

# ALKimia: transmutaciones del cáncer de pulmón

ALKchemy: transmutations of lung cancer

► Andrés Felipe Cardona<sup>1,2</sup>, Noemí Reguart<sup>3</sup>, Pilar Archila<sup>2</sup>, Carlos Vargas<sup>1,2</sup>, Hernán Carranza<sup>1,2</sup>, Jorge Miguel Otero<sup>1,2</sup>, Ludovic Reveiz<sup>4</sup>, Henry Becerra<sup>1</sup>, Andrés Acevedo<sup>5</sup>, Diana Torres<sup>2,6</sup>, Silvia Serrano<sup>2</sup>, July Katherine Rodríguez<sup>2</sup>, Leonardo Rojas<sup>7</sup>, Orlando Ricaurte<sup>8</sup>, Mauricio Cuello<sup>9</sup>, Óscar Arrieta<sup>7,10</sup>

<sup>1</sup>Grupo Oncología Clínica y Traslacional, Instituto de Oncología, Fundación Santa Fe de Bogotá (Bogotá, Colombia).

<sup>2</sup>Fundación para la Investigación Clínica y Molecular Aplicada del Cáncer (FICMAC); investigador asociado ONCOLGroup.

<sup>3</sup>Departamento de Oncología Médica, Sección Oncología Torácica, Hospital Clínico y Provincial de Barcelona (Barcelona, España).

<sup>4</sup>Red Iberoamericana de la Colaboración Cochrane.

<sup>5</sup>Grupo Hematología y Trasplante de Médula Ósea, Instituto de Oncología, Fundación Santa Fe de Bogotá (Bogotá, Colombia).

<sup>6</sup>Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia).

<sup>7</sup>Departamento de Oncología Médica, Instituto Nacional de Cancerología de México (INCAN) (México D.F., México).

<sup>8</sup>Departamento de Patología, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia).

<sup>9</sup>Departamento Básico de Medicina, Hospital de Clínicas Universidad de la República (UdelaR) (Montevideo, Uruguay).

<sup>10</sup>Clinica de Oncología Torácica y Laboratorio de Oncología Experimental, Instituto Nacional de Cancerología de México (INCAN) (México D.F., México).

## Resumen

Los rearrreglos del gen con actividad quinasa del linfoma anaplásico (ALK) ocurren infrecuentemente en el cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) y constituyen un paradigma para la terapia dirigida contra oncogenes conductores en esta enfermedad. El crizotinib, un inhibidor del ALK disponible por vía oral, ofrece ventajas significativas para los pacientes positivos con toxicidad leve y beneficio clínico, motivos por los que fue aprobado para uso clínico en un subgrupo del cáncer de pulmón definido molecularmente. En la actualidad, se están desarrollando múltiples inhibidores del ALK dirigidos a maximizar la respuesta en presencia de menos efectos adversos, al igual que a controlar los mecanismos de resistencia subyacentes. Esta información permitirá optimizar en el futuro el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón ALK positivo.

**Palabras clave:** cáncer de pulmón de célula no pequeña, mutaciones, gen de fusión, PCR, FISH, ALK, tratamiento.

## Abstract

Rearrangements of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene occur infrequently in non-small cell lung cancer (NSCLC), but provide an important paradigm for oncogene-directed therapy in this disease. Crizotinib, an orally bioavailable inhibitor of ALK, provides significant benefit for patients with ALK-positive (ALK+) NSCLC in association with characteristic, mostly mild, toxic effects, and this drug has been approved for clinical use in this molecularly defined subgroup of lung cancer. Many new ALK inhibitors are being developed and understanding the challenges of determining and addressing the adverse effects that are likely to be ALK specific, while maximizing the time of benefit on targeted agents, and understanding the mechanisms that underlie drug resistance will be critical in the future for informing the optimal therapy of ALK positive NSCLC.

**Key words:** Non-small cell lung cancer, mutations, fusion gene, PCR, FISH, ALK, treatment.

## Introducción

El cáncer de pulmón supone uno de los retos sanitarios de mayor envergadura a nivel global, en especial, cuando 1 de cada 8 neoplasias nuevas se originan en este órgano y fallecen por la enfermedad más de 1.1 millones de personas al año<sup>1,2</sup>. En América Latina, se diagnostican 93.000 casos incidentes, dentro de los que el carcinoma de pulmón de célula no pequeña

(CPCNP) representa cerca del 82% y el adenocarcinoma constituye su histotipo dominante<sup>3</sup>. En nuestro entorno, se esperan cerca de 16.000 casos de pacientes con CPCNP que presentan mutaciones en el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), una cifra similar para KRAS y alrededor de 2.400 casos de sujetos con la fusión génica ALK/EML4 (datos no publicados).

En la última década, se han producido múltiples cambios en el abordaje diagnóstico y terapéutico del

### DATOS DE CONTACTO

**Correspondencia:** Andrés Felipe Cardona, MD, MSc, PhD. Grupo Oncología Clínica y Traslacional, Instituto de Oncología, Fundación Santa Fe de Bogotá (Bogotá, Colombia). Calle 119 N° 7-75. Teléfono: (+571) 603 0303 ext. 5227.

**Declaración de conflictos de interés:** Carlos Alberto Vargas trabaja como asesor externo de productos Roche S.A. y Andrés Felipe Cardona recibió en el pasado un estipendio de Laboratorios Pfizer S.A., Productos Roche S.A. y Boehringer Ingelheim.

**Fecha de recepción:** 5 de marzo del 2012. **Fecha de aceptación:** 18 de abril del 2012.

CPCNP, entre los que destaca la identificación y el reconocimiento de biomarcadores útiles para seleccionar intervenciones en pacientes con enfermedad avanzada. Después de genotipificar más del 50% de los elementos conductores de la enfermedad, se ha reconocido la relevancia de las alteraciones en el KRAS, EGFR, ALK/EML4, BRAF, PI3K, HER2, FGFR4, LKB1, MEK1, ROS y MET, algunas con características patológicas, clínicas y étnicas bien elucidadas.

El ALK (*anaplastic lymphoma kinase*, CD246, NBLCT3) es un gen que codifica un receptor de tirosina quinasa que pertenece a la superfamilia de los receptores de insulina, el cual parece estar implicado en el desarrollo primitivo del sistema nervioso central y genera una proteína transmembrana de 1620 (180 kDa) aminoácidos formada por un dominio extracelular que incluye un péptido señal aminoterminal y un segmento intracelular con un espacio yuxtamembranoso que acoge el lugar de unión para el sustrato 1 del receptor y un dominio carboxiterminal.

El receptor se identificó por primera vez en 1994 como parte de la traslocación T (2;5) asociada a la mayoría de los linfomas anaplásicos de células grandes<sup>4,5</sup>; su identidad se reveló gracias a la creación de una proteína quimérica vía traslocación entre cromosomas (2;5) (p23;q35), que generó una proteína de fusión NPM (nucleofosmina)-ALK. Las características globales del receptor no se conocieron hasta 1997 cuando se determinó que la región extracelular contiene una combinación única de dominios conocidos como MAM (*meprin, A5 protein and receptor protein tyrosine phosphatase mu*) y LDLa (*low-density lipoprotein class A*)<sup>6,7</sup>.

Desde entonces, se han publicado más de 60 artículos que referencian la importancia de las alteraciones en este gen, asociadas con el desarrollo de patologías como el CPCNP (≈5%), el tumor miofibroblástico inflamatorio (50%), los linfomas cutáneos (2%-30%), el neuroblastoma (6%-8%), el cáncer de tiroides (6%), el cáncer de mama (2%-4%) y el carcinoma de esófago (≈1%)<sup>8-11</sup>. En paralelo, se han diseñado y evaluado inhibidores del ALK de origen natural como las estauroporinas o los inhibidores de la HSP90 (*hit shock protein 90*), que no son específicos ni potentes; posteriormente, se incluyeron nueve subtipos diferentes de moléculas sintéticas pequeñas, entre ellas las aminopirimidinas (crizotinib), diaminopirimidinas (CEP-28122), piridisoquinolinas (F91873 y F91874), pirrolopirasoles

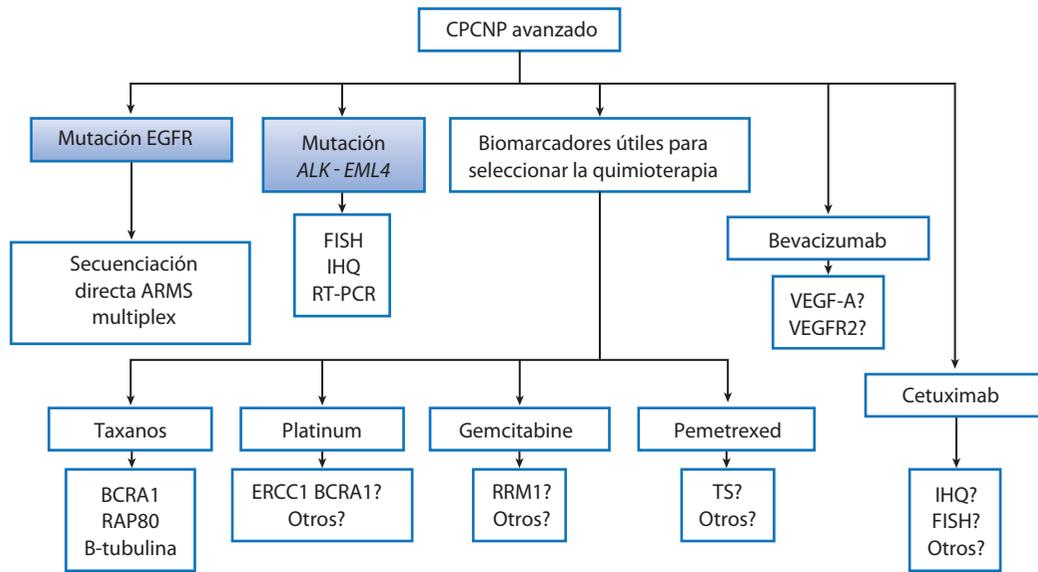
(PHA-E429), indolocarbasones (CEP-14083 y CEP-14513), una pirrolopirimidina (GSK1838705A), una dianilino-pirimidina (NVP-TAE684) y dos moléculas sin estructura claramente definida (AP26113 y X276)<sup>12-15</sup>.

La gran mayoría de la investigación se encuentra concentrada en los inhibidores de primera generación, en especial, el crizotinib, compuesto que inició su desarrollo en el año 2005 y la evaluación en seres humanos un año después (estudio PROFILE 1001). En agosto del 2011, la Federal Drug Administration (FDA, EE. UU.) aprobó el uso regular del crizotinib y la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) incluyó la evaluación regular de la alteración genética, al igual que su manipulación<sup>16,17</sup>. Recientemente, Gandara describió un nuevo nomograma para estratificar a los pacientes con CPCNP, incluyendo diversas alternativas terapéuticas dirigidas según biomarcadores predictivos (figura 1). A continuación, se exponen las características biológicas, moleculares y clínicas del ALK en pacientes con CPCNP, así como las intervenciones enfocadas a controlar su oncogenicidad.

## ALK en cáncer

En los mamíferos, incluyendo al hombre, se han encontrado diferentes ligandos capaces de activar el desarrollo neural, la migración celular, la supervivencia, los rearrreglos del citoesqueleto y la angiogénesis vía ALK<sup>18,19</sup>. Los más importantes son la pleiotropina (PTN), el OSF-1 (*osteoblast specific factor-1*), el HARP (*heparin affinity regulatory peptide*), el HBNF (*heparin binding neurotrophic factor*) y la MK (*midkine*). El PTN y la MK son los más relevantes en el curso de la evolución de múltiples especies y activan otras vías de señalización asociadas a la transformación de las neoplasias, entre ellas el adenocarcinoma de pulmón, la cascada RPTP (*receptor protein tyrosine phosphatase*), la N-sindecan, el LRP y las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 1$ .

El aumento en la proliferación seguido de la activación del ALK también puede ser dependiente de la acción del dímero PKB (*protein kinase B*)-AKT, que implica como blanco al PI3K. También se ha observado que el ALK es capaz de oponer la apoptosis vía MAPK y modular diferentes procesos metabólicos relacionados con el IRS1 (*IR substrate-1*), el JAK3/STAT3, y con la activación del NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) (figura 2)<sup>20-26</sup>.



Modificado con autorización Gandara D. Role of current prognosis and predictive biomarkers in development of new lung cancer therapies; presentado el 4 de julio de 2011 durante el Congreso Mundial de Cáncer de Pulmón realizado en Amsterdam, Holanda.

Figura 1. Biomarcadores en cáncer de pulmón de célula no pequeña.

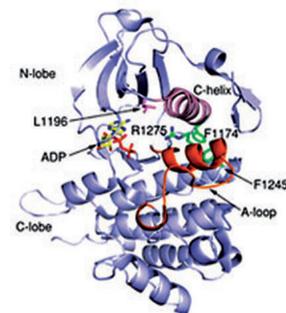
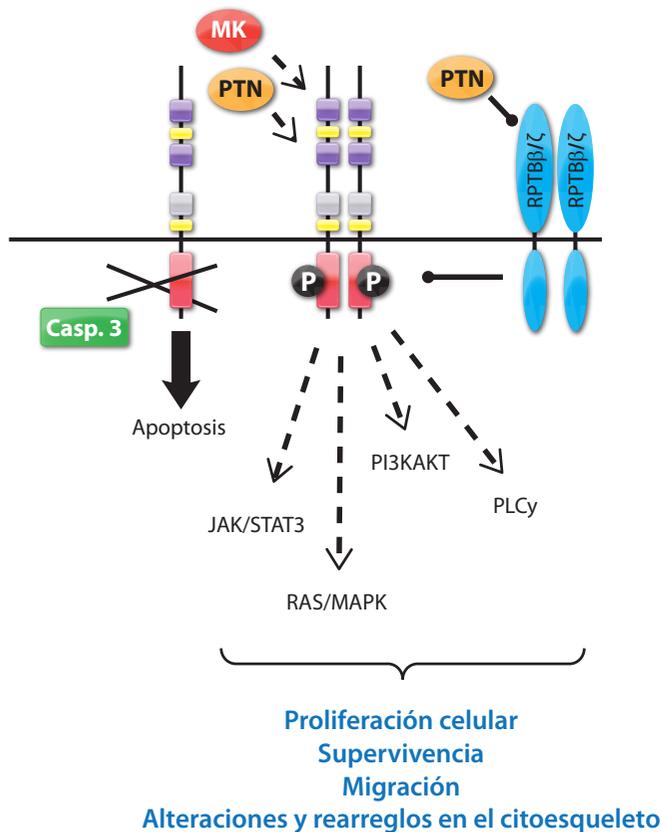


Figura 2. Señalización dependiente de la vía ALK.

El ALK se expresa en el sistema nervioso de los seres humanos y en la musculatura visceral del tracto gastrointestinal durante la embriogénesis, y en menor proporción después del nacimiento. Estudios de inmunohistoquímica han encontrado reactividad leve en algunos componentes del sistema nervioso (hipocampo y región parahipocámpal), el intestino delgado y la próstata<sup>27</sup>. En el CPCNP, la gran mayoría de las alteraciones se asocian con el gen EML4 (*human homolog of echinoderm microtubule-associated gene*), que codifica una proteína citoplasmática de 120 kDa esencial para la formación de microtúbulos y compuesta por una región básica N-terminal, un dominio HELP y cuatro repeticiones WD en el extremo C-terminal<sup>29,30</sup>.

A pesar de que la mayoría de las fusiones génicas en CPCNP se dan con el EML4, al menos dos acompañantes raros, pero notables, han sido descritos en el pasado; el KIF5B y el TFG constituyen rearrreglos capaces de aumentar los niveles de expresión de la proteína y de modificar la localización subcelular del elemento anormal, que finalmente puede activar la proliferación celular; no obstante, su significado clínico es desconocido<sup>31,32</sup>.

## Métodos para la detección

Los rearrreglos génicos del ALK resultan en diversas fusiones proteicas que pueden ser detectadas en el tejido tumoral utilizando inmunohistoquímica, RT-PCR, FISH (*VYSIS ALK break apart FISH probe KIT*) y CISH<sup>33-37</sup>. Recientemente, Kudo y colaboradores describieron la utilidad de la plataforma MassARRAY para detectar la fusión ALK/EML4 en ARN obtenido de suero de pacientes con CPCNP<sup>38</sup>. De forma similar, Kanaji y Papadopoulou refirieron el uso de Multiplex RT-PCR para detectar los transcritos de las variantes 1 a 7 en mínimas cantidades (hasta un microgramo de ARN) en muestras obtenidas por citología durante broncoscopia<sup>39,40</sup>.

El anticuerpo ALK1, útil para la detección del linfoma anaplásico y de los tumores miofibrolásticos inflamatorios, no ha demostrado suficiente rendimiento para identificar las diversas variantes génicas relacionadas con el cáncer de pulmón<sup>41</sup>. Sin embargo, múltiples estrategias se han propuesto para mejorar la eficacia de la inmunohistoquímica, incluyendo la amplificación de la señal con tiramida y la intercalación del anticuerpo con un potenciador polimérico<sup>31,42</sup>. En el 2010, Mino-Kenudson y colaboradores analizaron

174 tumores con un monoclonal estándar y dos novedosos dirigidos a reconocer la expresión proteica del ALK. La sensibilidad y especificidad del clon D5F3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, United States) versus la detección por FISH (VYSIS KIT) fue del 100% y 99%, respectivamente.

De igual forma, el acuerdo interobservador realizado en secuencia a los patólogos participantes fue del 94%, hallazgos de gran interés para facilitar la evaluación masiva de las mutaciones en los pacientes con adenocarcinoma de pulmón<sup>43</sup>. Dicha información fue confirmada posteriormente por Mitsudomi y cuestionada por Just, quien encontró una tasa de reproducibilidad para el FISH del 60%, proporción inferior a lo descrito, y explicada por la calidad de la fijación y la posibilidad de extraer material génico potencialmente analizable<sup>44,45</sup>. Bajo la óptica del material escaso (alrededor del 40% de los pacientes), parece clara la inclusión de estrategias mixtas que contemplen el cribado rápido con inmunohistoquímica y la confirmación con RT-PCR<sup>46</sup>.

A corto plazo, el desarrollo de nuevas técnicas propone la identificación de los rearrreglos génicos basales y de las mutaciones de resistencia en muestras hipocelulares obtenidas, incluso, de saliva<sup>47</sup>. También, la inserción de pruebas de tamizaje más versátiles, como el CISH, que revierte una alta reproducibilidad con un elevado índice de concordancia respecto del FISH y de algunos de los modelos de secuenciación. Hace poco, Kim y colaboradores describieron el algoritmo diagnóstico conocido como protocolo Chung SNVH-ALK, que obtuvo una concordancia entre el FISH y el CISH del 92%, y entre el CISH y la inmunohistoquímica del 82%<sup>48</sup>. Utilizando un valor de corte del 20% de positividad para el ALK evaluado por CISH, Yoshida y colaboradores encontraron una sensibilidad y especificidad del 93% y 100%, respectivamente; tras evaluar 15 adenocarcinomas CISH positivos por RT-PCR, el único falso negativo exhibió señales heterogéneas en la fracción 5' no acompañada de sus homólogos 3'. Considerando que algunos de los CPCNP ALK positivos tienen histotipos específicos (morfología de células en anillo de sello y coexpresión TTF1/p63), parece motivante el uso de técnicas más contundentes<sup>49-51</sup>.

No obstante, la aprobación del crizotinib estuvo ligada al desarrollo del KIT disponible comercialmente que emplea una prueba para el locus 5' y otra para el ALK, que, cuando se hibridan contra los núcleos normales,

producen una señal combinada (verde-naranja fluorescente) que es fácil de visualizar microscópicamente. Cuando el conjunto de la sonda se hibrida contra los núcleos con un reordenamiento génico que implica la porción 5' del locus ALK, el resultado demuestra una división de la señal fluorescente (figura 3). En teoría, cualquier lesión cromosómica entre o dentro de los cromosomas con la participación de ALK (incluyendo neoplasias que albergan fusiones con EML4 y otros) es detectada por esta prueba.

La ruptura característica de la señal de una fusión ALK/EML4 puede ser sutil, debido a la pérdida e inversión de solo una pequeña cantidad de material genético en el cromosoma 2, al igual que el 5' de la sonda puede fallar para hibridar, debido a una pérdida del locus diana en el tumor<sup>42,52</sup>. Por el momento, se desconoce la importancia de reconocer el valor de las diferentes variantes del ALK, siendo estándar el hallazgo de una brecha en las señales obtenidas por FISH mayor al 15%. En el futuro, se reconocerá la importancia de estratificar la enfermedad con la intención de establecer los mecanismos de resistencia dependientes e independientes del ALK.

El Departamento de Salud Pública de la Universidad de Colorado valoró la relación costo-efectividad del cribado para mutaciones activadoras potencialmente modulables en medicamentos blanco dirigidos en cáncer de pulmón. El modelo inicial utilizó la prueba de ALK realizada por FISH, encontrando que el costo por año de vida ajustado por calidad (AVAC) ganado para los CPCNP es de US\$106.707, valor que cae a US\$4.756 cuando se selecciona la población. No obstante, el enriquecimiento de ese segmento implica la pérdida de un porcentaje considerable de pacientes no evaluados. El hallazgo más significativo de este trabajo se sustenta en la pobre costo-efectividad existente entre el valor de los medicamentos cuya prescripción se limita al segmento de pacientes con un biomarcador positivo, en especial, cuando la estrategia se dirige a una patología de baja incidencia<sup>53</sup>.

### Identificación del ALK-EML4 y características de los portadores

En el 2007, Soda tamizó la librería génica de un paciente japonés de 62 años, encontrando una nueva fusión proveniente de la inversión del brazo corto del

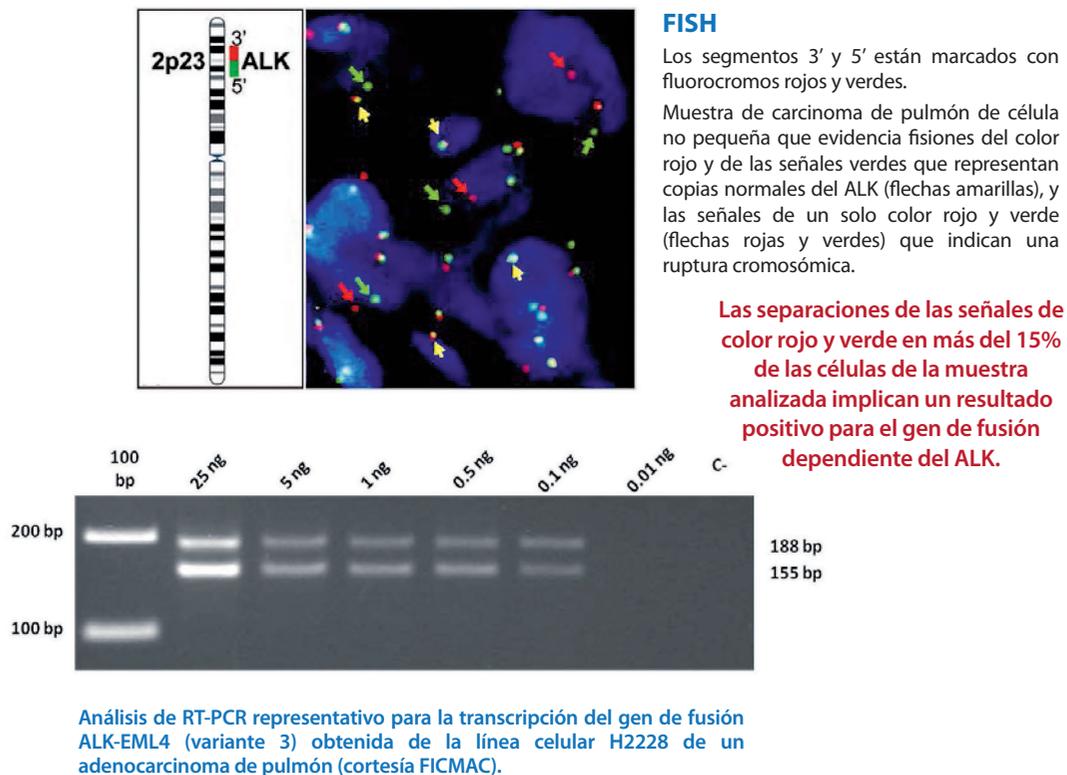


Figura 3. Evaluación de las alteraciones en ALK por FISH y PCR.

cromosoma 2 [Inv(2)(p21p23)] que une los exones 1-13 del EML4 con los exones 20-29 del ALK<sup>54</sup>. La incidencia global de los rearrreglos génicos en el ALK en los pacientes con CPCNP es de alrededor del 4% (107 alteraciones en 2.835 tumores evaluados, con un rango entre el 0.4% y 13%) (tabla 1)<sup>33</sup>, siendo la gran mayoría adenocarcinomas documentados en nunca fumadores. Los sujetos que exhiben positividad para el ALK suelen ser más jóvenes<sup>55</sup>, son usualmente de sexo masculino, no presentan beneficio con la exposición inicial a los inhibidores del EGFR y tienen con alguna regularidad un patrón acinar o sólido que contiene algún grado de diferenciación con células en anillo de sello<sup>57-60</sup> (tabla 2). También presentan un tropismo particular por la pleura y el pericardio, contrario a sus homólogos mutados para el EGFR<sup>61</sup>. Parece haber alguna diferencia en la frecuencia de las mutaciones entre la población asiática y occidental sin discrepancias entre caucásicos y afroamericanos<sup>62,63</sup>.

**Tabla 1.** Frecuencia del cáncer de pulmón de célula no pequeña ALK positivo

Autor	Método de evaluación	Población	Fumadores ALK+ (%)	No fumadores ALK+ (%)	Valor P
Soda, 2007	RT-PCR	Japón	8.3	11.1	1.0
Rikova, 2008	RT-PCR	China	-	3.9	-
Inamura, 2008	RT-PCR	Japón	2.4	4.6	0.65
Inamura, 2009	RT-PCR	Japón	3.4	5.7	0.53
Perner, 2008	FISH	Suiza/EE. UU.	-	2.7	-
Koivunen, 2008	FISH	EE. UU./Corea	11	8.5	< 0.01
Shinmura, 2009	RT-PCR	Japón	2.6	0	0.54
Martelli, 2009	RT-PCR	Italia/España	7.9	6.3	1.0
Shaw, 2009	PCR	EE. UU.	0.8	8.5	< 0.01
Wong, 2009	PCR	Japón	0	22.4	< 0.001
Rodrig, 2009	IHQ, FISH	EE. UU.	-	13.5	-
Takeuchi, 2009	IHQ, PCR	Japón	-	6.2	-
Boland, 2009	IHQ, FISH	EE. UU.	-	19	-
Sequist, 2011	RT-PCR	EE. UU.	-	5.0	-
Li, 2011	RT-PCR, FISH	EE. UU.	-	5.0	-
Kim, 2012	RT-PCR	Corea	-	8.3	-
McLeer-Florin, 2012	IHQ, FISH	Francia	-	3.0	-
Wu, 2012	RT-PCR, FISH	Taiwán	-	34.0	-
Yang, 2012	IHQ, FISH	EE. UU.	-	8.2	-
Just, 2012	RT-PCR, FISH	EE. UU.	-	6.0	-
Zhang, 2012	RT-PCR	Corea	-	4.3	-
Park, 2012	IHQ, FISH	Corea	-	9.5	-
Paik, 2012	RT-PCR	EE. UU.	2.0	12.0	< 0.0001
Lee, 2012	RT-PCR	Corea	-	7.7	-
Ren, 2012	RT-PCR	China	-	9.4	-
Total (n = 6.140)	-	-	3.2	8.3	-

**Tabla 2.** Características poblacionales de los pacientes ALK positivos y negativos

N = 643	ALK-positivo	ALK-negativo	P
Media de edad (años)	52.3	59.9	< 0.0001
Historia fumador			
- Actual	3%	8%	0.0001
- Exfumador	33%	61%	
- Nunca	64%	31%	

Recientemente, Fukui y colaboradores encontraron que la mayoría de los pacientes ALK positivos no alteran el antígeno carcinoembrionario ni presentan una distribución imagiológica de vidrio esmerilado<sup>64</sup>. Tras evaluar 42 pacientes con la fusión ALK-EML4, Yang y colaboradores descubrieron una frecuencia de mutaciones complejas, incluyendo el EGFR del 1%, en especial a expensas de las variantes 1 y 6<sup>65</sup>. En contraposición, Sasaki y colaboradores hallaron una frecuencia de alteraciones duales cercana al 6%, contando a dos sujetos con respuesta parcial al erlotinib y sin expresión positiva para el anticuerpo ALK1<sup>66</sup>.

Del mismo modo, algunos han documentado la pérdida del rearrreglo por FISH en concomitancia con mutaciones del EGFR obtenida en tejido de rebiopsia en pacientes tratados previamente con crizotinib<sup>67</sup>. Un análisis similar de las muestras del estudio EURTAC demostró mutaciones compuestas en el EGFR y en el ALK en el 15.6% de 96 pacientes incluidos; 9 de ellos contenían la variante 1 y 6, la variante 3. La SLP para los pacientes mutados del EGFR con y sin alteración en ALK-EML4 fue de 8 (IC95% 1.3-no alcanzado) y 7.1 (IC95% 5.8-8.8; p = 0.29) meses, respectivamente. En concordancia, la SG para el primer grupo aún no ha sido alcanzada y, para el segundo, fue de 22 meses (p = 0.70)<sup>68</sup>.

Durante el encuentro anual de la Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO 2012), Li y colaboradores presentaron la información de una tamización a gran escala, realizada para encontrar alteraciones en el ALK, incluyendo 9 de las 11 variantes conocidas evaluadas por Multiplex PCR. Se estudiaron 4.750 especímenes, encontrando un porcentaje global de positividad del 3.2%, el 57% para la variante 1, el 10% para la 2, el 31% para la 3 y el 2% para la variante 5A. Curiosamente, en la cohorte de pacientes ALK positivos no se halló ninguna alteración concomitante en el EGFR o KRAS. Respecto de la expresión de biomarcadores relacionados con la respuesta a la quimioterapia (disponible para 63 casos), el 68% tenía bajos niveles de timidilato sintasa (TS < 2.33), el 63.5% presentaba mínima expresión de ERCC1 (ERCC1 < 1.7) y el 40% mostraba baja expresión de RRM1 (RRM1 < 0.97)<sup>69</sup>. En paralelo, Gandara describió el comportamiento de los niveles de la TS en 63 pacientes ALK positivos versus un grupo control de 1.698 adenocarcinomas sin el rearrreglo.

Este muestreo tampoco encontró mutaciones complejas, incluyendo el EGFR y el KRAS, una mediana para los niveles de mRNA-TS en la población positiva de 2.02 (rango 0.55-19.4) y entre los negativos de 3.32 (rango 0.36-53.51;  $p < 0.0001$ ). Así mismo, confirmó la baja expresión génica de la TS en la población seleccionada de pacientes dependientes de los cambios en ALK, evento que parece asociarse con la respuesta al pemetrexed<sup>70</sup>.

Previamente, Camidge informó una SLP al pemetrexed (monoterapia o en combinación) en la población de mutados para el EGFR de 5.5 meses, entre los portadores del KRAS de 7 meses y en el segmento ALK positivo de 9 meses; en aquellos que resultaron ser triple negativos, fue de 4 meses, y el análisis multivariado ajustado por la línea en la cual se empleó el antifolato y el uso de platino como coadyuvante, la edad, sexo, histología y el estado de exposición al humo por combustión de tabaco no afectaron el desenlace. La única variable asociada a la prolongación de la SLP en aquellos expuestos al pemetrexed fue la presencia de la fusión génica ALK-EML4 (HR 0.36, IC95% 0.17-0.73;  $p = 0.0051$ )<sup>71</sup>.

Esta información ha sido confirmada por otros, contemplando incluso los datos integrados de los estudios PROFILE-1005 y PROFILE-1007; en ellos, se reclutaron 439 pacientes ALK positivos, de los cuales el 84.1% había recibido pemetrexed solo o en combinación como parte del tratamiento para la enfermedad metastásica. La tasa de respuesta global (TRG) para las combinaciones con pemetrexed en primera y segunda línea fue del 24.2% y 16.7%, respectivamente, con una mediana para el tiempo libre de progresión de 6.9 meses (IC95% 6.0-7.4) y 6.9 meses (IC95% 4.8-8.8)<sup>72-76</sup>. La controversia alrededor de la utilidad del pemetrexed en los pacientes que presentan alteraciones en ALK sigue abierta, en especial, si se valora la relación costo-beneficio de utilizar el antifolato como primera línea de intervención.

Es necesario esperar los resultados de los estudios (PROFILE-1007 y -1014) que evaluarán la utilidad del crizotinib en poblaciones cerradas expuestas al pemetrexed de forma no sesgada (1007: crizotinib, pemetrexed o docetaxel en segunda línea/1014: crizotinib o platino pemetrexed en primera línea). La otra hipótesis que sustenta la sensibilidad al pemetrexed tiene relación con la ATIC (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formil transferasa/inosina monofosfato

ciclohidrolasa), una enzima bifuncional que cataliza los últimos dos pasos de la biosíntesis de las purinas y que parece ser un sustrato dependiente de la vía ALK<sup>71</sup>. Los usuarios oncólogos tendremos que esperar estudios adicionales que permitan determinar el uso prioritario de los antifolatos en los pacientes con CPCNP ALK positivos que no tienen acceso al crizotinib, antes o después del fallo a la terapia blanco-dirigida y/o para el manejo de la enfermedad localmente avanzada como parte de la neo o adyuvancia, con o sin el uso de la radioterapia concomitante.

## Tratamiento de los pacientes ALK positivos

El impacto de la positividad del ALK en el pronóstico de la enfermedad se ha estudiado en múltiples pacientes con enfermedad temprana tratados con diversas intervenciones quirúrgicas, reportando supervivencias disímiles respecto del control ALK negativo<sup>77-80</sup>. En la enfermedad avanzada, el rearreglo se asocia con un pronóstico neutral o ligeramente superior al de la población silvestre, excluyendo los pacientes mutados para el EGFR<sup>81-83</sup>. Por el momento, no contamos con información respecto de la utilidad y seguridad del crizotinib o de las moléculas de siguiente generación en pacientes con enfermedad ALK positiva temprana o localmente avanzada.

Por el contrario, el inhibidor de tirosina quinasa dual se ha probado en pacientes con linfomas, sarcomas, carcinomas esofágicos y de pulmón con alteraciones del MET/ALK con cierto éxito. La información más reciente de los estudios fase I, que incluyeron 119 pacientes, de los cuales 116 fueron evaluables para la respuesta, encontró una tasa del 61% independiente de la edad, el sexo, el estado funcional o la línea en la que se utilizó el crizotinib. La mediana de SLP fue de 10 meses y la de la SG no está aún madura; sin embargo, se cuenta con un estimado temprano de la SG valorada a 6 y 12 meses, siendo esta del 90% y 81%, respectivamente<sup>84</sup>.

Resultados similares se obtuvieron del estudio fase II (PROFILE-1005), que recogió los datos de 136 pacientes ALK positivos, incluyendo un beneficio sintomático sostenido, en particular, del dolor, disnea, tos y fatiga después de seis semanas de iniciado el crizotinib. El 83% de los pacientes tuvo reducción de la enfermedad medible, que en 41 de ellos fue superior al 30%<sup>85</sup>.

La actualización de la información presentada en el 2012 describió una TRG del 53% (IC95% 47-60), una tasa de control de la enfermedad a 12 semanas del 85% (IC95% 80-89), una mediana para la duración de la respuesta de 43 semanas (IC95% 36-50) y una SLP de 8.5 meses (IC95% 6.2-9.9).

Los efectos adversos más frecuentes relacionados con la intervención fueron los cambios visuales (50%; inicio días después de la administración del medicamento, incluyendo la presentación de fotopsias, discromatopsias e imágenes persistentes en los bordes de los campos visuales, usualmente relacionadas con los cambios en la intensidad de la luz), náuseas (46%), vómito (39%) y diarrea (35%), en la gran mayoría de los casos de bajo grado. En una pequeña proporción de hombres expuestos a crizotinib, se ha reportado el hipogonadismo, sugiriendo la necesidad de valorar rutinariamente los niveles de testosterona con la intención de dar el soporte farmacológico necesario. También ha sido descrita la bradicardia profunda sin origen aparente<sup>86,87</sup>.

En el 6% de los pacientes, se encontró toxicidad severa asociada con el crizotinib, entre otros, disnea y neumonitis, neutropenia febril y generación de quistes renales<sup>88</sup>. Recientemente, Schnell y colaboradores reportaron hepatotoxicidad significativa dada por la elevación de las transaminasas, que ocurre regularmente en los primeros dos meses de tratamiento, evento que requirió la discontinuación del inhibidor multiblanco en menos del 1% de los casos<sup>89</sup>. Gracias a estas investigaciones, se aprobó la utilización del crizotinib en los Estados Unidos bajo una visión condicional en espera de los resultados de dos estudios de gran dimensión (PROFILE-1007 y -1014), en los que el objetivo primario será la SLP debido a la limitación para valorar el curso de la SG en pacientes con alta posibilidad de entrecruzamiento y largo tiempo de vida.

A razón de que la vida media del crizotinib excede las 50 horas, se está explorando la posibilidad de administrar el medicamento una vez al día. De igual forma, se han desarrollado diversos medicamentos de segunda generación capaces de modular la resistencia intrínseca al crizotinib; dos de ellos se consideran más potentes que la molécula descrita, el AP26113 y el X276, que están disponibles para administración vía oral y parecen capaces de inhibir las isoformas mutantes del ALK tras la exposición al

crizotinib<sup>90,91</sup>. El GSK1838705A es un inhibidor dual que afecta el IGF1R y las vías dependientes del ALK con una potencia inhibitoria de dos nanomoles por litro y de 0,5 nanomoles por litro para cada uno de los receptores, respectivamente. El medicamento ha demostrado actividad antiproliferativa en un panel que contempló diversas líneas celulares derivadas de tumores sólidos y hematológicos, así como en xenogramas murinos, donde demostró regresión de dos modelos dependientes del ALK, como el KARPAS299 y el SR-786. A pesar de que este agente bloquea el receptor de insulina, se ha hallado mínima influencia sobre la homeostasis de la glucosa, y, por el momento, el medicamento está en evaluación temprana para poblaciones seleccionadas<sup>92,93</sup>.

El TAE-684 es un inhibidor selectivo del ALK que induce una reducción significativa de la fosforilación con una potencia  $IC_{50} < 10$  nanomoles por litro. El medicamento tiene un efecto terapéutico que es 100 a 1.000 veces mayor que el crizotinib para inhibir la proliferación celular, reduciendo a su vez la actividad de otras quinasas y de varios efectores, como el ERK1/2, AKT, STAT3, STAT5, SEC31A-ALK y NPM1-ALK. Los parámetros farmacocinéticos del TAE-684 se han evaluado en ratones inmunodeficientes, mostrando una biodisponibilidad adecuada (60%) después de la administración oral, con una vida media de 12 horas, lo que sugiere un futuro promisorio como parte de las estrategias terapéuticas de primer y segundo orden para los pacientes ALK positivos<sup>94-97</sup>.

El CEP14083 es un inhibidor de tirosina quinasa con actividad contra la fusión génica NPM/ALK documentada en los linfomas de células T. El compuesto parece unirse a la fracción quinasa compitiendo con el ATP, demostrando una actividad enzimática contra el ALK de 11 nanomoles por litro. Igualmente, inhibe el receptor de insulina en rango nanomolar y podría afectar otros cambios dependientes del ALK documentados en el CPCNP. En la actualidad, este agente no está en desarrollo para pacientes con tumores sólidos<sup>98,99</sup>. Hace poco, Nerviano Medical Sciences reportó resultados promisorios con el inhibidor ALK NMS-E628, que exhibe un  $IC_{50}$  de 55 nanomoles por litro más actividad intermedia sobre el IGF1R y la aurora quinasa 2. El compuesto ha demostrado inhibición completa de las vías de señalización dependientes de ALK *in vitro* y en modelos animales portadores del CPCNP<sup>100,101</sup>.

## Resistencia a los inhibidores ALK

A pesar de la actividad del crizotinib en los pacientes ALK positivo, la enfermedad progresa de forma eventual en la totalidad de los casos. En la mayoría, las manifestaciones suelen ser sistémicas, pero en algunos pacientes este evento se circunscribe al sistema nervioso central (SNC)<sup>84</sup>. Un estudio realizado en la Clínica Mayo encontró que los pacientes ALK positivo de menor edad presentaban un riesgo mayor de desarrollar lesiones cerebrales y hepáticas al momento de la progresión<sup>102</sup>. En concordancia, Otterson halló que, tras la exposición al inhibidor dual, gran parte de los progresores presentan un buen estado funcional que permite la continuidad del crizotinib, en especial, cuando hay lesiones potencialmente tratables con radioterapia (la mediana de control de la patología en este término es de 10 semanas con un rango que oscila entre 3 y 82 semanas)<sup>103</sup>. Una controversia no resuelta para los pacientes con afectación cerebral es la baja concentración del medicamento (< 0.3%) en el líquido cefalorraquídeo respecto de los niveles séricos. Este hallazgo limita la utilidad del inhibidor ALK abriendo nuevas hipótesis alrededor de la introducción de los compuestos de segunda generación<sup>104</sup>.

La resistencia adquirida del crizotinib se describió en el 2010 al encontrar dos mutaciones en el dominio tirosina quinasa (L1196M y C1156Y), cada una en diferentes clonos de un mismo paciente<sup>47</sup>; la sustitución L1196M ocurre en la posición de apertura homóloga a la mutación T790M del EGFR o al cambio T315I del BCR/ABL<sup>105</sup>. Cinco mutaciones adicionales se han descrito desde la introducción del crizotinib en la práctica clínica (L1152R, G1269A, S1206Y, G1202R y I1151Tins)<sup>66,67,106,107</sup>, sin embargo, el análisis integral de los organismos de resistencia ha logrado encontrar nuevas alteraciones (F1174C y D1203N) y modelos, entre otros, la ganancia en el número de copias de ALK, la sobreexpresión o mutación del EGFR, HER2, KRAS y del KIT. Hoy sabemos que las mutaciones secundarias acuñan el 40% de los mecanismos adquiridos dependientes del ALK, favoreciendo el crecimiento y la proliferación tumoral<sup>67,108</sup>, hallazgo que podría limitar la eficacia de los nuevos compuestos debido al amplio espectro de cambios que presentan estas neoplasias tras la exposición al crizotinib.

Cerca del 13% de los pacientes ALK positivo demuestran la presencia de mutaciones adicionales en otros oncogenes, incluyendo el EGFR, KRAS, BRAF o MET<sup>109</sup>; estas modificaciones representan vías alternas de selección capaces de crear mecanismos de oposición relacionados con la emergencia de clonos independientes o divergentes. Un estudio preclínico documentó que la inclusión de cADN EGFR puede generar resistencia al crizotinib en líneas celulares, actuando como conductor secundario, evento que contrasta con la introducción del KRAS<sup>67</sup>. Hace poco, Ou y colaboradores presentaron los resultados de un estudio fase I/II que evaluó la administración de crizotinib más erlotinib en 20 pacientes previamente tratados con el inhibidor dual; la combinación demostró signos de actividad sin aumento en la toxicidad basal atribuible a cada uno de los compuestos<sup>110</sup>. Al menos un estudio adicional está probando el uso del crizotinib en combinación con dacomitinib (NCT01121575).

Un segmento de pacientes con resistencia independiente de ALK presenta amplificación del KIT (definida como una razón entre el gen KIT y el centromero 4 > 5) de forma focal o difusa, hecho que se puede asociar a la sobreexpresión del ligando. Hasta el momento, es desconocida la relevancia clínica de este hallazgo y los mecanismos terapéuticos potenciales para modularlo.

Aparte de los inhibidores ALK de segunda generación, dos estrategias farmacológicas se están explorando en la población de pacientes resistentes al crizotinib; la primera, el pemetrexed (descrito en un apartado previo), y los inhibidores de la HSP90 (*heat shock protein 90*). La modulación de la chaperona encargada de estabilizar proteínas durante la maduración de la célula ha demostrado gran eficacia en modelos preclínicos de NPM-ALK<sup>111-113</sup>.

## Conclusiones

El CPCNP ALK positivo se encuentra entre el 3% y 10% de la población y constituye un subtipo clínico y genómico bien caracterizado. El tratamiento de esta población incluye el uso del crizotinib, así como la exposición al pemetrexed y a los inhibidores de la HSP90. A pesar de las altas tasas de respuesta y de la prolongada SLP obtenida después del uso del inhibidor dual, se generan mecanismos de resistencia que se pueden clasificar en dos grandes categorías, una que retiene

la dominancia de la señalización vía ALK y otra donde se pierde esta de forma parcial o completa.

La resistencia dependiente de ALK ocurre a través de mutaciones en el dominio tirosina quinasa, eventos génicos que alteran la unión del crizotinib facilitando la activación constitutiva del ALK. Este tipo de resistencia también se presenta gracias a la ganancia de copias del gen de fusión que puede coexistir con las mutaciones adquiridas. En contraposición, la resistencia

independiente parece estar dominada por cambios en los receptores de la superfamilia HER y en el KRAS. La pobre penetración del crizotinib al SNC obliga el uso de estrategias como la radioterapia para facilitar el control de lesiones potencialmente sintomáticas. Es necesario establecer la frecuencia de las alteraciones en la cascada de señalización dependiente de ALK en nuestro entorno, facilitando en un futuro el uso racional del crizotinib.

## Referencias

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.
3. Bosetti C, Malvezzi M, Chatenoud L, Negri E, Levi F, La Vecchia C. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann Oncol*. 2005;16(3):489-511.
4. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994;263(5151):1281-4.
5. Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S. Hyperphosphorylation of a novel 80 kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3. *Oncogene*. 2004;9(6):1567-74.
6. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene*. 1997;14(4):439-49.
7. Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, et al. ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK). *Oncogene*. 1997;14(18):2175-88.
8. Grande E, Bolós MV, Arriola E. Targeting oncogenic ALK: a promising strategy for cancer treatment. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(4):569-79.
9. Barreca A, Lasorsa E, Riera L, Machiorlatti R, Piva R, Ponzoni M, et al. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J Molec Endocrinol*. 2011;47(1):R11-23.
10. Garber K. ALK, lung cancer, and personalized therapy: portent of the future? *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(10):672-5.
11. Röttgers S, Gombert M, Teigler-Schlegel A, Busch K, Gamberdinger U, Slany R, et al. ALK fusion genes in children with atypical myeloproliferative leukemia. *Leukemia*. 2010;24(6):1197-200.
12. Yuan Y, Liao YM, Hsueh CT, Mirshahidi HR. Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *J Hematol Oncol*. 2011;4:16.
13. Katayama R, Khan TM, Benes C, Lifshits E, Ebi H, Rivera VM, et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(18):7535-40.
14. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Jänne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(10):1773-80.
15. Gandara D. Role of prognostic & predictive biomarkers in development of new cancer therapies. Presented July 4, 2011, Amsterdam.
16. <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm269856.htm>>.
17. <[http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp)>.
18. Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, et al. Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types. *J Biol Chem*. 2002;277(39):35990-8.
19. Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett*. 2004;204(2):127-43.
20. Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin: two related proteins involved in development, survival, inflammation and tumorigenesis. *J Biochem*. 2002;132(3):359-71.
21. Meng K, Rodríguez-Peña A, Dimitrov T, Chen W, Yamin M, Noda M, et al. Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta-catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(6):2603-8.
22. Maeda N, Nishiwaki T, Shintani T, Hamanaka H, Noda M. 6B4 proteoglycan/phosphacan, an extracellular variant of receptor-like protein-tyrosine phosphatase zeta/RPTPbeta, binds pleiotrophin/heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM). *J Biol Chem*. 1996;271(35):21446-52.
23. Nakanishi T, Kadomatsu K, Okamoto T, Ichihara-Tanaka K, Kojima T, Saito H, et al. Expression of syndecan-1 and -3 during embryogenesis of the central nervous system in relation to binding with midkine. *J Biochem*. 1997;121(2):197-205.
24. Raulo E, Chernousov MA, Carey DJ, Nolo R, Rauvala H. Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3). *J Biol Chem*. 1994;269(17):12999-3004.
25. Muramatsu H, Zou K, Sakaguchi N, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T. LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;270(3):936-41.
26. Muramatsu H, Zou P, Suzuki H, Oda Y, Chen GY, Sakaguchi N, et al.  $\alpha 4\beta 1$ - and  $\alpha 6\beta 1$ -integrins are functional receptors for mi-

- dkine, a heparin-binding growth factor. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 22):5405-15.
27. Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, et al. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood.* 1997;89(4):1394-404.
  28. Bilsland JG, Wheeldon A, Mead A, Znamenskiy P, Almond S, Waters KA, et al. Behavioral and neurochemical alterations in mice deficient in anaplastic lymphoma kinase suggest therapeutic potential for psychiatric indications. *Neuropsychopharmacology.* 2008;33(3):685-700.
  29. Houtman SH, Rutteman M, De Zeeuw CI, French PJ. Echinoderm microtubule-associated protein like protein 4, a member of the echinoderm microtubule-associated protein family, stabilizes microtubules. *Neuroscience.* 2007;144(4):1373-82.
  30. Pollmann M, Parwaresch R, Adam-Klages S, Kruse ML, Buck F, Heidebrecht HJ. Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation. *Exp Cell Res.* 2006;312(17):3241-51.
  31. Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, Soda M, Hatano S, Inamura K, et al. KIF5B-ALK, a novel fusion onco-kinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(9):3143-9.
  32. Gascoyne RD, Lamant L, Martin-Subero JI, Lestou VS, Harris NL, Müller-Hermelink HK, et al. ALK-positive diffuse large B-cell lymphoma is associated with Clathrin-ALK rearrangements: report of 6 cases. *Blood.* 2003;102(7):2568-73.
  33. Solomon B, Varella-García M, Camidge DR. ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4(12):1450-4.
  34. Kim H, Yoo SB, Choe JY, Paik JH, Xu X, Nitta H, et al. Detection of ALK gene rearrangement in non-small cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization with correlation of ALK protein expression. *J Thorac Oncol.* 2011;6(8):1359-66.
  35. Yi ES, Chung JH, Kulig K, Kerr KM. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement in non-small cell lung cancer and related issues in ALK inhibitor therapy: a literature review. *Mol Diagn Ther.* 2012;16(3):143-50.
  36. Tan LH, Do E, Chong SM, Koay ES. Detection of ALK gene rearrangements in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using a fluorescence in situ hybridization (FISH) probe: a search for optimum conditions of tissue archiving and preparation for FISH. *Mol Diagn.* 2003;7(1):27-33.
  37. 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(20):6618-24.
  38. Kudo K, Nishio M, Sakai K, Tanimoto A, Sakatani T, Saito R, et al. Detection of EML4-ALK in serum RNA from lung cancer patients using MassARRAY platform. *J Clin Oncol.* 2012;30 (suppl; abstr 10569).
  39. Kanaji N, Bandoh S, Ishii T, Tadokoro A, Watanabe N, Takahama T, et al. Detection of EML4-ALK fusion genes in a few cancer cells from transbronchial cytological specimens utilizing immediate cytology during bronchoscopy. *Lung Cancer.* 2012. [Epub ahead of print].
  40. Papadopoulou E, Murray S, Nasioulas G. Development of a novel RT-PCR assay for the detection of EML4-ALK fusion products in FFPE specimens. *J Clin Oncol.* 2012;30 (suppl; abstr e21087).
  41. Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, Pettirossi V, Navarro A, Conte D, et al. EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues. *Am J Pathol.* 2009;174(2):661-70.
  42. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res.* 2009;15(16):5216-23.
  43. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, Hornick JL, Lindeman N, Mark EJ, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res.* 2010;16(5):1561-71.
  44. Mitsudomi T, Tomizawa K, Horio Y, Hida T, Yatabe Y. Comparison of high sensitive IHC, FISH, and RT-PCR direct sequencing for detection of ALK translocation in lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29 (suppl; abstr 7534).
  45. Just PA, Cazes A, Audebourg A, Cessot A, Pallier K, Danel C, et al. Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: a comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer.* 2012;76(3):309-15.
  46. McLeer-Florin A, Moro-Sibilot D, Melis A, Salameire D, Lefebvre C, Ceccaldi F, et al. Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol.* 2012;7(2):348-54.
  47. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1734-9.
  48. Kim H, Yoo SB, Choe JY, Paik JH, Xu X, et al. Detection of ALK gene rearrangement in non-small cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization with correlation of ALK protein expression. *J Thorac Oncol.* 2011;6(8):1359-66.
  49. Yoshida A, Tsuta K, Nitta H, Hatanaka Y, Asamura H, Sekine I, et al. Bright-field dual-color chromogenic in situ hybridization for diagnosing echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2011;6(10):1677-86.
  50. Yoshida A, Tsuta K, Watanabe S, Sekine I, Fukayama M, Tsuda H, et al. Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component. *Lung Cancer.* 2011;72(3):309-15.
  51. Camidge DR, Kono SA, Flacco A, Tan AC, Doebele RC, Zhou Q, et al. Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin Cancer Res.* 2010;16(22):5581-90.
  52. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Jänne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46(10):1773-80.
  53. Atherly AJ, Camidge DR. The cost-effectiveness of screening lung cancer patients for targeted drug sensitivity markers. *Br J Cancer.* 2012;106(6):1100-6.
  54. 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(7153):561-6.
  55. Wong DW, Leung EL, So KK, Tam IY, Sihoe AD, Cheng LC, et al. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer.* 2009;115(8):1723-33.

56. Horn L, Pao W. EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(26):4232-5.
57. 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(26):4247-53.
58. Perner S, Wagner PL, Demichelis F, Mehra R, Lafargue CJ, Moss BJ, et al. EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia*. 2008;10(3):298-302.
59. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, Okui M, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2008;3(1):13-7.
60. Varella-García M. Clinical characteristic associated with ALK positive NSCLC. IASLC 2011 (ABS #005.01).
61. Bunn P. Oncogene status predicts patterns of metastatic spread in treatment-NSCLC. ESMO 2011.
62. Zhou W, Christiani DC. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chin J Cancer*. 2011;30(5):287-92.
63. Gadgeel SM, Cote ML, Bepler G, Murphy V, Malysa A, Wozniak AJ, et al. Frequency of anaplastic lymphoma kinase (ALK) positive tumors among African American non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Clin Oncol*. 2012;30 (suppl; abstr 7593).
64. Fukui T, Yatabe Y, Kobayashi Y, Tomizawa K, Ito S, Hatooka S, et al. Clinicoradiologic characteristics of patients with lung adenocarcinoma harboring EML4-ALK fusion oncogene. *Lung Cancer*. 2012. [Epub ahead of print].
65. Yang J, Zhang X, Su J, Chen H, Tian H, Huang Y, et al. Concomitant EGFR mutation and EML4-ALK gene fusion in non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29 (suppl; abstr 10517).
66. Sasaki T, Koivunen J, Ogino A, Yanagita M, Nikiforow S, Zheng W, et al. A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2011;71(18):6051-60.
67. Doebele RC, Pilling AB, Aisner DL, Kutateladze TG, Le AT, Weickhardt AJ, et al. Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1472-82.
68. Rosell R, Molina-Vila MA, Taron M, Bertran-Alamillo J, Mayo C, Vergnenegre A, et al. EGFR compound mutants and survival on erlotinib in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) in the EURTAC study. *J Clin Oncol*. 2012;30 (suppl; abstr 7522).
69. Li T, Huang E, Desai S, Beckett L, Stephens C, Zeger G, et al. Update on the large-scale screening of ALK fusion oncogene transcripts in archival NSCLC tumor specimens using multiplexed RT-PCR assays. *J Clin Oncol*. 2012;30 (suppl; abstr 7594).
70. Gandara DR, Huang E, Desai S, Mack PC, Beckett L, Stephens C, et al. Thymidylate synthase (TS) gene expression in patients with ALK positive (+) non-small cell lung cancer (NSCLC): implications for therapy. *J Clin Oncol*. 2012;30 (suppl; abstr 7582).
71. Camidge DR, Kono SA, Lu X, Okuyama S, Barón AE, Oton AB, et al. Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in non-small cell lung cancer are associated with prolonged progression-free survival on pemetrexed. *J Thorac Oncol*. 2011;6(4):774-80.
72. Scagliotti G, Kim DW, Shaw AT, Ou SHI, Riely GJ, Gettinger SN, et al. A large retrospective analysis of the activity of pemetrexed (PEM) in patients (pts) with ALK-positive (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC) prior to crizotinib (CRIZ). *J Clin Oncol*. 2012;30 (suppl; abstr 7599).
73. Lee JO, Kim TM, Lee SH, Kim DW, Kim S, Jeon YK, et al. Anaplastic lymphoma kinase translocation: a predictive biomarker of pemetrexed in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011;6(9):1474-80.
74. Berge E, Delee M, Lu X, Barón AE, Solomon BJ, Doebele RC, et al. Clinical benefit from pemetrexed before and after crizotinib exposure in patients with ALK positive non-small cell lung cancer (ALK+ NSCLC). *J Clin Oncol*. 2012;30 (suppl; abstr 7601).
75. Park J, Kondo C, Shimizu J, Horio Y, Yoshida K, Mitsudomi T, et al. Chemosensitivity and clinical features of EML4-ALK-positive patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30 (suppl; abstr e18145).
76. Bertino EM, Zhao W, Villalona-Calero MA, Abdel Karim NF, Shilo K, Otterson GA. EML4-ALK in NSCLC: The OSU Experience. *J Clin Oncol*. 2011;29 (suppl; abstr e18014).
77. Zhang X, Zhang S, Yang X, Yang J, Zhou Q, Yin L, et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol Cancer*. 2010;9:188.
78. Varella-García M, et al. ALK gene rearrangements in unselected Caucasians with non-small cell lung carcinoma (NSCLC) [abstract]. *J Clin Oncol*. 2010;a10533.
79. Yang P, Kulig K, Boland JM, Erickson-Johnson MR, Oliveira AM, Wampfler J, et al. Worse disease-free survival in never-smokers with ALK+ lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2012;7(1):90-7.
80. Solomon B, Shaw AT. Are anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in non-small cell lung cancer prognostic, predictive, or both? *J Thorac Oncol*. 2012;7(1):5-7.
81. Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, et al. Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2011;12(11):1004-12.
82. Lee JK, Park HS, Kim DW, Kulig K, Kim TM, Lee SH, et al. Comparative analyses of overall survival in patients with anaplastic lymphoma kinase-positive and matched wild-type advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2011. <<http://dx.doi.org/10.1002/cncr.26668>>.
83. Wu SG, Kuo YW, Chang YL, Shih JY, Chen YH, Tsai MF, et al. EML4-ALK translocation predicts better outcome in lung adenocarcinoma patients with wild-type EGFR. *J Thorac Oncol*. 2012;7(1):98-104.
84. Camidge DR, Bang Y, Kwak EL, Shaw AT, Iafrate AJ, Maki RG, et al. Progression-free survival (PFS) from a phase I study of crizotinib (PF02341066) in patients with ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol*. 2011;29 (suppl; abstr 2501).
85. Crinò L, Kim D, Riely GJ, Janne PA, Blackhall FH, Camidge DR, et al. Initial phase II results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): PROFILE 1005. *J Clin Oncol*. 2011;29 (suppl; abstr 7514).
86. Weickhardt AJ, Rothman MS, Salian-Mehta S, Kiseljak-Vassiliades K, Oton AB, Doebele RC, et al. Rapid-onset hypogonadism secondary to crizotinib use in men with metastatic nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2012 (in press).
87. Ou SH, Azada M, Dy J, Stiber JA. Asymptomatic profound sinus bradycardia (heart rate  $\leq$ 45) in non-small cell lung cancer patients treated with crizotinib. *J Thorac Oncol*. 2011;6(12):2135-7.
88. Kim DW, Ahn MJ, Shi Y, De Pas TM, Yang PC, Riely GJ, et al. Results of a global phase II study with crizotinib in advanced

- ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2012; 30 (suppl; abstr 7533).
89. Schnell P, Safferman AZ, Huang C, Tang Y, Wilner KD. Clinical presentation of hepatotoxicity-associated crizotinib in ALK-positive (ALK+) advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2012;30 (suppl; abstr 7598).
  90. Zhang S, et al. AP26113, a potent ALK inhibitor, overcomes mutations in EML4-ALK that confer resistance to PF-02341066 (PF1066). *Proc Am Assoc Cancer Res.* 2010;51 (abstract LB-298).
  91. Rivera VM, et al. Efficacy and pharmacodynamic analysis of AP26113, a potent and selective orally active inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Proc Am Assoc Cancer Res* 2010;51 (abstract 3623).
  92. Sabbatini P, Korenchuk S, Rowand JL, Groy A, Liu Q, Leperi D, et al. GSK1838705A inhibits the insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase and shows antitumor activity in experimental models of human cancers. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(10):2811-20.
  93. Rabindran SK, Sabbatini P, Korenchuk S, Groy A, Rowand JL, Liu Q, et al. Characterization of GSK1838705A, a small molecule inhibitor of the insulin-like growth factor-1 receptor and anaplastic lymphoma kinase that delays growth of IGF-1R-dependent tumors and causes regression of ALK-dependent tumors in vivo. Proceedings of the 100th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR), 2010, Sep. 27-30, Denver (CO).
  94. Galkin AV, Melnick JS, Kim S, Hood TL, Li N, Li L, et al. Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(1):270-5.
  95. Van Roosbroeck K, Cools J, Dierickx D, Thomas J, Vandenberghe P, Stul M, et al. ALK-positive large B-cell lymphomas with cryptic SEC31A-ALK and NPM1-ALK fusions. *Haematologica.* 2010;95(3):509-13.
  96. Ardini E, Magnaghi P, Orsini P, Galvani A, Menichincheri M. Anaplastic lymphoma kinase: role in specific tumours, and development of small molecule inhibitors for cancer therapy. *Cancer Lett.* 2010;299(2):81-94.
  97. Grande E, Bolós MV, Arriola E. Targeting oncogenic ALK: a promising strategy for cancer treatment. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(4):569-79.
  98. Cheng M, Ott GR. Anaplastic lymphoma kinase as a therapeutic target in anaplastic large cell lymphoma, non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010;10(3):236-49.
  99. Ambrogio C, Martinengo C, Voena C, Tondat F, Riera L, di Celle PF, et al. NPM-ALK oncogenic tyrosine kinase controls T-cell identity by transcriptional regulation and epigenetic silencing in lymphoma cells. *Cancer Res.* 2009;69(22):8611-9.
  100. Ardini E, Menichincheri M, De Ponti C, Amboldi N, Saccardo MB, Texido G, et al. Characterization of NMS-E628, a small molecule inhibitor of anaplastic lymphoma kinase with antitumor efficacy in ALK-dependent lymphoma and non-small cell lung cancer models. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:A244.
  101. Bossi RT, Saccardo MB, Ardini E, Menichincheri M, Rusconi L, Magnaghi P, et al. Crystal structures of anaplastic lymphoma kinase in complex with ATP competitive inhibitors. *Biochemistry.* 2010;49(32):6813-25.
  102. Yang P, Kulig K, Boland JM, Erickson-Johnson MR, Oliveira AM, Wampfler J, et al. Worse disease-free survival in never-smokers with ALK+ lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2012;7(1):90-7.
  103. Otterson GA, Riely GJ, Shaw AT, Crinò L, Kim DW, Martins R, et al. Progression (PD): potential implications for management. *J Clin Oncol.* 2012;30 (suppl; abstr 7600).
  104. Costa DB, Kobayashi S, Pandya SS, Yeo WL, Shen Z, Tan W, et al. CSF concentration of the anaplastic lymphoma kinase inhibitor crizotinib. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):e443-5.
  105. Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer—early successes and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(5):268-77.
  106. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci Transl Med.* 2012;4(120):120ra17.
  107. Zhang S, Wang F, Keats J, Zhu X, Ning Y, Wardwell SD, et al. Crizotinib-resistant mutants of EML4-ALK identified through an accelerated mutagenesis screen. *Chem Biol Drug Des.* 2011;78(6):999-1005.
  108. Doebele RC, Aisner DL, Le AT, Berge EM, Pilling AB, Kutateladze TG, et al. Analysis of resistance mechanisms to ALK kinase inhibitors in ALK+ NSCLC patients. *J Clin Oncol.* 2012;30 (suppl; abstr 7504).
  109. Kris MG. Identification of driver mutations in tumor specimens from 1,000 patients with lung adenocarcinoma: the NCI's Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC) [abstract]. *J Clin Oncol.* 2011;29 (suppl.; CRA7506).
  110. Ou SHI, Govindan R, Eaton KD, Otterson GA, Gutierrez MA, Mita AC, et al. Phase I/II dose-finding study of crizotinib (CRIZ) in combination with erlotinib (E) in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2012;30 (suppl; abstr 2610).
  111. Makhnevych T, Houry WA. The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(3):674-82.
  112. Bonvini P, Gastaldi T, Falini B, Rosolen A. Nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (NPM-ALK), a novel Hsp90-client tyrosine kinase: down-regulation of NPM-ALK expression and tyrosine phosphorylation in ALK(+) CD30(+) lymphoma cells by the Hsp90 antagonist 17-allylamino,17-demethoxygeldanamycin. *Cancer Res.* 2002;62(5):1559-66.
  113. Proia DA, Acquaviva J, Jiang Q, Xue L, Smith D, Friedland JC, et al. Preclinical activity of the Hsp90 inhibitor, ganetespib, in ALK- and ROS1-driven cancers. *J Clin Oncol.* 2012;30 (suppl; abstr 3090).