalyse der XELAVIRI-Studie zeigte sich die Wichtigkeit der Integration molekularer Biomarker und Patientencharakteristika im Hinblick auf präzisionsonkologische Therapieoptimierung (123). Der primäre Studienendpunkt war negativ und eine Nicht-Unterlegenheit des sequenziellen gegenüber des initialen Kombinationsarms konnte in der Gesamtpopulation nicht gezeigt werden. Jedoch zeigte sich eine formale Nicht-Unterlegenheit in der molekularen Subgruppe der *RAS*-mutierten Tumore sowie in Patienten mit einem Alter über 70 Jahre. Im Hinblick auf das mediane Erkrankungsalter bildet insbesondere letztere Subgruppe eine realere Behandlungspopulation ab, welche in klinischen Studien oft unterrepräsentiert ist (91, 108). In älteren Patienten verbesserten intensive Kombinationstherapien oft weder das Gesamtüberleben noch das PFS, während weniger intensive Schemata bei höherer Lebensqualität vergleichbare Effektivität aufwiesen (153-156). Die formale Nicht-Unterlegenheit der sequenziellen Therapie in der Subgruppe der *RAS*-mutierten Tumoren widerspricht jedoch dem vormals beschriebenen signifikanten Nutzen einer Therapieintensivierung mit Triplet gegenüber Doublet-Therapie (91, 157). Das mediane Alter lag mit 70 Jahren in der XELAVIRI-Studie allerdings deutlich höher als in TRIBE (61 Jahre) bzw. CAIRO5 (61/65 Jahre) und könnte die Therapie-Verträglichkeit – und damit auch die Effektivität – beeinflusst haben (91, 109, 157).

Durch die erhöhte Sensitivität und breite Erfassung von ganzen Genombereichen durch moderne NGS-Technologie umfasst der Begriff der Präzisionsonkologie vor allem auch die Detektion seltener Alterationen mit Therapierelevanz (51, 109). Praxisrelevante Beispiele umfassen im kolorektalen Karzinom das Vorliegen einer *NTRK*-Fusion, oder Mutationen in der DNA-Polymerase Epsilon *POLE*, die zu einer Steigerung der Gesamt-Tumormutationslast führen und ähnlich immunoreaktiv wirken wie eine Mikrosatelliteninstabilität (76, 158).

Unter Anwendung eines hybrid-capture Sequenzierungsverfahrens suchten wir innerhalb der FIRE-3-Studie gezielt nach neuen Biomarkern mit prognostischer und/oder prädiktiver Relevanz und nutzten die Informationen zur näheren Charakterisierung von Primärtumorlokalisationen. Die Identifikation von okkulten *RAS*-Mutationen durch die höhere Sensitivität des NGS-Verfahrens gegenüber Pyrosequenzierung erklärte das Therapieversagen mancher Patienten unter Studientherapie. Weiterhin konnten wir der Identifikation von prognostisch günstigen *BRAF* Klasse II und III sowie ungünstigen *SMAD4*-Mutationen die Prognose unserer Patienten jenseits der bekannten Biomarker charakterisieren (68, 69, 159, 160). Mit einem einzigartigen, hohen Anteil an *SMAD4*-Mutationen stellten Tumore des Colon transversum möglicherweise eine eigene Entität dar. Eine vorherige Analyse wies transversalen Tumoren bereits eher Merkmale von linksseitigen Primärtumoren zu, obwohl diese den rechtsseitigen Tumoren zugeordnet werden (161). Die anatomisch korrekte Grenze verläuft, bedingt durch die embryonale Entwicklung des Darms, bei den proximalen zwei Drittel des Colon transversum (162). In den retrospektiven Analysen wurde die genaue Position des Tumors innerhalb des transversalen Kolons nicht erfasst, wodurch ein Bias entstanden sein könnte. Die niedrige Fallzahl an transversalen Tumoren erlaubt darüber hinaus keine definitiven Rückschlüsse.

Die präzisionsonkologische Mutationsdiagnostik erfolgt mittlerweile zunehmend über die Regelversorgung der Patient*innen außerhalb klinischer Studien. Die gefundenen Alterationen werden zunächst nach den sog. TIER-Kriterien in Varianten unterschiedlicher klinischer Signifikanz unterteilt und nachfolgend patientenindividuell in einer interdisziplinären molekularen Tumorkonferenz diskutiert. Diese verfolgt das Ziel, die literarische Evidenz für

eine gezielte Inhibition der Alterationen zu recherchieren und Therapieempfehlungen nach verfügbarem Evidenzgrad abzugeben (163). Diese Therapieempfehlungen werden üblicherweise als individueller Heilversuch beantragt. Der Anteil an Patienten, die eine Therapie-Empfehlung und die korrespondierende Therapie erhalten haben, liegt jedoch nur zwischen 12 - 17%, nicht zuletzt bedingt durch das häufig bereits fortgeschrittene Krankheitsstadium zum Zeitpunkt der Analyse (163). Insbesondere im metastasierten KRK erhält aktuell nur etwa jeder dritte Patient eine Therapieempfehlung (163). Die Regelversorgung behindert hierbei jedoch nicht die wissenschaftliche Evaluation. Während die Erfahrungen der einzelnen Zentren mit molekularem Tumorboard die Erfahrungen nutzen können, um die Behandlungsqualität zu verbessern, kann eine Serie von erfolgreichen individuellen Heilversuchen bestimmter Alterationen jedoch auch wieder zur Evaluation innerhalb klinischer Studien führen.

3.3. Longitudinales Biomarker-Monitoring durch Gewebe und Flüssigbiopsie zur Therapieoptimierung (2.5.)

Zunehmend an Bedeutung gewinnt das sog. longitudinale Monitoring von Biomarkern, d.h. die Nachverfolgung bestimmter Biomarker über den Krankheitsverlauf. Diese Biomarker werden entweder direkt im Tumorgewebe oder über sog. Flüssigbiopsien aus liquiden Kompartimenten des Körpers wie Blut, Liquor oder Urin über hochsensitive Verfahren wie bspw. NGS detektiert (130). Die Erfolgsrate der Detektion von Biomarkern im Gewebe ist signifikant höher als im peripheren Blut (163). Damit einher geht jedoch eine gesteigerte Invasivität des Verfahrens für den Patienten. Mit der FIRE-3-Studie wurde bislang eines der größten Kollektive für serielle Tumorbiopsien verglichen. Die Zeitpunkte umfassten Biopsien oder Tumorresektate vor Beginn der Therapie und nach sekundärer Metastasenresektion. Interessanterweise fand sich im überwiegenden Teil des Kollektivs keine Änderung des Mutationsprofils vor und nach der Therapie. Lediglich 30% der mit Cetuximab behandelten Patienten entwickelten Resistenzmutationen. Wir schlussfolgerten daher, dass unser spezielles Kollektiv eine besonders günstige Tumorbiologie aufweisen könnte. Die Wahl des Gewebes für die Diagnostik könnte die Ergebnisse jedoch beeinflusst haben. Obwohl bei dem

überwiegenden Teil der FIRE-3-Population eine synchron metastasierte Erkrankung vorlag, erfolgte die initiale NGS-Diagnostik maßgeblich aus dem Primärtumorgewebe. Durch klonale Evolution während eines fortschreitenden Erkrankungsstadiums könnten demnach bereits zu Beginn der Therapie gravierende Unterschiede zwischen Primarius und Metastase vorgelegen haben (164-166). Sowohl im Hinblick auf die Invasivität als auch auf das Problem der aktuell führenden Treibermutation können Flüssigbiopsien Therapien individuell optimieren. Im kolorektalen Karzinom zeigte sich bereits in frühen Erkrankungsstadien ein Nutzen der postoperativen Detektion von sog. zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA), um das individuelle Rezidivrisiko der Patient*innen zu bestimmen (167). Als früher Biomarker einer Krankheitsprogression ging ein Anstieg der ctDNA dem radiologischen Progress teilweise Wochen voraus (168). Diese Attribute könnten künftig helfen, innerhalb der klinischen Risikogruppen von UICC II KRK zu identifizieren, welche von einer adjuvanten Chemotherapie besonders profitieren (169). Doch auch im Hinblick auf die Präzisionsonkologie des metastasierten KRK zeigte sich die Relevanz von ctDNA. Patienten mit eingeschränktem Allgemeinzustand, die einer invasiven Diagnostik aus eigenem Wunsch oder medizinischen Gründen nicht mehr zuzuführen waren, erhielten hierdurch Zugang zur erweiterten molekularen Diagnostik und Diskussion in molekularen Tumorboards (163). Insbesondere zur Nachverfolgung des *RAS*-Status könnten sich Flüssigbiopsien zukünftig regelhaft etablieren. So bildeten sich die als Resistenzmechanismus einer anti-*EGFR*-Antikörper-Therapie auftretenden *RAS*-Mutationen niedriger Allelfrequenz unter einer anti-*EGFR*-freien Therapie zurück und etablierten die Grundlage für eine erneute anti-*EGFR*-Therapie (170). Des Weiteren zeigte sich, dass auch ein primär *RAS*-mutierter Tumor im Therapieverlauf die führende Treibermutation verlieren kann, sodass in Einzelfällen eine anti-*EGFR*-haltige Therapie erwogen werden könnte (171, 172). Hier sollte jedoch bedacht werden, dass eine nicht detektierbare *RAS*-Mutation auch die Folge einer nicht erfolgreichen Detektion von ctDNA sein kann: ging man zunächst beim Verlust der *RAS*-Mutation von einem Prozentsatz von etwa 30% aus, wurde dieses Ereignis in einer Folgeuntersuchung in maximal 5% der *RAS*-mutierten Tumore beobachtet (173).

Zusammengefasst kann das longitudinale Monitoring von Biomarkern im Tumorgewebe oder Flüssigbiopsien durchaus zur präzisionsonkologischen Therapieoptimierung beitragen. Die Ergebnisse der Untersuchung sollten jedoch immer im Kontext des Tumorheterogenitäts-Modells und unter Kenntnis der Einschränkungen der jeweiligen Untersuchungsmethoden interpretiert werden, um falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse zu vermeiden und sinnvolle individuelle Therapieoptionen für den/die jeweilige Patient*in zu evaluieren.

4. Zusammenfassung

Zusammengefasst erreichte dieses Habilitationsprojekt die vorab definierte Zielsetzung:

Zunächst wurde in einem ersten Schritt die Möglichkeit zur Nutzung der mRNA-Expression einzelner Gene am Beispiel des *EGFR*-Liganden Amphiregulin als prognostischen und prädiktiven Biomarkers für eine gezielte anti-*EGFR*-Antikörpertherapie mit Cetuximab in einer gemeinsamen Analyse dreier randomisierter kontrollierter klinischer Studien nachgewiesen.

Im nächsten Schritt prüften wir die Eignung molekularer Subtypen, die auf mRNA-Expressionssignaturen mehrerer Gene erhoben wurden, als potenzielle Biomarker. Dies gelang am Beispiel der sog. consensus molecular subtypes, die neben der bislang bekannten prognostischen Aussagekraft innerhalb der XELAVIRI-Studie auch Einfluss auf die Sensitivität eines Tumors gegenüber der Therapieintensität in *RAS*-Wildtyp-Tumoren nahmen.

Aus dieser Arbeit wurde ersichtlich, dass zur präzisionsonkologischen Therapieoptimierung neben den molekularen Biomarkern auch weitere Patientencharakteristika wie bspw. das Patientenalter beachtet werden müssen, da eine sequenzielle Therapieeskalation insbesondere in älteren Patienten mit einem medianen Alter über 70 Jahren oder in *RAS*-mutierten Tumoren einer höheren Therapieintensität nicht unterlegen, aber besser verträglich war. Zusätzliche Informationen einer DNA-Sequenzierung könnten darüber hinaus auch zu einem detaillierteren Verständnis des Therapieansprechens im Hinblick auf die Primärtumorlokalisierung beitragen, da transversale Tumore – die eigentlich den rechtsseitigen Primärtumoren zugerechnet werden – potenziell eine eigenständige Entität darstellen könnten.

Weiterhin zeigten wir, dass das longitudinale Monitoring von Biomarkern im Tumorgewebe über den Therapieverlauf Einblicke in die Prognose und Tumorbiologie aufzeigen kann, mit denen möglicherweise künftig Patient*innen identifiziert werden können, welche einer sekundären Metastasen-Resektion und damit Prognoseverbesserung zugeführt werden können.

In dieser Arbeit wurden damit die Grundlagen zur Implementation mRNA-Genexpressions-basierter Biomarker in die klinische Routine geschaffen. Herausforderungen stellen eine lange Prozessdauer und hohe Kosten für die Einzeltestung dar.

Auf Basis dieses Habilitationsprojektes soll daher perspektivisch eine vereinfachte Bestimmung molekularer Subtypen aus Routine-Material der pathologischen Diagnostik, Hämatoxylin & Eosin-gefärbte Tumorschnitte, durch Deep Learning etabliert werden. Zeigt sich hier eine Nicht-Unterlegenheit zur bisherigen mRNA-basierten Diagnostik, können mit diesem Verfahren im Sinne eines präzisionsonkologischen Ansatzes prospektive Studien zur Evaluierung Subtyp-spezifischer Therapien geschaffen werden. Durch translationale Begleitforschungsprogramme im Rahmen dieser Studien kann ein longitudinales Monitoring der molekularen Subtypen und Merkmale mittels sequenzieller Flüssig- und/oder Tumorbiopsien erfolgen und die Therapie von Patienten im Hinblick auf Verträglichkeit und Effektivität optimieren.

5. Literaturangaben

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2021;13:46-9.
3. Cervantes A, Adam R, Rosello S, Arnold D, Normanno N, Taieb J, et al. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2022.
4. American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2020-2022. 2020.
5. Michl M, Thurmaier J, Schubert-Fritschle G, Wiedemann M, Laubender RP, Nussler NC, et al. Brain Metastasis in Colorectal Cancer Patients: Survival and Analysis of Prognostic Factors. *Clin Colorectal Cancer.* 2015;14(4):281-90.
6. Cremolini C, Antoniotti C, Stein A, Bendell J, Gruenberger T, Rossini D, et al. Individual Patient Data Meta-Analysis of FOLFOXIRI Plus Bevacizumab Versus Doublets Plus Bevacizumab as Initial Therapy of Unresectable Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2020:JCO2001225.
7. Arnold D, Lueza B, Douillard JY, Peeters M, Lenz HJ, Venook A, et al. Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. *Ann Oncol.* 2017;28(8):1713-29.
8. Adam R, de Gramont A, Figueras J, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, et al. Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: a multidisciplinary international consensus. *Cancer Treat Rev.* 2015;41(9):729-41.
9. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2008;371(9617):1007-16.
10. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(12):1208-15.
11. Bridgewater JA, Pugh SA, Maishman T, Eminton Z, Mellor J, Whitehead A, et al. Systemic chemotherapy with or without cetuximab in patients with resectable colorectal liver metastasis (New EPOC): long-term results of a multicentre, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(3):398-411.
12. Ruers T, Van Coevorden F, Punt CJ, Pierie JE, Borel-Rinkes I, Ledermann JA, et al. Local Treatment of Unresectable Colorectal Liver Metastases: Results of a Randomized Phase II Trial. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(9).
13. Kobiela J, Szychalski P, Marvaso G, Ciardo D, Dell'Acqua V, Kraja F, et al. Ablative stereotactic radiotherapy for oligometastatic colorectal cancer: Systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;129:91-101.
14. Tree AC, Khoo VS, Eeles RA, Ahmed M, Dearnaley DP, Hawkins MA, et al. Stereotactic body radiotherapy for oligometastases. *Lancet Oncol.* 2013;14(1):e28-37.
15. Martin RC, 2nd, Scoggins CR, Schreeder M, Rilling WS, Laing CJ, Tatum CM, et al. Randomized controlled trial of irinotecan drug-eluting beads with simultaneous FOLFOX and bevacizumab for patients with unresectable colorectal liver-limited metastasis. *Cancer.* 2015;121(20):3649-58.
16. Hendlisz A, Van den Eynde M, Peeters M, Maleux G, Lambert B, Vannoote J, et al. Phase III trial comparing protracted intravenous fluorouracil infusion alone or with yttrium-90 resin microspheres radioembolization for liver-limited metastatic colorectal cancer refractory to standard chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2010;28(23):3687-94.
17. Boige V, Malka D, Elias D, Castaing M, De Baere T, Goere D, et al. Hepatic arterial infusion of oxaliplatin and intravenous LV5FU2 in unresectable liver metastases from colorectal cancer after systemic chemotherapy failure. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(1):219-26.
18. Allard MA, Sebahg M, Baillie G, Lemoine A, Dartigues P, Faitot F, et al. Comparison of complete pathologic response and hepatic injuries between hepatic arterial infusion and systemic administration of oxaliplatin in patients with colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(6):1925-32.
19. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1386-422.

20. Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 2001;19(8):2282-92.
21. Twelves C, Xeloda Colorectal Cancer G. Capecitabine as first-line treatment in colorectal cancer. Pooled data from two large, phase III trials. *Eur J Cancer.* 2002;38 Suppl 2:15-20.
22. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouche O, Etienne PL, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol.* 1997;15(2):808-15.
23. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000;355(9209):1041-7.
24. Patt YZ, Lee FC, Liebmman JE, Diamandidis D, Eckhardt SG, Javle M, et al. Capecitabine plus 3-weekly irinotecan (XELIRI regimen) as first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: phase II trial results. *Am J Clin Oncol.* 2007;30(4):350-7.
25. Maindrault-Goebel F, Louvet C, Andre T, Carola E, Lotz JP, Molitor JL, et al. Oxaliplatin added to the simplified bimonthly leucovorin and 5-fluorouracil regimen as second-line therapy for metastatic colorectal cancer (FOLFOX6). *GERCOR.* *Eur J Cancer.* 1999;35(9):1338-42.
26. Carrato A, Gallego-Plazas J, Guillen-Ponce C. Capecitabine plus oxaliplatin for the treatment of colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8(2):161-74.
27. Cheeseman SL, Joel SP, Chester JD, Wilson G, Dent JT, Richards FJ, et al. A 'modified de Gramont' regimen of fluorouracil, alone and with oxaliplatin, for advanced colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2002;87(4):393-9.
28. Tournigand C, Cervantes A, Figer A, Lledo G, Flesch M, Buyse M, et al. OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-go fashion in advanced colorectal cancer--a GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2006;24(3):394-400.
29. Chibaudel B, Maindrault-Goebel F, Lledo G, Mineur L, Andre T, Bennamoun M, et al. Can chemotherapy be discontinued in unresectable metastatic colorectal cancer? The GERCOR OPTIMOX2 Study. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5727-33.
30. Aparicio T, Ghiringhelli F, Boige V, Le Malicot K, Taieb J, Bouche O, et al. Bevacizumab Maintenance Versus No Maintenance During Chemotherapy-Free Intervals in Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Phase III Trial (PRODIGE 9). *J Clin Oncol.* 2018;36(7):674-81.
31. Goey KKH, Elias SG, van Tinteren H, Lacle MM, Willems SM, Offerhaus GJA, et al. Maintenance treatment with capecitabine and bevacizumab versus observation in metastatic colorectal cancer: updated results and molecular subgroup analyses of the phase 3 CAIRO3 study. *Ann Oncol.* 2017;28(9):2128-34.
32. Hegewisch-Becker S, Graeven U, Lerchenmuller CA, Killing B, Depenbusch R, Steffens CC, et al. Maintenance strategies after first-line oxaliplatin plus fluoropyrimidine plus bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer (AIO 0207): a randomised, non-inferiority, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(13):1355-69.
33. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol.* 2007;25(13):1670-6.
34. Van Cutsem E, Mayer RJ, Laurent S, Winkler R, Gravalos C, Benavides M, et al. The subgroups of the phase III RECURSE trial of trifluridine/tipiracil (TAS-102) versus placebo with best supportive care in patients with metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2018;90:63-72.
35. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.
36. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86(3):353-64.
37. Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors.* 1992;7(1):53-64.
38. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 1993;362(6423):841-4.
39. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997;57(20):4593-9.
40. Hurwitz HI, Yi J, Ince W, Novotny WF, Rosen O. The clinical benefit of bevacizumab in metastatic colorectal cancer is independent of K-ras mutation status: analysis of a phase III study of

bevacizumab with chemotherapy in previously untreated metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2009;14(1):22-8.

41. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. XELOX vs FOLFOX-4 as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: NO16966 updated results. *Br J Cancer*. 2011;105(1):58-64.

42. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007;25(12):1539-44.

43. Bennouna J, Sastre J, Arnold D, Osterlund P, Greil R, Van Cutsem E, et al. Continuation of bevacizumab after first progression in metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(1):29-37.

44. Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J Clin Oncol*. 2012;30(28):3499-506.

45. Tabernero J, Yoshino T, Cohn AL, Obermannova R, Bodoky G, Garcia-Carbonero R, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2015;16(5):499-508.

46. Prigent SA, Lemoine NR. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res*. 1992;4(1):1-24.

47. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3279-90.

48. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):753-62.

49. Van Cutsem E, Lenz HJ, Kohne CH, Heinemann V, Tejpar S, Melezinek I, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(7):692-700.

50. Loupakis F, Ruzzo A, Cremolini C, Vincenzi B, Salvatore L, Santini D, et al. KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(4):715-21.

51. Stintzing S, Miller-Phillips L, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Kiani A, et al. Impact of BRAF and RAS mutations on first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab: analysis of the FIRE-3 (AIO KRK-0306) study. *Eur J Cancer*. 2017;79:50-60.

52. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol*. 2016;27(9):1746-53.

53. Fakih MG, Kopetz S, Kuboki Y, Kim TW, Munster PN, Krauss JC, et al. Sotorasib for previously treated colorectal cancers with KRAS(G12C) mutation (CodeBreak100): a prespecified analysis of a single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2022;23(1):115-24.

54. Weiss J, Yaeger RD, Johnson ML, Spira A, Klempner SJ, Barve MA, et al. LBA6 KRYSTAL-1: Adagrasib (MRTX849) as monotherapy or combined with cetuximab (Cetux) in patients (Pts) with colorectal cancer (CRC) harboring a KRASG12C mutation. *Annals of Oncology*. 2021;32:S1294.

55. Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, Ciardiello F, Heeger S, Schlichting M, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. 2012;48(10):1466-75.

56. von Einem JC, Heinemann V, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, Stauch M, Hass HG, et al. Left-sided primary tumors are associated with favorable prognosis in patients with KRAS codon 12/13 wild-type metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus chemotherapy: an analysis of the AIO KRK-0104 trial. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(9):1607-14.

57. Holch JW, Ricard I, Stintzing S, Modest DP, Heinemann V. The relevance of primary tumour location in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of first-line clinical trials. *Eur J Cancer*. 2017;70:87-98.

58. Salem ME, Weinberg BA, Xiu J, El-Deiry WS, Hwang JJ, Gatalica Z, et al. Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(49):86356-68.
59. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Final results from PRIME: randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(7):1346-55.
60. Kohne CH, Hofheinz R, Mineur L, Letocha H, Greil R, Thaler J, et al. First-line panitumumab plus irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012;138(1):65-72.
61. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, Hotko Y, et al. Final results from a randomized phase 3 study of FOLFIRI {+/-} panitumumab for second-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(1):107-16.
62. Price T, Kim TW, Li J, Cascinu S, Ruff P, Suresh AS, et al. Final results and outcomes by prior bevacizumab exposure, skin toxicity, and hypomagnesaemia from ASPECCT: randomized phase 3 non-inferiority study of panitumumab versus cetuximab in chemorefractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2016;68:51-9.
63. Modest DP, Karthaus M, Fruehauf S, Graeven U, Muller L, Konig AO, et al. Panitumumab Plus Fluorouracil and Folinic Acid Versus Fluorouracil and Folinic Acid Alone as Maintenance Therapy in RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The Randomized PANAMA Trial (AIO KRK 0212). *J Clin Oncol*. 2022;40(1):72-82.
64. Pietrantonio F, Morano F, Corallo S, Miceli R, Lonardi S, Raimondi A, et al. Maintenance Therapy With Panitumumab Alone vs Panitumumab Plus Fluorouracil-Leucovorin in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2019;5(9):1268-75.
65. Yoshino T, Watanabe J, Shitara K, Yasui H, Otori H, Shiozawa M, et al. Panitumumab (PAN) plus mFOLFOX6 versus bevacizumab (BEV) plus mFOLFOX6 as first-line treatment in patients with RAS wild-type (WT) metastatic colorectal cancer (mCRC): Results from the phase 3 PARADIGM trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2022;40(17_suppl):LBA1-LBA.
66. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
67. Margonis GA, Buettner S, Andreatos N, Kim Y, Wagner D, Sasaki K, et al. Association of BRAF Mutations With Survival and Recurrence in Surgically Treated Patients With Metastatic Colorectal Liver Cancer. *JAMA Surg*. 2018;153(7):e180996.
68. Osumi H, Shinozaki E, Wakatsuki T, Suenaga M, Ichimura T, Ogura M, et al. Non-V600E BRAF mutations and EGFR signaling pathway in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2019;145(9):2488-95.
69. Shinozaki E, Yoshino T, Yamazaki K, Muro K, Yamaguchi K, Nishina T, et al. Clinical significance of BRAF non-V600E mutations on the therapeutic effects of anti-EGFR monoclonal antibody treatment in patients with pretreated metastatic colorectal cancer: the Biomarker Research for anti-EGFR monoclonal Antibodies by Comprehensive Cancer genomics (BREAC) study. *Br J Cancer*. 2017;117(10):1450-8.
70. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R, Van Cutsem E, Desai J, Yoshino T, et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E-Mutated Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(17):1632-43.
71. Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol*. 2014;25(5):1032-8.
72. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2509-20.
73. Andre T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(23):2207-18.
74. Le DT, Kim TW, Van Cutsem E, Geva R, Jager D, Hara H, et al. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol*. 2019;JCO1902107.
75. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(8):773-9.
76. Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, Lee J, Tejpar S, Sartore-Bianchi A, et al. ALK, ROS1, and NTRK Rearrangements in Metastatic Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2017;109(12).
77. 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.

78. Drilon A, Siena S, Ou SI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, et al. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov.* 2017;7(4):400-9.
79. Hellyer NJ, Kim MS, Koland JG. Heregulin-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase and Akt via the ErbB2/ErbB3 co-receptor. *J Biol Chem.* 2001;276(45):42153-61.
80. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):738-46.
81. Meric-Bernstam F, Hurwitz H, Raghav KPS, McWilliams RR, Fakhri M, VanderWalde A, et al. Pertuzumab plus trastuzumab for HER2-amplified metastatic colorectal cancer (MyPathway): an updated report from a multicentre, open-label, phase 2a, multiple basket study. *Lancet Oncol.* 2019;20(4):518-30.
82. Siena S, Di Bartolomeo M, Raghav K, Masuishi T, Loupakis F, Kawakami H, et al. Trastuzumab deruxtecan (DS-8201) in patients with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (DESTINY-CRC01): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2021;22(6):779-89.
83. Stintzing S, Modest DP, Rossius L, Lerch MM, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(10):1426-34.
84. Tejpar S, Stintzing S, Ciardiello F, Tabernero J, Van Cutsem E, Beier F, et al. Prognostic and Predictive Relevance of Primary Tumor Location in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: Retrospective Analyses of the CRYSTAL and FIRE-3 Trials. *JAMA Oncol.* 2016.
85. Rivera F, Karthaus M, Hecht JR, Sevilla I, Forget F, Fasola G, et al. Final analysis of the randomised PEAK trial: overall survival and tumour responses during first-line treatment with mFOLFOX6 plus either panitumumab or bevacizumab in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2017;32(8):1179-90.
86. Rossini D, Antoniotti C, Lonardi S, Pietrantonio F, Moretto R, Antonuzzo L, et al. Upfront Modified Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan Plus Panitumumab Versus Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin Plus Panitumumab for Patients With RAS/BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The Phase III TRIPLETE Study by GONO. *J Clin Oncol.* 2022;40(25):2878-88.
87. Modest DP, Martens UM, Riera-Knorrenschild J, Greeve J, Florschütz A, Wessendorf S, et al. FOLFOXIRI Plus Panitumumab As First-Line Treatment of RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The Randomized, Open-Label, Phase II VOLFI Study (AIO KRK0109). *J Clin Oncol.* 2019;37(35):3401-11.
88. Price T, Shen L, Ma B, Esser R, Chen W, Gibbs P, et al. Phase II APEC trial: The impact of primary tumor side on outcomes of first-line cetuximab plus FOLFOX or FOLFIRI in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2019;15(4):225-30.
89. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(17):1609-18.
90. Loupakis F, Hurwitz HI, Saltz L, Arnold D, Grothey A, Nguyen QL, et al. Impact of primary tumour location on efficacy of bevacizumab plus chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2018;119(12):1451-5.
91. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol.* 2015;16(13):1306-15.
92. Tol J, Koopman M, Cats A, Rodenburg CJ, Creemers GJ, Schrama JG, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(6):563-72.
93. Saltz L, Badarinaran S, Dakhil S, Bienvenu B, Harker WG, Birchfield G, et al. Phase III trial of cetuximab, bevacizumab, and 5-fluorouracil/leucovorin vs. FOLFOX-bevacizumab in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.* 2012;11(2):101-11.
94. Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(14):2311-9.
95. Peeters M, Oliner KS, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Ducreux M, et al. Analysis of KRAS/NRAS Mutations in a Phase III Study of Panitumumab with FOLFIRI Compared with FOLFIRI Alone as Second-line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(24):5469-79.
96. Cremolini C, Rossini D, Dell'Aquila E, Lonardi S, Conca E, Del Re M, et al. Rechallenge for Patients With RAS and BRAF Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer With Acquired Resistance to

- First-line Cetuximab and Irinotecan: A Phase 2 Single-Arm Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2019;5(3):343-50.
97. Grothey A, Van Cutsem E, Sobrero A, Siena S, Falcone A, Ychou M, et al. Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2013;381(9863):303-12.
98. Li J, Qin S, Xu R, Yau TC, Ma B, Pan H, et al. Regorafenib plus best supportive care versus placebo plus best supportive care in Asian patients with previously treated metastatic colorectal cancer (CONCUR): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):619-29.
99. Cremolini C, Antoniotti C, Rossini D, Lonardi S, Loupakis F, Pietrantonio F, et al. Upfront FOLFOXIRI plus bevacizumab and reintroduction after progression versus mFOLFOX6 plus bevacizumab followed by FOLFIRI plus bevacizumab in the treatment of patients with metastatic colorectal cancer (TRIBE2): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(4):497-507.
100. Martinelli E, Cremolini C, Mazard T, Vidal J, Virchow I, Tougeron D, et al. Real-world first-line treatment of patients with BRAF(V600E)-mutant metastatic colorectal cancer: the CAPSTAN CRC study. *ESMO Open.* 2022;7(6):100603.
101. Loupakis F, Cremolini C, Salvatore L, Masi G, Sensi E, Schirripa M, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2014;50(1):57-63.
102. Innocenti F, Ou FS, Qu X, Zemla TJ, Niedzwiecki D, Tam R, et al. Mutational Analysis of Patients With Colorectal Cancer in CALGB/SWOG 80405 Identifies New Roles of Microsatellite Instability and Tumor Mutational Burden for Patient Outcome. *J Clin Oncol.* 2019;37(14):1217-27.
103. Shimozaki K, Hirata K, Sato T, Nakamura M, Kato K, Hirano H, et al. WJOG13219G: The Efficacy and Safety of FOLFOXIRI or Doublet plus Anti-VEGF Therapy in Previously Untreated BRAF(V600E) Mutant Metastatic Colorectal Cancer: A Multi-Institutional Registry-Based Study (BRACELET Study). *Clin Colorectal Cancer.* 2022.
104. Stintzing S, Heinrich K, Tougeron D, Modest DP, Schwaner I, Euker J, et al. Randomized study to investigate FOLFOXIRI plus either bevacizumab or cetuximab as first-line treatment of BRAF V600E-mutant mCRC: The phase-II FIRE-4.5 study (AIO KRK-0116). *Journal of Clinical Oncology.* 2021;39(15_suppl):3502-.
105. Van Cutsem E, Huijberts S, Grothey A, Yaeger R, Cuyle PJ, Elez E, et al. Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Safety Lead-In Results From the Phase III BEACON Colorectal Cancer Study. *J Clin Oncol.* 2019;37(17):1460-9.
106. Fischer von Weikersthal L, Schalhorn A, Stauch M, Quietzsch D, Maubach PA, Lambert H, et al. Phase III trial of irinotecan plus infusional 5-fluorouracil/folinic acid versus irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment of advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2011;47(2):206-14.
107. Moosmann N, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, Stauch M, Hass HG, Dietzfelbinger H, et al. Cetuximab plus capecitabine and irinotecan compared with cetuximab plus capecitabine and oxaliplatin as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: AIO KRK-0104--a randomized trial of the German AIO CRC study group. *J Clin Oncol.* 2011;29(8):1050-8.
108. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, Kiani A, Vehling-Kaiser U, Al-Batran SE, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(10):1065-75.
109. Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Decker T, Vehling-Kaiser U, Uhlig J, Schenk M, et al. Sequential Versus Combination Therapy of Metastatic Colorectal Cancer Using Fluoropyrimidines, Irinotecan, and Bevacizumab: A Randomized, Controlled Study-XELAVIRI (AIO KRK0110). *J Clin Oncol.* 2018;JCO1800052.
110. Carpenter BL, Chen M, Knifley T, Davis KA, Harrison SM, Stewart RL, et al. Integrin alpha6beta4 Promotes Autocrine Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Signaling to Stimulate Migration and Invasion toward Hepatocyte Growth Factor (HGF). *J Biol Chem.* 2015;290(45):27228-38.
111. Carpenter BL, Liu J, Qi L, Wang C, O'Connor KL. Integrin alpha6beta4 Upregulates Amphiregulin and Epiregulin through Base Excision Repair-Mediated DNA Demethylation and Promotes Genome-wide DNA Hypomethylation. *Sci Rep.* 2017;7(1):6174.
112. Kuramochi H, Nakajima GO, Hayashi K, Araida T, Yamamoto M. Amphiregulin/epiregulin mRNA Expression and Primary Tumor Location in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2019;39(9):4729-36.
113. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2007;25(22):3230-7.

114. Baker JB, Dutta D, Watson D, Maddala T, Munneke BM, Shak S, et al. Tumour gene expression predicts response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011;104(3):488-95.
115. Jonker DJ, Karapetis CS, Harbison C, O'Callaghan CJ, Tu D, Simes RJ, et al. Epiregulin gene expression as a biomarker of benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(3):648-55.
116. Seligmann JF, Elliott F, Richman SD, Jacobs B, Hemmings G, Brown S, et al. Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2016.
117. Stahler A, Heinemann V, Giessen-Jung C, Crispin A, Schalhorn A, Stintzing S, et al. Influence of mRNA expression of epiregulin and amphiregulin on outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-FU/LV plus irinotecan or irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment (FIRE 1-trial). *Int J Cancer*. 2016;138(3):739-46.
118. Stahler A, Stintzing S, Modest DP, Ricard I, Giessen-Jung C, Kapaun C, et al. Amphiregulin Expression Is a Predictive Biomarker for EGFR Inhibition in Metastatic Colorectal Cancer: Combined Analysis of Three Randomized Trials. *Clin Cancer Res*. 2020;26(24):6559-67.
119. Koopman M, Antonini NF, Douma J, Wals J, Honkoop AH, Erdkamp FL, et al. Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9582):135-42.
120. Seymour MT, Maughan TS, Ledermann JA, Topham C, James R, Gwyther SJ, et al. Different strategies of sequential and combination chemotherapy for patients with poor prognosis advanced colorectal cancer (MRC FOCUS): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370(9582):143-52.
121. Ducreux M, Malka D, Mendiboure J, Etienne PL, Texereau P, Auby D, et al. Sequential versus combination chemotherapy for the treatment of advanced colorectal cancer (FFCD 2000-05): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):1032-44.
122. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2335-42.
123. Stahler A, Modest DP, Fischer von Weikersthal L, Kaiser F, Decker T, Held S, et al. First-line fluoropyrimidine plus bevacizumab followed by irinotecan-escalation versus initial fluoropyrimidine, irinotecan and bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer - Final survival and per-protocol analysis of the randomised XELAVIRI trial (AIO KRK 0110). *Eur J Cancer*. 2022;173:194-203.
124. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.
125. Stintzing S, Wirapati P, Lenz HJ, Neureiter D, Fischer von Weikersthal L, Decker T, et al. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *Ann Oncol*. 2019;30(11):1796-803.
126. Lenz HJ, Ou FS, Venook AP, Hochster HS, Niedzwiecki D, Goldberg RM, et al. Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2019;37(22):1876-85.
127. Mooi JK, Wirapati P, Asher R, Lee CK, Savas P, Price TJ, et al. The prognostic impact of consensus molecular subtypes (CMS) and its predictive effects for bevacizumab benefit in metastatic colorectal cancer: molecular analysis of the AGITG MAX clinical trial. *Ann Oncol*. 2018;29(11):2240-6.
128. Aderka D, Stintzing S, Heinemann V. Explaining the unexplainable: discrepancies in results from the CALGB/SWOG 80405 and FIRE-3 studies. *Lancet Oncol*. 2019;20(5):e274-e83.
129. Stahler A, Heinemann V, Schuster V, Heinrich K, Kurreck A, Giessen-Jung C, et al. Consensus molecular subtypes in metastatic colorectal cancer treated with sequential versus combined fluoropyrimidine, bevacizumab and irinotecan (XELAVIRI trial). *Eur J Cancer*. 2021;157:71-80.
130. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):531-48.
131. Randon G, Maddalena G, Germani MM, Pircher CC, Manca P, Bergamo F, et al. Negative Ultraselection of Patients With RAS/BRAF Wild-Type, Microsatellite-Stable Metastatic Colorectal Cancer Receiving Anti-EGFR-Based Therapy. *JCO Precis Oncol*. 2022;6:e2200037.
132. Stahler A, Stintzing S, von Einem JC, Westphalen CB, Heinrich K, Kramer N, et al. Single-nucleotide variants, tumour mutational burden and microsatellite instability in patients with metastatic colorectal cancer: Next-generation sequencing results of the FIRE-3 trial. *Eur J Cancer*. 2020;137:250-9.
133. Modest DP, Denecke T, Pratschke J, Ricard I, Lang H, Bemelmans M, et al. Surgical treatment options following chemotherapy plus cetuximab or bevacizumab in metastatic colorectal cancer-central evaluation of FIRE-3. *Eur J Cancer*. 2018;88:77-86.

134. Chiorean EG, Nandakumar G, Fadelu T, Temin S, Alarcon-Rozas AE, Bejarano S, et al. Treatment of Patients With Late-Stage Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. *JCO Glob Oncol*. 2020;6:414-38.
135. Modest DP, Heinemann V, Folprecht G, Denecke T, Pratschke J, Lang H, et al. Factors That Influence Conversion to Resectability and Survival After Resection of Metastases in RAS WT Metastatic Colorectal Cancer (mCRC): Analysis of FIRE-3- AIOKRK0306. *Ann Surg Oncol*. 2020;27(7):2389-401.
136. Stahler A, Heinemann V, Holch JW, von Einem JC, Westphalen CB, Heinrich K, et al. Mutational profiles of metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab before and after secondary resection (AIO KRK 0306; FIRE-3). *Int J Cancer*. 2021;149(11):1935-43.
137. Zaidi SH, Harrison TA, Phipps AI, Steinfeld R, Trinh QM, Qu C, et al. Landscape of somatic single nucleotide variants and indels in colorectal cancer and impact on survival. *Nat Commun*. 2020;11(1):3644.
138. Ahmad E, Ali A, Nimisha, Kumar Sharma A, Ahmed F, Mehdi Dar G, et al. Molecular approaches in cancer. *Clin Chim Acta*. 2022;537:60-73.
139. Pentheroudakis G, Kotoula V, De Roock W, Kouvatseas G, Papakostas P, Makatsoris T, et al. Biomarkers of benefit from cetuximab-based therapy in metastatic colorectal cancer: interaction of EGFR ligand expression with RAS/RAF, PIK3CA genotypes. *BMC Cancer*. 2013;13:49.
140. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2005;6(5):279-86.
141. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol*. 2007;25(22):3238-45.
142. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(7):e47.
143. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
144. Joanito I, Wirapati P, Zhao N, Nawaz Z, Yeo G, Lee F, et al. Single-cell and bulk transcriptome sequencing identifies two epithelial tumor cell states and refines the consensus molecular classification of colorectal cancer. *Nat Genet*. 2022;54(7):963-75.
145. Fontana E, Eason K, Cervantes A, Salazar R, Sadanandam A. Context matters-consensus molecular subtypes of colorectal cancer as biomarkers for clinical trials. *Ann Oncol*. 2019;30(4):520-7.
146. Borelli B, Fontana E, Giordano M, Antoniotti C, Bergamo F, Murgioni S, et al. Consensus molecular subtypes and CRCassigner classifications in metastatic colorectal cancer (mCRC): Prognostic and predictive impact in the TRIBE2 study. *J Clin Oncol*. 2020;38:(suppl; abstr 4016).
147. Morris JS, Luthra R, Liu Y, Duose DY, Lee W, Reddy NG, et al. Development and Validation of a Gene Signature Classifier for Consensus Molecular Subtyping of Colorectal Carcinoma in a CLIA-Certified Setting. *Clin Cancer Res*. 2021;27(1):120-30.
148. Ten Hoorn S, Sommeijer DW, Elliott F, Fisher D, de Back TR, Trinh A, et al. Molecular subtype-specific efficacy of anti-EGFR therapy in colorectal cancer is dependent on the chemotherapy backbone. *Br J Cancer*. 2021;125(8):1080-8.
149. Kleppe A, Skrede OJ, De Raedt S, Liestol K, Kerr DJ, Danielsen HE. Designing deep learning studies in cancer diagnostics. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(3):199-211.
150. Kather JN, Pearson AT, Halama N, Jager D, Krause J, Loosen SH, et al. Deep learning can predict microsatellite instability directly from histology in gastrointestinal cancer. *Nat Med*. 2019;25(7):1054-6.
151. Sirinukunwattana K, Domingo E, Richman SD, Redmond KL, Blake A, Verrill C, et al. Image-based consensus molecular subtype (imCMS) classification of colorectal cancer using deep learning. *Gut*. 2021;70(3):544-54.
152. Subbiah V, Kurzrock R. Challenging Standard-of-Care Paradigms in the Precision Oncology Era. *Trends Cancer*. 2018;4(2):101-9.
153. Cunningham D, Lang I, Marcuello E, Lorusso V, Ocvirk J, Shin DB, et al. Bevacizumab plus capecitabine versus capecitabine alone in elderly patients with previously untreated metastatic colorectal cancer (AVEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(11):1077-85.
154. Price TJ, Zannino D, Wilson K, Simes RJ, Cassidy J, Van Hazel GA, et al. Bevacizumab is equally effective and no more toxic in elderly patients with advanced colorectal cancer: a subgroup analysis from the AGITG MAX trial: an international randomised controlled trial of Capecitabine, Bevacizumab and Mitomycin C. *Ann Oncol*. 2012;23(6):1531-6.

155. Cassidy J, Saltz LB, Giantonio BJ, Kabbinavar FF, Hurwitz HI, Rohr UP. Effect of bevacizumab in older patients with metastatic colorectal cancer: pooled analysis of four randomized studies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(5):737-43.
156. Aparicio T, Bouche O, Taieb J, Maillard E, Kirscher S, Etienne PL, et al. Bevacizumab+chemotherapy versus chemotherapy alone in elderly patients with untreated metastatic colorectal cancer: a randomized phase II trial-PRODIGE 20 study results. *Ann Oncol*. 2018;29(1):133-8.
157. Punt CJA, Bond MJG, Bolhuis K, Loosveld O, Helgason HH, Groot JWd, et al. FOLFOXIRI + bevacizumab versus FOLFOX/FOLFIRI + bevacizumab in patients with initially unresectable colorectal liver metastases (CRLM) and right-sided and/or RAS/BRAFV600E-mutated primary tumor: Phase III CAIRO5 study of the Dutch Colorectal Cancer Group. 2022;40(17_suppl):LBA3506-LBA.
158. Domingo E, Freeman-Mills L, Rayner E, Glaire M, Briggs S, Vermeulen L, et al. Somatic POLE proofreading domain mutation, immune response, and prognosis in colorectal cancer: a retrospective, pooled biomarker study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2016;1(3):207-16.
159. Alazzouzi H, Alhopuro P, Salovaara R, Sammalkorpi H, Jarvinen H, Mecklin JP, et al. SMAD4 as a prognostic marker in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(7):2606-11.
160. Mei Z, Shao YW, Lin P, Cai X, Wang B, Ding Y, et al. SMAD4 and NF1 mutations as potential biomarkers for poor prognosis to cetuximab-based therapy in Chinese metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2018;18(1):479.
161. Loree JM, Pereira AAL, Lam M, Willauer AN, Raghav K, Dasari A, et al. Classifying Colorectal Cancer by Tumor Location Rather than Sidedness Highlights a Continuum in Mutation Profiles and Consensus Molecular Subtypes. *Clin Cancer Res*. 2018;24(5):1062-72.
162. LaPointe LC, Dunne R, Brown GS, Worthley DL, Molloy PL, Wattchow D, et al. Map of differential transcript expression in the normal human large intestine. *Physiol Genomics*. 2008;33(1):50-64.
163. Heinrich K, Miller-Phillips L, Ziemann F, Hasselmann K, Ruhlmann K, Flach M, et al. Lessons learned: the first consecutive 1000 patients of the CCCMunich(LMU) Molecular Tumor Board. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2022.
164. Mogensen MB, Rossing M, Ostrup O, Larsen PN, Heiberg Engel PJ, Jorgensen LN, et al. Genomic alterations accompanying tumour evolution in colorectal cancer: tracking the differences between primary tumours and synchronous liver metastases by whole-exome sequencing. *BMC Cancer*. 2018;18(1):752.
165. Kovaleva V, Geissler AL, Lutz L, Fritsch R, Makowiec F, Wiesemann S, et al. Spatio-temporal mutation profiles of case-matched colorectal carcinomas and their metastases reveal unique de novo mutations in metachronous lung metastases by targeted next generation sequencing. *Mol Cancer*. 2016;15(1):63.
166. Schweiger T, Liebmann-Reindl S, Glueck O, Starlinger P, Laengle J, Birner P, et al. Mutational profile of colorectal cancer lung metastases and paired primary tumors by targeted next generation sequencing: implications on clinical outcome after surgery. *J Thorac Dis*. 2018;10(11):6147-57.
167. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2019.
168. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(6):1325-32.
169. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016;8(346):346ra92.
170. Parseghian CM, Loree JM, Morris VK, Liu X, Clifton KK, Napolitano S, et al. Anti-EGFR-resistant clones decay exponentially after progression: implications for anti-EGFR re-challenge. *Ann Oncol*. 2019;30(2):243-9.
171. Raimondi C, Nicolazzo C, Belardinilli F, Loreni F, Gradilone A, Mahdavian Y, et al. Transient Disappearance of RAS Mutant Clones in Plasma: A Counterintuitive Clinical Use of EGFR Inhibitors in RAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(1).
172. Osumi H, Vecchione L, Keilholz U, Vollbrecht C, Alig AHS, von Einem JC, et al. NeoRAS wild-type in metastatic colorectal cancer: Myth or truth?-Case series and review of the literature. *Eur J Cancer*. 2021;153:86-95.
173. Moati E, Blons H, Taly V, Garlan F, Wang-Renault SF, Pietrasz D, et al. Plasma clearance of RAS mutation under therapeutic pressure is a rare event in metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2020;147(4):1185-9.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Sebastian Stintzing, Ärztlicher Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie (CCM) Berlin für die fachärztliche Weiterbildung sowie für die kontinuierliche Förderung wissenschaftlicher Aktivitäten bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Freund und Mentor Professor Dr. med. Dominik Paul Modest, der mich als Doktorand an wissenschaftliche Fragestellung im kolorektalen Karzinom heranführte und seither kontinuierlich, auch nach der Promotion betreute. Durch keine andere Person wurde mir jemals so umfassend Wissen und Begeisterung im Rahmen klinisch-wissenschaftlicher Tätigkeit vermittelt.

Weiterer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Volker Heinemann, der ebenfalls ein wichtiger Mentor in meiner wissenschaftlichen Laufbahn war und als Doktorvater und Arbeitsgruppenleiter mein wissenschaftliches Fortkommen stets unterstützte. Durch ihn lernte ich das Hinterfragen des bekannten Wissens und die Entwicklung neuer Ideen, und wie wichtig Nachwuchsförderung für die Wissenschaft ist.

Meiner – mittlerweile standort-übergreifenden – Arbeitsgruppe aus Berlin und München möchte ich ebenfalls meinen Dank für die Unterstützung an Projekten ausdrücken: Dr. med. Kathrin Heinrich, Dr. med. Annika Kurreck, Dr. med. Greta Sommerhäuser, Dr. med. Annabel Helga Sophie Alig, Dr. med. C. Benedikt Westphalen, Dr. med. Laura Elisabeth Fischer, Dr. med. Lena Weiss, Dr. med. Jobst von Einem, PD Dr. med. Christoph Schulz, PD Dr. med. Marlies Michl, PD Dr. med. Michael Haas und Professor Dr. med. Stephan Boeck. Weiterhin danke ich meinen motivierten Doktorand*innen Veronika Schuster, Beeke Hoppe und Andreas Jay Kind für die Mitarbeit an unseren Projekten.

Frau Dr. Ingrid Ricard und Frau Swantje Held danke ich für die fortwährende statistische Betreuung, selbst bei schwierigen Fragestellungen und komplexen Daten.

Der Studienzentrale AG Onkologie in München möchte ich für ihr Engagement in der Datenverarbeitung und –sammlung danken.

Insbesondere danke ich Herrn Professor Dr. rer. nat. Andreas Jung und Herrn Dr. rer. nat. Jörg Kumbrink für die Begleitung von DNA- wie mRNA-Analytik sowie deren Unterstützung bei der Betreuung von Doktoranden, Herrn Professor Dr. med. Thomas Kirchner für die Kooperation der Pathologie in wissenschaftlichen Fragestellungen und ganz besonders Herrn Professor Dr. med. Jens Neumann für die Einführung in immunhistochemische Analysen und unkomplizierte, stets freundliche Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich auch allen Studienzentren, Prüfärzten und Patienten der klinischen Studien FIRE-1, FIRE-3, CIOX und XELAVIRI danken, die durch Ihren unermüdlichen Einsatz und Teilnahme diese Arbeiten überhaupt erst möglich machten.

Ich danke meiner Ehefrau, Julia Stahler, für ihre Unterstützung in jedweder Lebenslage.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....
Datum

.....
Unterschrift