

De betekenis van *EML4-ALK*-translocaties bij het niet-kleincellig longcarcinoom: mogelijkheden tot behandeling

The role of *EML4-ALK* translocations in non-small cell lung carcinoma: treatment opportunities

Auteurs T.J.N. Hiltermann, J. Sietsma, E.M.D. Schuurin en H.J.M. Groen

Trefwoorden *EML4-ALK*-translocatie, niet-kleincellig longcarcinoom, therapie

Key words *EML4-ALK* translocation, non-small cell lung carcinoma, treatment

Samenvatting

EML4-ALK-translocaties komen voor bij niet-rokende patiënten met een adenocarcinoom van de long en in het bijzonder bij de groep zonder *EGFR*-mutaties, waarbij het percentage van voorkomen tot 25% kan oplopen. Patiënten met deze translocatie op chromosoom 2 reageren goed op 'targeted' therapie, waarmee momenteel klinisch onderzoek wordt gedaan.

(*Ned Tijdschr Oncol* 2010;7:64-7)

Summary

EML4-ALK translocations occur mainly in non-smoking patients with adenocarcinoma of the lung. This translocation only occurs in patients without *EGFR* mutations and in this subpopulation occurrence is up to 25%. Patients with *EML4-ALK* translocation have high tumor response rates when treated with targeted therapy.

Inleiding

Longkanker is een van de meest voorkomende fatale ziekten onder de kwaadaardige aandoeningen. Longkanker wordt onderverdeeld in kleincellig longcarcinoom ('small cell lung carcinoma'; SCLC) en niet-kleincellig longcarcinoom (NSCLC). Deze ziekten komen respectievelijk bij ongeveer 15 en 85% voor. Het NSCLC wordt onderverdeeld in 3 subtypes: plaveiselcelcarcinoom, adenocarcinoom, en als er in de tumorcellen geen differentiatiekenmerken worden gevonden, grootcellig longcarcinoom. Voor de eerstelijnsbehandeling worden platinum bevattende doubletten voorgeschreven, waarmee een mediane overleving van 7,4 tot 9,9 maanden wordt bereikt. Toevoeging van bevacizumab (anti-VEGF) aan paclitaxel en platinumchemotherapie verlengt de mediane overleving tot 12,5 maanden. Voor de tweedelijnsbehandeling zijn 3 middelen goedgekeurd, te weten docetaxel, pemetrexed (antifolaatmetabolië)

en erlotinib (tyrosinekinaseremmer). De progressievrije overleving met deze middelen is minder dan 3 maanden, waarbij met erlotinib aanzienlijk minder en mildere bijwerkingen worden gezien.

De laatste jaren is een heel scala tyrosinekinasereceptoren ontdekt. Deze tyrosinekinasereceptoren zijn oncogen als ze constitutioneel geactiveerd zijn door bijvoorbeeld een puntmutatie, amplificatie of herrangschikking van het betrokken gen. Bij NSCLC zijn somatische mutaties in het *K-Ras*-gen, en de activerende of resistentie bevorderende mutaties in het *EGFR*-gen de bekendste voorbeelden hiervan. De meest voorkomende genetische veranderingen in het kankergenoem zijn chromosomale translocaties. Ze zijn niet alleen beschreven bij hematologische maligniteiten, maar recentelijk ook bij wekedelentumoren, prostaatkanker en NSCLC. In het Universitair Medisch Centrum Groningen worden

momenteel standaard bij adenocarcinomen *K-Ras*- en *EGFR*-mutaties bepaald op tumorweefsel van patiënten. De vraag doet zich voor of dat bij alle patiënten met een NSCLC moet plaatsvinden, omdat het vinden van mutaties therapeutische gevolgen heeft.

Het anaplastisch lymphoma kinase (ALK)-receptor-tyrosinekinase is geïdentificeerd als een lid van de insulinerceptorsubfamilie van de tyrosinekinasereceptoren. Het ALK-eiwit kan voorkomen als een fusieproduct met bijvoorbeeld 'nucleophosmin' (NPM) bij bepaalde lymfomen of 'echinoderm microtubulegeassocieerd protein-like 4' (*EML4*) bij NSCLC. Ten slotte zijn er activerende puntmutaties in *ALK* ontdekt bij onder andere neuroblastomen.

In 2007 werd *EML4-ALK*-translocatie ontdekt in NSCLC-cellijnen en humaan tumormateriaal als een inversie in de korte arm van chromosoom 2 (p21p23). Deze leidde tot een fusiegen bestaande uit exon 1-13 van het *EML4*-gen en de exonen 20-29 van het *ALK*-gen.¹ In een aantal studies worden verschillende fusievarianten beschreven die alle hetzelfde katalytisch actieve ALK-kinasedomein bevatten, gefuseerd met wisselende *EML4*-varianten.² Hoewel *EML4* de meest voorkomende fusiepartner is van *ALK* bij longkanker, zijn er ook andere fusiepartners beschreven. Zeldzame fusiepartners van *ALK* bij longkanker zijn het TRK-gefuseerde *TFG*- of *KIF5B*-gen.^{3,4} Verschillende studies tonen de oncogene werking van het *EML4-ALK*-fusieproduct. Expressie van het fusieproduct resulteerde in de morfologische transformatie van NIH3T3-fibroblasten en de vorming van tumornodi na subcutane inoculatie in naakte muizen. Verder ontwikkelden *EML4-ALK*-transgene muizen in de epitheelcellen van de alveoli enkele weken na de geboorte veel nodulaire adenocarcinomen met 100% penetrantie. En tot slot bleek dat behandeling met ALK-remmers leidde tot regressie van deze tumoren.

Het humane *ALK*-gen codeert voor een eiwit van 1.620 aminozuren, 180 kDa en na posttranslationale glycosering 220 kDa. Het *ALK*- en *EML4*-gen zijn in tegenovergestelde richtingen georiënteerd op chromosoom 2 en liggen 12,7 megabasen uit elkaar. De functie van ALK is niet geheel duidelijk; het lijkt betrokken bij de vorming van de darmmusculatuur en neuronen van het visuele systeem. Er wordt verondersteld dat de heparine bindende liganden voor ALK pleiotrophin en midkine zijn. In *ALK*-

knock-outmuizen zijn, behoudens subtiele neurocognitieve veranderingen, geen afwijkingen te zien. *EML4* is essentieel voor de vorming van microtubules in de cel.

Diagnostiek

ALK-genherrangschikkingen en resulterende fusieproducten worden gedetecteerd in tumorweefsel met immunohistochemische kleuringen, RT-PCR en fluorescente in-situhybridisatie (FISH). Het ALK-1-antilichaam wordt gebruikt om ALK aan te tonen in lymfomen en inflammatoire myofibroblastische tumoren (pseudotumoren), maar is minder betrouwbaar bij longtumoren.⁵ RT-PCR is de meest gebruikte screeningsmethode. Multiplexassays detecteren alle fusievarianten tussen *EML4* en *ALK*, maar nieuwe fusiepartners worden vooralsnog niet gedetecteerd met de beschikbare RT-PCR. Voor de detectie van deze inversie met behulp van FISH is een commerciële 'dual color break-apart probe kit' van Abbott Molecular beschikbaar. Deze kit bestaat uit een rood en een groen gelabelde FISH-probe die het breukgebied in *ALK* flankeren. Omdat de *EML4*- en *ALK*-loci maar 12,7 Mb van elkaar liggen op 2p en de inversie vaak met een deletie bij het *ALK* 5' breekpunt ligt, kan de interpretatie van een translocatie in formaline gefixeerd en paraffine ingebed tumorweefsel moeilijk zijn.² Daarom zijn goede controles belangrijk.

Voorkomen

De incidentie onder verschillende etnische bevolkingsgroepen in gearcheveerd NSCLC-tumormateriaal varieert van 2 tot 7%, met een gemiddelde van 3,5%. De prevalentie van *EML4-ALK*-inversies wordt in de Verenigde Staten op 6.000 patiënten per jaar geschat. Het overgrote deel wordt gezien bij patiënten met een adenocarcinoom die weinig of niet roken. Toch zijn er ook onderzoeken die het verband met niet-roken niet kunnen bevestigen. Daarnaast komt *EML4-ALK* nauwelijks voor samen met puntmutaties in *EGFR*, *HER2* of *K-Ras*, wat erop wijst dat het om een onderscheiden ziektebeeld gaat, waarin *ALK* de oncogene 'driver' is. Zo hebben niet-rokende patiënten met een adenocarcinoom die geen *K-Ras*- of *EGFR*-mutatie hebben, ongeveer 25% kans op een *EML4-ALK*-translocatie.

ALK-positieve NSCLC-patiënten zijn in het algemeen jonger dan patiënten zonder een *ALK*-inversie en reageren merendeels niet op *EGFR*-

Aanwijzingen voor de praktijk

1. *EML4-ALK*-translocaties in chromosoom 2 komen voornamelijk voor bij niet-rokende patiënten met een adenocarcinoom van de long.
2. *EML4-ALK*-translocaties en *EGFR*-mutaties sluiten elkaar uit.
3. *EML4-ALK*-translocaties worden opgespoord met behulp van fluorescente in-situhybridisatie, waarvoor onder andere een commerciële 'dual color break-apart probe'-kit beschikbaar is.
4. Patiënten met dergelijke translocaties vertonen een hoge tumorrespons na behandeling met een specifieke ALK-remmer.

remmers, maar vertonen dezelfde respons op chemotherapie als patiënten met een wildtype *EGFR*-tumor.⁶

Behandeling

TAE684 is een 'small molecule' ALK-remmer. In cellijnen remt het de groei en induceert het apoptose in *H3122* en *EML4-ALK* bevattende NSCLC-cellen. Ook werd regressie van tumoren gezien in xenografts.⁷ PF-02341066 is een andere ALK-remmer, eerst ontwikkeld als een ATP-competitieve remmer van MET (ook 'hepatocyte growth factor receptor' (HGFR) genoemd), maar bleek ook een remmer te zijn van ALK-tyrosinekinases en zijn mutanten of fusievarianten. Het remt op een dosisafhankelijke manier de fosforylering en kinase-afhankelijke functies van bovengenoemde receptoren. Het geeft een selectieve groeiremming van tumorcellen met een amplificatie van *cMet/HGFR*-gen of een translocatie dan wel een inversie van het *ALK*-gen. PF-02341066 liet een duidelijk antitumoreffect zien in xenografts van humane tumoren in muizen met activerende *cMet/HGFR* of *NPM-ALK*-fusieproduct. In een fase I-studie bij 29 evalueerbare patiënten met een NSCLC en een *ALK*-genherschikking, vastgesteld met de eerder genoemde 'break-apart FISH-probe', werd met PF-02341066 (aanbevolen dosis van 2 maal daags 250 mg) bij 17 van de 29 patiënten een partiële respons gezien. Daarnaast hadden 7 patiënten langere tijd stabiele ziekte. Vanwege deze bemoedigende resultaten zal binnenkort een fase III-studie starten om het effect van deze ALK-remmer met tweedelijns chemotherapie te vergelijken bij *ALK*-positieve NSCLC-patiënten. Verschillende Nederlandse centra zullen in deze studie participeren. Om deel te

nemen aan deze studie dient de translocatie met de specifieke test van Abbott Molecular te worden bepaald.

Conclusie

Patiënten met adenocarcinoom zonder *EGFR*-mutatie dienen getest te worden op een *EML4-ALK*-translocatie. Indien deze chromosomale afwijking gevonden wordt, kunnen deze patiënten verwezen worden voor behandeling in het kader van een vergelijkende studie naar de effectiviteit van dit middel ten opzichte van chemotherapie.

Referenties

1. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448:561-6.
2. Lin E, Li L, Guan Y, Soriano R, Rivers CS, Mohan S, et al. Exon array profiling detects *EML4-ALK* fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Res* 2009;7:1466-76.
3. Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Multiplex reverse transcription PCR screening for *EML4-ALK* fusion transcripts. *Clin Cancer Res* 2008; 14:6618-24.
4. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 2007;131:1190-1203.
5. Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, Pettirossi V, Navarro A, Conte D, et al. *EML4-ALK* rearrangements in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *Am J Pathol* 2009;174:661-70.
6. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR,

Costa DB, Heist RS, et al. *Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK.* *J Clin Oncol* 2009;27:4247-53.

7. Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, et al. *EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer.* *Clin Cancer Res* 2008; 14:4275-83.

8. Kwak EL, Camidge DR, Clark J, Shapiro GI, Maki RG, Ratain MJ, et al. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2009; 27:abstract 3509.

Ontvangen 18 januari 2010, geaccepteerd 12 februari 2010.

Correspondentieadres

Dhr. dr. T.J.N. Hiltermann, longarts
Dhr. prof. dr. H.J.M. Groen, longarts

Universitair Medisch Centrum Groningen
Afdeling Longziekten
Postbus 30.001
9700 RB Groningen
Tel.: 050 361 61 61
E-mailadres: h.j.m.groen@long.umcg.nl

Mw. dr. J. Sietsma, patholoog
Dhr. dr. E.M.D. Schuurin, moleculair bioloog

Afdeling Pathologie

Correspondentie graag richten aan dhr. prof. dr. H.J.M. Groen.

Belangenconflict: geen gemeld.
Financiële ondersteuning: geen gemeld.