

Az ALK-pozitív tüdőrák korszerű diagnosztikája

TÍMÁR JÓZSEF¹, LOTZ GÁBOR¹, RÁSÓ ERZSÉBET¹, MOLDVAY JUDIT²

¹Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, ²Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Budapest

Levezetési cím:

Dr. Tímár József, Semmelweis Egyetem, II. Sz. Patológiai Intézet, 1091 Budapest, Üllői út 93. E-mail: jtimar@gmail.com

Közlésre érkezett:

2017. június. 10.

Elfogadva:

2017. augusztus. 1.

Az ALK gén transzlokációja a harmadik leggyakoribb, terápiás szempontból hasznosítható genetikai eltérés a tüdő adenokarcinómáiban, és manapság már első- és másodvonalú terápiákban több inhibitor áll rendelkezésre. Ezen okoknál fogva nagy jelentősége van az ALK-pozitív tüdőrák molekuláris diagnosztikájának, amit több módszer racionális kombinációjával lehet végezni. A nemzetközi ajánlások megegyeznek abban, hogy a citológiai minták kivételével más típusú formalinfixált, paraffinos anyagok esetében az ALK-pozitív esetek szűrése a protein kimutatásának validált immunhisztokémiai módszerével történik. Az ALK proteinre pozitív esetekben a géntanszlokáció jelenlétét fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) célszerű megerősíteni. Citológiai minták esetében az ALK gén transzlokációját elsődlegesen FISH-módszerrel kell végezni. A kérdéses eredményű esetekben a genetikai eltérés tisztázására újgenerációs szekvenálást vagy RNS-alapú PCR-technikákat lehet alkalmazni. Az ALK-inhibitorok klinikai alkalmazása során gyakran alakul ki rezisztencia, aminek leggyakoribb oka az ALK gén amplifikációja és/vagy mutációi. Ezek molekuláris diagnosztikájának alapja a recidív daganatszövet vagy a vérben keringő nukleinsav kell, hogy legyen. *Magy Onkol* 61:301–311, 2017

Kulcsszavak: ALK-génhiba, tüdőrák, diagnosztika, terápia

ALK translocation is the 3rd most frequent genetic aberration in lung adenocarcinoma, and several inhibitors are now clinically available in first and second line settings. Accordingly, molecular diagnostics of ALK-positive lung cancer is very important and can be done with the rational combination of several methods. All international recommendations suggest that, except for cytological samples, screening technology for ALK-positive tumors is immunohistochemistry using a validated test. It is highly recommended that in case of ALK protein positive samples gene translocation must be confirmed by fluorescent in situ hybridization (FISH). In case of cytological samples FISH technique must be used as ALK diagnostics. In equivocal cases the genetic alteration of ALK can be confirmed by alternative molecular techniques such as next generation sequencing or RNA-based PCR methods. Upon administration of ALK inhibitors, acquired resistance is frequent which is mostly due to ALK amplification and/or mutation. It is evident that the diagnostics of these secondary ALK gene alterations must be done from recurrent tumors or circulating nucleic acids.

*Tímár J, Lotz G, Rásó E, Moldvay J. Molecular diagnostics of ALK-positive lung cancer. *Magy Onkol* 61:301–311, 2017*

Keywords: ALK gene rearrangement, lung cancer, diagnostics, therapy

AZ ALK-GÉNHIRIBA MOLEKULÁRIS EPIDEMIOLÓGIÁJA

A malignus daganatok karcinogeneze során kulcsszerepet játszó onkogénekben vagy szuppresszor génekben genetikai változások következnek be, amelyek génamplifikáció (kópiaszám-sokszorozódás), génmutáció vagy komplexebb kromoszomális törések során keletkező géntaszlokációk lehetnek. Az ALK gén, sok más onkogénhez hasonlóan, tirozinkináz aktivitású membránreceptor proteint (CD246) kódol, amely elsősorban az idegsejtek differenciációjában játszik szerepet és a 2. kromoszóma rövid karján található. Sajnálatos módon a kromoszóma e szakasza nagyon érzékeny genotoxikus anyagok hatásaira és gyakran szenved törést. Régóta ismert, hogy a non-Hodgkin-limfómák közül az anaplasztikus nagysejtes limfóma jellegzetes genetikai hibája az ALK gén t(2;5) transzlokációja az 5. kromoszómára, mely során NPM-ALK fúziós gén keletkezik, és az NPM konstitutív szabályozása egy konstitutív aktív ALK kinázt eredményez (1). Tíz éve vált ismertté, hogy a tüdő adenokarcinómáinak egy kisebb részét is ALK-génhiba jellemzi: az esetek döntő többségében a kromoszomális törés kijavítása a 2. kromoszóma rövid karjának inverziójával történik, ekkor azonban az ugyanazon kromoszómakaron lévő EML4 génnel keletkezik új fúziós gén. A fenti séma alapján konstitutív aktív ALK kináz és ez a génhiba ritkán más szolid daganatokban is előfordul (vastagbélrák, emlőrák, inflammatorikus miofibroblasztos tumor, nyelőcsőrák, veserák vagy éppen glioblasztóma) (2). A vizsgálatok során kiderült, hogy ritkán más génekkel is fuzionálhat az ALK tüdőrákban: KIF5B-ALK (t2:10), TFG-ALK (t2:3), KCL1-ALK (t2:14), HIP1-ALK (t2:7), PTPN3-ALK (t2:9) (3, 4). Az ALK gén mutációi, amelyek a tirozinkináz szakaszt érintik (hasonlóan az EGFR-hez) a gyermekkori neuroblasztómák egy részében fordulnak elő, de újabban az ALK-transzlokációs tüdőrákokban is megfigyelték. Érdekes, hogy ALK-amplifikációval jellemezhető daganatot nem ismerünk.

AZ ALK+ TÜDŐRÁK SAJÁTÓSÁGAI

Az ALK+ tüdőrák az ún. transzlokációs tüdőrákok családjába tartozik, amelynek legnépesebb tagja az ALK-transzlokációt tartalmazó rákok, de alacsonyabb gyakorisággal a ROS1 és a RET géneket is érintheti kromoszomális törés, és ennek révén keletkezhetnek új fúziós gének és konstitutív aktív kinázok (3, 4). ALK+ tüdőrák döntően az adenokarcinómák között fordul elő 3–10%-os gyakorisággal, bár ritkán laphámrákokban is kimutatták. Hazánkban az ALK tesztelése 3–4 éves múltra tekint vissza, és ennek alapján az ALK+ tüdő-adenokarcinóma gyakorisága $5,02 \pm 3,2\%$ (5). Fontos megjegyezni, hogy az adenokarcinómák között amúgy nem ritka neuroendokrin karakter az ALK+ tüdőrákokban sohasem fordul elő. Hasonlóan az EGFR-mutáns tüdőrákokhoz, előfordulása gyakoribb nem dohányzó betegeknél, ezenkívül az ALK+ tüdőrákos betegek fiatalabbak. Hasonlóan más onkogén mutációs daganatokhoz, tüdőrákban is érvényesül az a szabály, hogy egy daganatban egy jelpályában általában

csak egy onkogénhiba van jelen: az ALK+ tüdőrákokban az EGFR- vagy RAS-mutációk általában hiányoznak. Különböző irányelvek megjegyzik, hogy 50 évnél fiatalabb, nem dohányzó, laphámrákos betegek rutin ALK-tesztelése ajánlott, különösen, ha szövettani diagnózisuk kis biopszián vagy citológián alapul (6).

AZ ALK+ TÜDŐRÁK KEZELÉSE

Crizotinib (Xalkori, Pfizer)

A crizotinib egy többszörös támadáspontú, kis molekulájú tirozinkináz-gátló (TKI), amit eredetileg c-MET (mesenchymal epithelial transition growth factor) inhibitornak fejlesztettek ki, azonban hatásos gátlója az ALK-foszforilációnak és -jelátvitelnek is (7). Emellett a crizotinib gátolja a ROS1 receptor-tirozinkinázt is. A crizotinib volt az első molekuláris célzott terápia, amit ALK+, lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) kezelésére törzskönyvezett az FDA egy gyorsított eljárást követően (8). Az ALK meghatározását az FDA-törzskönyvezett Vysis ALK Break-Apart Probe Kit-tel kellett elvégezni. A törzskönyvezési vizsgálatban összesen 255 beteg vett részt, 136 az „A” vizsgálatban, 119 a „B” vizsgálatban. A medián életkor 52 év volt, a betegek 63%-a európai, míg 30%-a ázsiai etnikumú volt. A férfiak aránya 48% volt, és a betegek 84%-a rendelkezett 0–1 ECOG performansztátusszal. 96% volt az adenokarcinómában szenvedők aránya, 95%-uknál távoli áttét volt igazolható, és 94%-uk már kapott korábban szisztémás daganatellenes kezelést. Az elsődleges végpont az objektív terápiás válasz (ORR) volt, ami az „A” vizsgálatban 50% volt (95% CI: 42–59%), a terápiás válasz medián hossza 42 hét volt. A „B” vizsgálatban az ORR 61% (95% CI: 52–70%), a terápiás válasz medián hossza 48 hét volt. Teljes remissziót a betegek 1%-ában figyeltek meg. Az ORR nem függött a performansztátustól, a korábbi kemoterápiás kezelésektől, továbbá az ALK-génátrendeződést mutató daganatsejtek százalékos arányától. A leggyakoribb ($\geq 25\%$) mellékhatások mindkét vizsgálatban a látászavar, a hányinger, a hányás, a hasmenés, a perifériás ödéma és a székrekedés voltak. Grade 3–4 mellékhatások a betegek legalább 4%-ában jelentkeztek, elsősorban emelkedett ALT és neutropénia formájában. A betegek 1,6%-ában a crizotinib szedése kapcsolatba hozható volt életet veszélyeztető vagy fatális kimenetelű pneumonitisszel.

Az FDA a hagyományos törzskönyvi jóváhagyást az alábbi vizsgálat eredménye alapján adta ki. Egy multinacionális, randomizált, fázis III-as vizsgálatban a crizotinib hatásosságát 347 ALK+ metasztatikus NSCLC-s betegben vizsgálták, akik betegsége platinabázisú kemoterápiát követően progrediált (9). 173 beteg napi 2×250 mg crizotinibet, 174 beteg pedig kemoterápiát (58% pemetrexed, 42% docetaxel) kapott. A terápiás válasz aránya a crizotinibcsoportban 65%, míg a kemoterápiás csoportban 20% volt. A terápiás hatás medián időtartama a crizotinibcsoportban 7,4 hónap volt, a kemoterápiás csoportban pedig 5,6 hónap. A medián

progressziómentes túlélés (PFS) a crizotinibcsoportban 7,7 hónap volt, szemben a kemoterápiás csoportban tapasztalt 3,0 hónappal [HR=0,49 [95% CI: 0,37–0,64], $p < 0,0001$]. Az interim túlélési analízis ugyanakkor nem igazolt szignifikáns nyereséget a teljes túlélésben a crizotinib javára [HR=1,02 [95% CI: 0,68–1,54]]. A súlyos nemkívánatos események gyakoriságát 172, crizotinibbel kezelt beteg adatai alapján állapították meg, és 37%-nak bizonyult. Leggyakrabban pneumónia, tüdőembólia, nehézlégzés és intersticiális tüdőbetegség lépett fel. Fatális szövődeményt 9 betegnél észleltek, a halálok ARDS, aritmia, pneumónia, pneumonitisz, tüdőembólia, intersticiális tüdőbetegség vagy szepszis volt.

Egy másik fázis III-as vizsgálatban 343 kemoterápia-naiv, ALK+ nem laphámrák típusú NSCLC-s beteget randomizáltak elsővonalbeli kemoterápiára (pemetrexed carboplatinval vagy ciszplatinnal kombinálva), vagy crizotinibkezelésre (10). A PFS szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a crizotinibcsoportban (10,9 hónap), mint a kemoterápiás karban (7,0 hónap). Az ORR crizotinib esetében 74% volt, míg kemoterápiánál 45%. Mindezek ellenére a teljes túlélésben nem volt különbség, vélhetően annak köszönhetően, hogy a kemoterápiás karon progrediáló betegek kaphattak crizotinibet.

Ceritinib (Zykadia, Novartis)

A ceritinib egy szájon át szedhető, második generációs ALK-inhibitor, ami 20-szor hatásosabb a crizotinibnél, és klinikai hatást eredményez a crizotinibre nem reagáló betegekben is. A ceritinib az EMK4-ALK, NPMALK, ROS1, IGF-R1 és az InsR gátlója, de nem hat a c-MET ellen (11). A ceritinibvel végzett első fázis I-es vizsgálat, az ASCEND-1 során 59 EML4-ALK+ NSCLC-ben szenvedő beteg részesült napi 50 mg-tól 750 mg-ig terjedő dóziseszkalációjú ceritinibkezelésben (11). A maximális tolerálható dózis 750 mg/nap volt. A vizsgálati kohorszt további 71 beteggel egészítették ki, akik a maximális dózist kapták. Azon 114 beteg körében, akik legalább napi 400 mg ceritinibet kaptak, az ORR 58% volt. Érdekes módon, annál a 80 betegnél, aki megelőzően crizotinibkezelésben részesült, az ORR 56% volt, ami arra utal, hogy a crizotinibre rezisztenssé váló daganatok ellen is hatékony a ceritinib. ≥ 400 mg/nap ceritinib esetén a PFS 6,9 hónap volt a crizotinibet már kapott, míg 10,4 hónap a crizotinibnaiv betegeknél. Annál a 14 betegnél, akik intrakraniális metasztázisban szenvedtek, a ceritinibkezelés 50%-os intrakraniális terápiás válaszaránnyal járt, ami messze jobb, mint amit crizotinibbel lehetett elérni (11). Az FDA gyorsított eljárással törzskönyvezte a ceritinibet ALK+ metasztatikus NSCLC-ben azon betegeknél, akiknél crizotinibrezisztencia vagy -intolerancia állt fenn (12). Ez a gyorsított eljárással jóváhagyott törzskönyv 163 betegnél megfigyelt 44%-os ORR-en alapult.

A jelenlegi gyógyszer-törzskönyv alapját annak a nemrég lezárult randomizált, multicentrikus, fázis III-as vizsgálatnak (ASCEND-4) az eredménye adta, amelyben IIIB/IV-es stádiumú, ALK+ NSCLC-s betegek részesültek elsővonalbeli

ceritinib (750 mg/nap) vagy platinabázisú kemoterápiás kezelésben (13). A betegeket 28 ország 134 centrumából vonták be a vizsgálatba. Az elsődleges végpont a medián PFS volt, ami a ceritinibnél szignifikánsan hosszabbnak bizonyult [HR: 0,55 [95% CI: 0,42–0,73], $p < 0,0001$]. A PFS ceritinibet szedőknél 16,6 hónap [95% CI: 12,6–27], míg a kemoterápiát kapottaknál 8,1 hónap volt [95% CI: 5,8–11,1]. Az ORR a ceritinibcsoportban 73% [95% CI: 66–79%], a kemoterápiás csoportban pedig 27% [95% CI: 21–34%] volt. Mindezek alapján az elsővonalbeli ceritinibkezelés kedvezőbbnek bizonyult a standard kemoterápiánál, így ALK+ NSCLC-ben mérlegelendő az elsővonalbeli alkalmazása. Azon betegeknél, akiknél a kezdeti képalkotó vizsgálatok alapján mérhető intrakraniális áttét volt megfigyelhető, a neuroradiológusok által meghatározott intrakraniális ORR 57% volt [95% CI: 37–76%] a ceritinibkaron és 22% [95% CI: 9–42%] a kemoterápiás karon. A leggyakoribb (a betegek legalább 25%-ában előforduló) mellékhatások a hasmenés, hányinger, hányás, gyengeség, hasi fájdalom, étvágytalanság és köhögés voltak. Súlyos mellékhatás a ceritinibet szedők 38%-ában fordult elő. Mellékhatások miatt a ceritinibkezelést a betegek 12%-ánál kellett felfüggeszteni, leggyakrabban emelkedett kreatinin-, amiláz- vagy lipázszint miatt. A mellékhatások miatti dózismegszakításra a ceritinibkezelésben részesült betegek 77%-ánál került sor, míg dóziscsökkentést 66%-ban alkalmaztak.

Alectinib (Alecensa, Chugai-Roche)

Az alectinib egy második generációs ALK-gátló, ami az FDA szerint is átütő terápiás eredményt hozott az ALK+ NSCLC elsővonalbeli kezelésében. A J-ALEX vizsgálatban 207 japán, ALK+, crizotinibnaiv NSCLC-s beteget randomizáltak alectinib- vs. crizotinibkezelésre (14). Az ALK-pozitivitást vagy RT-PCR-rel, vagy együttesen immunhisztokémiával (IHC) és FISH-módszerrel kellett igazolni. A tervezett időközi elemzés szerint az eredmények jobb PFS-t igazoltak az alectinibkaron, mivel a medián PFS-t még nem érték el, amikor a crizotinibkaron a PFS 10,2 hónap volt (HR: 0,34, 99,7% CI: 0,17–0,70). Az alectinib jobban tolerálható volt, a leggyakoribb mellékhatás pedig a székrekedés volt (36%). A crizotinibkezelésben részesülteknél emellett a hányinger (74%), a hasmenés (73%), a látászavarok (55%), valamint a GOT/GPT emelkedések (>30%) voltak a leggyakoribb mellékhatások.

Ennek a tanulmánynak az egyik fő korlátja az volt, hogy kizárólag ázsiai betegeket vizsgáltak, így nem volt eldönthető, hogy az eredmények szélesebb körben alkalmazhatók-e. Erre a kérdésre egy 303 beteg bevonásával történt vizsgálat (ALEX) adta meg a választ, amely során ugyancsak első vonalban hasonlították össze az alectinibet a crizotinibbel (15). A randomizált, multicentrikus, fázis III-as vizsgálatban 31 ország 161 vizsgálóhelye vett részt, az ALK-pozitivitást immunhisztokémiával, a Roche Tissue Diagnostics által kifejlesztett VENTANA ALK (D5F3) CDx Assay diagnosztikus kittel határozták meg. Az alectinib 53%-kal csökkentette a betegség progressziójának vagy a halálnak a kockázatát

(HR: 0,47, 95% CI: 0,34–0,65), a medián PFS-t pedig még nem érték el. Ezzel szemben a megközelítően 18 hónapos követési időnél a crizotinibkezelést kapó betegek PFS-e 11,1 hónap volt. A független felülvizsgálat alapján a medián PFS 25,7 hónap volt az alectinibnél és 10,4 hónap a crizotinibnél (HR: 0,50). A teljes túlélési eredmények még nem értékelhetők. A vizsgálati populációban a központi idegrendszeri progresszióig eltelt időt az alectinib jelentősen meghosszabbította (HR: 0,16, 95% CI: 0,10–0,28). Mindemellett a mellékhatások kevésbé gyakoriak voltak alectinib esetében (41% vs. 50%). Az NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Guideline jelenleg előrehaladott stádiumú, ALK+ NSCLC-ben elsővonalszerű kezelésként az alectinib alkalmazását javasolja [16].

Az alectinibkezelést másodvonatra is törzskönyvezték azon ALK+ NSCLC-ben szenvedő betegek részére, akik crizotinibkezelés mellett progrediáltak, vagy nem tolerálták a gyógyszert. Fázis II-es vizsgálatok során alectinibkezelés mellett 50%-os terápiás válaszarányt észleltek olyan ALK+, lokálisan előrehaladott vagy metasztatikus NSCLC-ben szenvedő betegek körében, akik crizotinib mellett progrediáltak [17, 18].

Az első vizsgálatba 138 ALK+, crizotinibrezisztens daganatban szenvedő beteget vontak be, közülük 122 beteg terápiás eredménye volt értékelhető [17]. A 47 hetes medián követési időnél az alectinib ORR-értéke 50% (95% CI: 41–59%), a betegségkontroll aránya (objektív válasz és stabil betegség) pedig 79% volt. A terápiás válasz medián időtartama 11,2 hónap (95% CI: 9,6 hónap–nem érte el), míg a PFS 8,9 hónap volt (95% CI: 5,6–11,3 hónap). A központi idegrendszeri érintettség betegségkontroll-aránya 83% volt (95% CI: 74–91%). Az alectinibterápia megkezdésekor 23 betegnél már központi idegrendszeri áttét volt igazolható, de nem részesültek emiatt sugárterápiában. Közülük 10 betegnél (43%) komplett remisszió volt megfigyelhető. A leggyakoribb mellékhatások a székrekedés (33%), a fáradékonyság (26%) és a perifériás ödéma (25%) voltak; a legtöbb mellékhatás grade 1-es és 2-es volt.

A másik fázis II-es vizsgálatban 69 beteg vett részt, akik mérhető, előrehaladott stádiumú ALK+ NSCLC-ben szenvedtek, és crizotinib mellett progrediáltak. A 4,8 hónapos követési időpontnál az alectinibkezelésben részesültek ORR-értéke 48% volt (95% CI: 36–60%) [18]. A vizsgálat jelenleg is folyamatban van (NCT01871805).

Brigatinib (Alunbrig, Ariad)

A brigatinib egy kettős – ALK és mutáns EGFR – gátlószer. Az FDA a brigatinibet gyorsított eljárással törzskönyvezte 2017. április 28-án metasztatikus, ALK+ NSCLC-s betegek kezelésére, akik betegsége a kezdeti crizotinibkezelés ellenére progrediált, vagy akik a szert nem tolerálták. Ily módon a brigatinib lett az FDA által engedélyezett negyedik ALK-gátló, illetve a ceritinib és az alectinib után a harmadik olyan szer, ami crizotinib után adható. A törzskönyvezési vizsgálat egy fázis II-es klinikai vizsgálat (ALTA) volt, amelyben

222 beteg vett részt, és a brigatinib két dózisát (napi 90 vagy 180 mg) tesztelték [19]. Az előzetes eredmények alapján az ORR 54%, a medián PFS a magasabb dózis alkalmazásakor valamivel hosszabb (9,2 vs. 12,9 hónap), és ez az intervallum a leghosszabb az eddigi újgenerációs ALK-gátlók körében megfigyelték között. Az agyi áttétben szenvedő betegek körében az alacsonyabb dózis mellett a betegek 42%-ában, míg a magasabb dózis mellett 67%-ukban volt megfigyelhető az agyi áttét regressziója. A leggyakoribb (>25%) mellékhatások a hányinger, a gyengeség, köhögés és a fejfájás voltak. A leggyakoribb súlyos mellékhatás a pneumónia volt (3–6%), ami 90 mg/nap dózis mellett és a kezelés első hetében jelentkezett. A brigatinib – különösen a magasabb dózisban – a rezisztenciamechanizmusok szélesebb spektrumát blokkolja, az FDA azonban a napi 180 mg alkalmazását csak egy kezdeti egyhetes napi 90 mg-os dózist követően javasolja, mert ezáltal kedvezőbb tolerálhatóság érhető el [19].

A gyógyszer kétségtelen hatásossága ellenére még nem eldöntött kérdés, hogy az elsővonalszerű vagy a szekvenciális alkalmazás (progressziókor való bevetés) lesz-e a kedvezőbb terápiás választás.

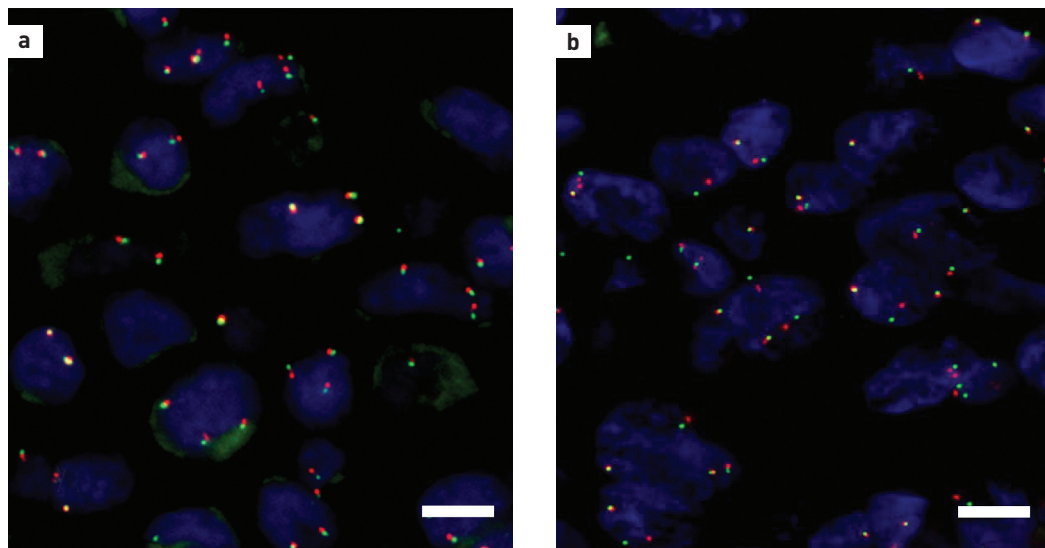
Lorlatinib (PF-6463922, Pfizer)

A lorlatinib egy szelektív kettős – ALK/ROS1 – gátlószer. Ez a vizsgálati szer ígéretes aktivitást mutat egy jelenleg is folyamatban lévő fázis I/II-es vizsgálatban, miáltal az FDA-tól elnyerte az „áttörő terápiás hatású” minősítést. Az előzetes vizsgálati adatok szerint a 82 ALK+ vagy ROS1+ betegnél, akik valamennyien kaptak korábban legalább egyféle ALK-gátló kezelést, a lorlatinib ORR-értéke 32,9% volt [20, 21]. Érdemes hangsúlyozni, hogy azon betegeknek, akik legalább kétféle korábbi ALK-gátló kezelésben részesültek, az ORR legalább 25% (folyamatos az adatok elemzése), ami a lorlatinib hatékonyságát bizonyítja refrakter betegségben is. Fontos megjegyezni, hogy a lorlatinib aktivitást mutatott olyan betegeknek is, akiknek a daganata a G1202R, erős ALK-rezisztenciámutációt hordozza. Ez a mutáció rezisztenciát hordoz az újgenerációs ALK-inhibitorokkal szemben, beleértve a ceritinibet, az alectinibet és a brigatinibet. Agyi áttétben 62 beteg szenvedett, közülük 35-nél volt mérhető lézió, náluk az intrakraniális ORR 51% volt. A lorlatinib leggyakoribb mellékhatása a hiperkoleszterinémia volt, ami lipidcsökkentőkkel kezelhetőnek bizonyult. Dóziscsökkenést 20%-ban alkalmaztak, a kezelés mellékhatások miatti tartós megszakítása igen ritka volt (3,4%), és nem észleltek kezeléssel összefüggő halálesetet.

AZ ALK-GÉNHIABA DIAGNOSZTIKÁJA

Fluoreszcens *in situ* hibridizáció (FISH)

Az első generációs ALK-inhibitor (crizotinib) klinikai vizsgálata során a beválasztási kritérium a tüdő-adenocarcinómák ALK-gén transzlokációs státusza volt, amelyet a Vysis ALK Break Apart FISH-próba (Abbott) alkalmazásával fluoreszcens *in situ* hibridizációval állapítottak meg [22]. A tüdő/tüdőrák



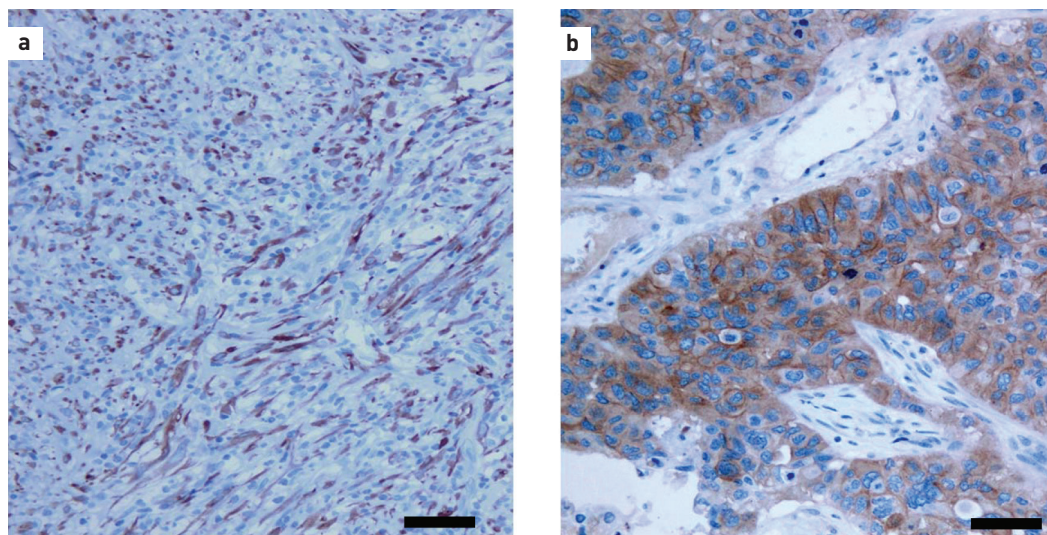
1. ÁBRA. ALK-génátrendeződés kimutatása sebési mintán fluoreszcens *in situ* hibridizációs módszerrel (Vysis ALK FISH-kit). a) ALK-negatív tüdő-adenokarcinóma. A vörös és zöld jelek nem válnak el egymástól a sejtmagban. b) ALK-pozitív tüdő-adenokarcinóma. A sejtmagok 50%-ában a vörös és a zöld jelek elválnak egymástól. Jel: 20 µm

szöveti alaptulajdonságai, a mintavétel során fellépő fizikai behatások keltette elváltozások, a minták fixáltsága stb. miatt az amerikai (FDA), illetve európai (CE) diagnosztikai minősítés megszerzéséhez új előkezelési és poszthibridizációs formulát és kiegészítő anyagokat fejlesztettek, és így lett az USA-ban a crizotinib kísérő diagnosztikum a Vysis ALK FISH-kit. Tüdő-adenokarcinómában az ALK leggyakoribb fúziós partnere a génátrendeződés során az EML4 [23], amely ugyanazon a 2-es kromoszómakaron, az ALK közelében (azzal ellentétes leolvasási irányban) helyezkedik el [2]. Ennek következtében a két gén 5' végeit érintő inverzió [inv(2)(p21p23)] során az ALK töréspontjának vörös színű próbával jelölt 3' oldalától (mely a transzformáló tirozinkináz-domént tartalmazza) viszonylag kis mértékben távolodik csak el a zölddel jelölt 5' vég, ráadásul ez a távolság az EML4 töréspontjának variabilitása miatt tumoronként más-más lehet [24]. Ezért egyes esetekben a vörös és zöld jel szétválása a génátrendeződés esetén sem éri el a klasszikus interkromoszomális átrendeződések alapján felállított két jelátmérőnyi távolság kritériumát [24, 25].

A fenti diagnosztikus/értékelési probléma feloldható olyan FISH-próbakeverék használatával, amely az ALK 3' és 5' végéhez kötődő (vörös és zöld) „break-apart” próbák mellett egy harmadik, az EML4-re specifikus (világoskék – aqua – színnel jelölt) próbát is tartalmaz (ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe, ZytoVision GmbH, ALK/EML4 Tri-Color FISH Probe, Biocare Medical). Ilyen módszerrel kimutatható az ALK-génátrendeződés akkor is, ha a két jelátmérőnyi távolság nincs meg a szétvált vörös és zöld ALK-szignálok között, de a vörös ALK-jel fúziót mutat a kék EML4-gyel, vagy a két részre szétvált kék EML4-jel közrefogja a vörös ALK-ot

[25]. Szintén jellegzetes jelenség, hogy bizonyos esetekben a génátrendeződés során a zölddel jelölt 5' ALK vég elvesz, ezért zöld pár nélküli különálló vörös ALK-jelek láthatóak a sejtmagokban [26].

A kísérő diagnosztikumként használt Vysis *in situ* hibridizációs reakció kiértékeléséhez legalább 2 nagy nagyítású látómező 50 daganatsejtjét szükséges vizsgálni. Amennyiben az ALK-génátrendeződésre jellegzetes jelemintázatot (különvált vörös és zöld vagy zöld nélküli különálló vörös jel) mutató sejtek aránya nem éri el a 10%-ot, a minta negatív, ha eléri vagy meghaladja az 50%-ot, pozitív. A 10–49% átrendeződött sejtet tartalmazó mintáknál újabb 50 sejt számolása szükséges. Ezek lehetnek a minta más területének daganatsejtjei, vagy kis mintáknál ugyanazon terület eltérő metszési síkból/mélységből származó metszete (a lényeg, hogy ne ugyanazokat a sejteket értékeljük újra). Amennyiben a génátrendeződött daganatsejtek aránya eléri vagy meghaladja a 15%-ot, a minta pozitívnak minősül [1. ábra] [27]. Ez azt jelenti, hogy a szövetmintának az értékelhetőséghez legalább 50, de akár 100 daganatsejtet is tartalmaznia kell, ami a kis biopsziák esetén az egyéb (szövetteni, immunhisztokémiai, más molekuláris) vizsgálatok elvégzése után nem feltétlenül lehetséges. Ugyancsak probléma lehet a daganat esetleges genetikai heterogenitásából eredő fokális ALK-génátrendeződés diagnózisa, ha a fókuszt kevés sejtet tartalmaz. Ezekben az esetekben segíthet Schildhaus és munkatársainak új értékelési protokollja, melyben háromszínű, ALK-EML4 fúziót is detektáló *in situ* hibridizációs módszert használva elég a jeleket 20 daganatsejtben számolni, és 0–1 átrendeződött sejt (<10%) esetén a diagnózis negatív, 6 vagy több átrendeződött sejt (>25%) esetén pozitív a diagnózis.



2. ÁBRA. ALK-fehérje-pozitív tüdő-adenokarcinóma. Az ALK-fehérje kimutatása a Ventana D5F3 primer antitest és a Ventana OptiView előhívórendszerrel történt Ventana immunfestő automatán. a) Pozitív kontroll: inflammatorikus miofibroblasztos tumor. b) ALK+ tüdő-adenokarcinóma. Csaknem valamennyi daganatsejt citoplazmája intenzív reakciót mutat. Jel: 100 μ m

Ha az átrendeződött daganatsejtek aránya 10–25%, akkor további 30 sejt leszámolása szükséges, így az összesen 50 daganatsejtből ≥ 8 átrendeződött sejt ($\geq 15\%$) esetén mondható ki az ALK-pozitivitás (25).

Az ALK-génátrendeződés kimutatására szolgáló *in situ* hibridizációs diagnosztikai módszerek formalinfixált, paraffinba ágyazott (FFPE) anyagokra lettek validálva és engedélyeztetve, ezért jelenleg a citológiai minták esetén sejtblokk készítése ajánlott. Azonban a College of American Pathologists (CAP), az International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) és az Association for Molecular Pathology (AMP) készülében lévő új ajánlásának véleményezésre kiadott kéziratára már elfogadják a kenetek felhasználását is ALK-génátrendeződés *in situ* hibridizációval történő kimutatására (27, 28). Több tanulmány igazolta ugyanis, hogy a kenetek végzett FISH megbízható, az FFPE-hez hasonló pozitívítási küszöbértékkel használható módszer (28, 29). Viszont a kenet készítésének, fixálásának és festésének módjától, illetve az alkalmazott előkezeléstől függően jelentős különbségek adódhatnak a minták értékelhetőségében, így a módszer optimalizálása különösen fontos. Továbbá mind sejtblokk, mind kenet vizsgálatánál a szöveti összefüggésükből kiragadott tumorsejtek egyéb sejtes elemektől történő biztos elkülönítése igen nehéz lehet a fluoreszcens mintákban.

Immunhisztokémia

Az ALK immunhisztokémiai kimutatásának kezdeti nehézségét az jelentette, hogy tüdőrákban az ALK fúziós fehérje expressziós szintje viszonylag alacsony (30), így az anaplasztikus nagysejtes limfóma diagnosztikájához használt

anti-ALK1 primer antitest (Dako) nem elég érzékeny, ami nem optimalizálható még az újabban alkalmazott nagyobb érzékenységgű előhívókkal sem (31). A probléma megoldását két technikai változtatás jelentette. Két új anti-ALK antitestet alkalmaztak (D5F3, Cell Signaling Technology, 5A4, Novocastra) és ezeket nagyobb érzékenységgű előhívókkal és jelamplifikáló rendszerekkel kombinálták (OptiView/Ventana, Bond Polymer Refine/Leica Biosystems). Ezekkel a technikai módosításokkal az immunhisztokémiai vizsgálat az *in situ* hibridizációhoz hasonló diagnosztikai pontossággal tudja azonosítani az ALK-génátrendeződést mutató eseteket (31, 32). A Ventana a D5F3 anti-ALK primer antitestet kombinálta a nagy érzékenységgű OptiView előhívó és amplifikációs rendszerrel a Ventana automata IHC-platformján, és megkapta mind az amerikai (FDA) jóváhagyást, mind az európai (CE) minősítést, mint önálló kiegészítő ALK-diagnosztikai módszer (Ventana ALK(D5F3)CDx Assay/790-4796). A fenti Ventana előhívó rendszer használata mellett az 5A4 anti-ALK antitest érzékenysége megközelíti a D5F3-ét (33). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy miután az OptiView előhívó a nem-Ventana automata immunhisztokémiai platformokon nem használható, ezért az 5A4 primer anti-ALK antitest (Novocastra) kombinálása nem-Ventana érzékenyített előhívó rendszerekkel némileg tovább csökkenti az érzékenységet.

Tüdőrákban az ALK fúziós fehérje jelenléte granuláris citoplazmatikus IHC-pozitivitást ad (ami membrán mellett dúsuló megjelenésű is lehet). A festődés gyakran homogén FISH-pozitivitás esetén is heterogén intenzitású, melyet elsősorban a fixáltság heterogenitása magyarázhat (31). Minthogy nincs belső pozitív kontroll, így negatív esetekben

nem eldönthető, hogy valódi negativitás vagy preanalitikai károsodás állhat-e a háttérben (FISH-nél a fúziós ALK-szignálok jelenléte igazolja a hibridizáció sikerességét nem átrendeződött esetekben is). Ezért kiemelkedő fontosságú a standard protokollok betartása a mintavétel, fixálás, beágyazás során. Az ideális pozitív IHC-kontroll alacsony epitópkoncentrációjú, hogy akár az érzékenység kisebb csökkenését okozó hatás is észlelhető legyen. Erre alkalmas az appendix, ahol a ganglionsejteknek legalább gyengén pozitívnak kell lenniük, az inflammatorikus miofibroblasztos tumor (2.a ábra), vagy egy ALK+ tüdőrák. Az IHC pozitívításának értékelésére a szemikvantitatív (0, 1+, 2+, 3+) módszer, illetve a pozitív tumorsejtek arányát, így az expressziós heterogenitást is figyelembe vevő H-score használható. A Német Patológus Társaság (34) és az IASLC (33) ajánlásaiban is gyakorlatilag 3-as kategorizálás szerepel: az egyértelműen negatív (0%, nincs reakció), az egyértelműen pozitív (3+ vagy magas H-score, 2.b ábra) és a kérdéses kategória (1+/2+, alacsony százalékos pozitívítás). Az *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal kombinált protokollok ezen alapulva segítik a minél érzékenyebb és specifikusabb ALK-diagnózis felállítását (31).

Bár az amplifikáció a specifikus pozitívítás szintjét sokkal nagyobb mértékben emeli, a nonspecifikus háttér növekedésével is találkozunk egyes esetekben (gyengébb, nem granuláris citoplazmapozitívítás), illetve különböző, nem daganatos szöveti elemek pozitívítása kizárandó az értékelésből (alveoláris makrofágok, normális mirigysejtek, neurális elemek, extracelluláris mucin, nekrotikus területek). Ugyanakkor a daganat kiterjedt pecsétgyűrűsejtes megjelenése esetén a sejtek vékony citoplazmájának gyenge pozitívítása kis nagyítás mellett háttérnek tűnhet, így álnegatív értékelésre vezethet. Az IHC előnye a FISH-sel szemben, hogy kevés tumorsejt esetén is definitív diagnózist adhat (nincs meghatározva minimális daganatsejtszám vagy százalékos pozitívítás), azonban figyelembe kell venni az extrém alacsony daganatsejt-mennyiségre alapozott pozitív/negatív diagnózis felállításában rejlő veszélyeket (31).

Polimeráz láncreakció alapú technikák

EML4-ALK variánsok kimutatása (mRNS)

Lényegesen egyszerűbb, könnyebben számszerűsíthető, igen megbízható és nagy érzékenységű megoldást képvisel a fúziós gén jelenlétének nukleinsav-alapú kimutatása (35). A nehézséget az okozza, hogy míg az ALK törése következetesen a gén 20-as exonjában történik meg, az EML4 esetén ez a gén több helyén is bekövetkezhet (36). A leggyakoribb (33%) a 13-as exonban található törés, ami az EML4-ALK 1-es variánst (E13;A20 – var1) eredményezi. A második leggyakoribb (29%) a 6-os exont érintő 3-as variáns (E6a; A20 és E6b;A20 – var3a és var3b), míg a 2-es variáns gyakorisága 9%, és ez az EML4 20-as exonját érinti (E20;A20 – var2). A további 5 variáns már lényegesen alacsonyabb arányban fordul elő: 3% a 14-es exont (itt már deléciók és inszerciók is megjelennek), 2–2% a 18-as, 15-ös és a 2-es exonokat érintő töréspont, míg az esetek

1%-ában látunk a 17-es exonnal történő fúziót. Tekintve, hogy a nem szerkesztett nukleinsavban akár 10 000 bázispárt is meghaladó intronok vannak, a PCR-alapú vizsgálatokat mRNS-ből kell végezni. A diagnosztikus munkában az esetek döntő százalékában elérhető FFPE mintákban, tekintve a belőlük izolálható RNS korlátozott méretét, csak több primerpárral oldható meg a különböző variánsok kimutatása. További nehézséget jelent, hogy a megbízhatóságot nagyban befolyásolja a minta minősége, amit a preanalitikus fázis határoz meg. Azaz a mintavételtől a fixálásig eltelt idő, a minta tárolási körülményei ez alatt az idő alatt és maga a fixálás módja. A módszer lehetővé teszi, hogy az mRNS-t friss biopsziás mintából, citológiai kenetből vagy akár perifériás vérből (extracelluláris/keringő RNS) izoláljuk. Tekintetbe kell venni azonban azt a tényt, hogy a sérumban, illetve a plazmában szabadon lévő („cell-free”) RNS többnyire <100 nukleotid méretű, ami leszűkíti az e mintákban a fúziós gén kimutatására alkalmas módszerek számát. Változatos technikai spektrumot felvonultató gyári készítmények vannak forgalomban, amelyek segítik a különböző típusú mintákból a nem sejthez kötött mRNS kinyerését (37). A fúziós gén kimutatásának legegyszerűbb formája az, amikor az mRNS reverz transzkripcióját követően az EML4 és az ALK adott variánsnak megfelelő exonjaiba tervezett primerekkel PCR-rel amplifikáljuk az adott variánst. A várt termék megjelenése vagy annak hiánya eleve információt nyújt a fúziós gén jelenlétéről és annak típusáról. A termék Sanger-szekvenálással történő validálása opció, de bizonytalan esetben (pl. gyanús méretű, esetleg halvány termék) fokozhatja a diagnózis biztonságát. Léteznek kereskedelmi forgalomban lévő kitek, amelyek segítségével kvantitatív adatokat is kaphatunk (ám minden esetben vegyük figyelembe azt a tényt, hogy a kimetszett mintából származó mRNS expressziójának mértéke nem feltétlen reprezentatív a minta egészére). A diagnosztikus minősítést (CE-IVD) szerzett kitek többsége működéséhez valós idejű PCR-t (és az azt működtetni képes szakembert) igényel. Ilyen például az EntroGen FAM és VIC fluoreszcens próbákkal működő EML4-ALK Fusion Gene Detection Kit-je, amely a 8-as kivételével valamennyi variánst kimutatja. ARMs technológián alapul az AmoyDx EML4-ALK Fusion Gene Detection Kit-je. Az EML4 mellett az ALK KIF5B 15-ös, 17-es és 24-es exonjával képzett fúziós génjét is kimutatja a DIACARTA QFusion™ EML4-ALK and KIF5B-ALK Fusion Gene Detection Kit-je.

Az ALK-mutáció kimutatása

Az 1. táblázatban felsorolt ALK-inhibitor rezisztenciamutációk domináns hányada az ALK 22. és 23. exonjában helyezkedik el. Jelenleg a legkönnyebben kivitelezhető kimutatásuk a Sanger- (esetleg elérhető újgenerációs) szekvenálás. A kérdéses exont határoló intronokba tervezett primerekkel felsokszorozott PCR-termékből a teljes exon szekvenciája (és természetesen a potenciális mutációk) leolvasható. A leggyakoribb 16 mutáció 2 db PCR-termék direkt szekvenálásával igazolható vagy kizárható.

1. TÁBLÁZAT. Ismert ALK-inhibitor rezisztenciamutációk

ALK-mutáció	Exon	Crizotinib	Ceritinib	Alectinib	Brigatinib	Lorlatinib
T1151K		+	+			
T1151ins	E22	+	+	+	+	
L1152R		+	+	+		
C1156Y		+	+	+	+	
I1171N/S/T				+		
F1174L/C/V		+	+	+	+	
V1180L	E23		+	+		
R1192P		+	+			
L1196M		+	+	+	+	+
L1198F		+	+			
G1202R		+	+	+	+	
G1203N		+	+		+	
G1203+E1210K		+	+		+	
G1203N+F1174C		+	+		+	
S1206Y/C/F		+	+	+	+	
E1210K					+	
F1245V	E24	+				
G1269A/S	E25	+	+			
A1280V	E26	+	+			
L1535Q	E29	+	+			

Diagnosztikus algoritmus(ok) (38)

A nem kissejtes tüdőrák ALK-státuszának meghatározására országonként változó protokollok vannak érvényben. Ezek megegyeznek abban, hogy az ALK-vizsgálat az adenokarcinóma/adenoszkvamózus csoportban kötelező, abban már eltérések vannak, hogy a laphámrákos csoportban mikor javasolják a vizsgálatot (pl. fiatal, nem dohányzó beteg) (6, 16). Miután az ALK-génhiba az esetek döntő többségében nem kombinálódik KRAS- vagy EGFR-mutációval, célszerűnek látszik az EGFR/KRAS kettős vad adenokarcinóma csoportot megjelölni tesztelendő populációnak.

Minden nemzetközi ajánlás az IHC és FISH technikák kombinációját javasolja az ALK+ tüdőrákok kiválasztására, amelyben az IHC-vizsgálat az elsődleges szűrő technika, mivel ez a FISH-elemzésnél olcsóbb, gyorsabb és egyszerűbben kivitelezhető, ugyanakkor az érzékenysége és specifitása is megfelelő (31, 33, 34, 38). A következő kérdés, hogy a tüdődagatanatból vett minta típusa mennyiben befolyásolja az ALK-diagnosztikus protokollt. Egyértelmű, hogy az FFPE-típusú sebészi reszekátum az ideális, de a tüdőbiopsziás minták is

megfelelőek. A PD-L1-meghatározáshoz hasonlóan a citológiai folyadék alapú mintavételek során készített sejtblokkok is megfelelőek az ALK IHC-vizsgálatára, amit ideális esetben a Ventana IVD-rendszerével, de mindenképpen a D5F3 vagy 5A4 primer anti-ALK antitesttel és ultraérzékeny előhívó rendszerekkel kell elvégezni. A probléma a citológiai kenetekkel van, mivel az IHC-módszerek nem ilyen típusú mintákra lettek kidolgozva és validálva, ezért ezeken a keneteken az elsődleges technika a FISH-vizsgálat lehet a diagnosztikus FISH-kitek valamelyikének alkalmazásával (39).

Amennyiben az ALK IHC-reakció negatív (0% pozitív daganatsejt), a tüdőrákot ALK-negatívnak kell diagnosztizálni. Bár több nemzetközi ajánlásban is szerepel, hogy az egyértelműen erősen pozitív ALK IHC-reakció alapján az ALK-pozitivitás diagnózisa felállítható, a diagnózisból következő terápiás konzekvenciák alapján célszerűnek és szükségesnek tűnik a pozitív IHC eseteiben megerősíteni a diagnózist egy független, az ALK-génátrendeződés tényleges kimutatására szolgáló FISH-vizsgálattal a három piacon lévő diagnosztikus kit valamelyikével.

Amennyiben a FISH-vizsgálat 15% feletti ALK-génátrendeződési arányt jelez a daganatban, az esetet ALK-pozitívnak kell tekinteni. Ha a FISH-vizsgálat 15% alatti ALK-génátrendeződési arányt talál, a diagnózis felállításához az IHC-eredmény figyelembevétele szükséges (ami citológiai minták esetében nem lehetséges). Amennyiben a minta IHC-reakciója kérdéses, ezt nem dönti el a kérdéses (15% alatt pozitív) FISH-vizsgálat sem, így amennyiben nincsen további molekuláris diagnosztikai eljárásra mód (RT-PCR vagy újgenerációs szekvenálás), a daganatot ALK-negatívnak kell tekinteni.

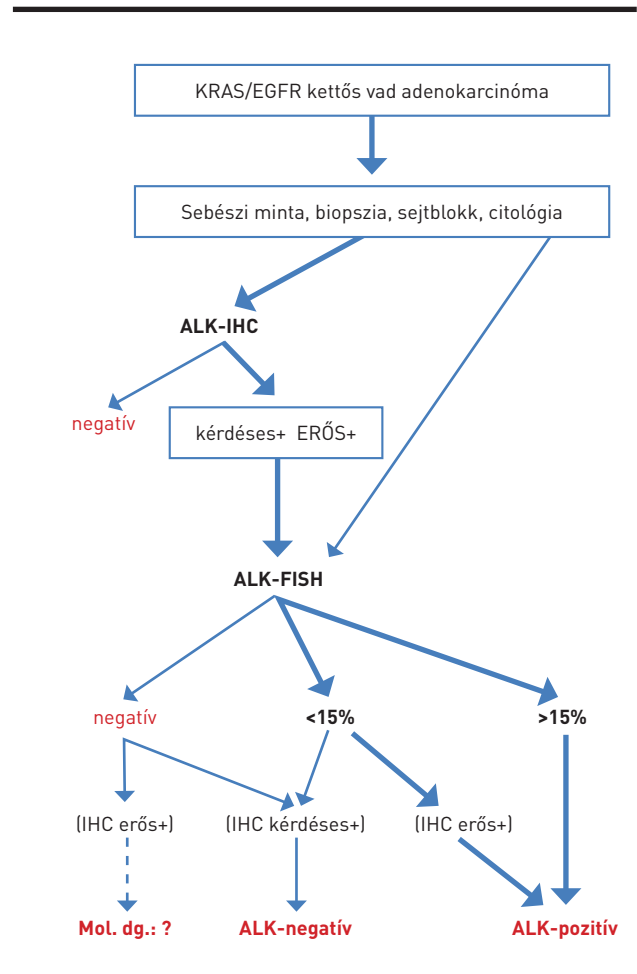
Citológiai minták esetében, amennyiben a FISH-vizsgálat negatív eredménnyel zárul (0% génátrendeződött daganatsejt), a daganatot ALK-negatívnak kell tekinteni. Minden más típusú minta esetében a negatív FISH-eredmény komoly diagnosztikus ellentmondáshoz vezet, hiszen pozitív ALK IHC-reakció alapján kerül elvégzésre a FISH. Amennyiben az IHC-reakció kérdéses volt, a negatív FISH-eredmény nem igazolja a daganat ALK-pozitív genotípusát, tehát negatívnak kell tekinteni. Az irodalomban alacsony gyakorisággal (néhány %) előfordulnak olyan esetek, amelyekben az ALK protein erős pozitivitása mögött nincsen FISH-reakcióval igazolható ALK-génátrendeződés. Ezekben az esetekben arra kell törekedni, hogy alternatív FISH-teszttel vagy alternatív molekuláris patológiai módszerrel (RT-PCR vagy újgenerációs szekvenálás) nyerjen igazolást a daganatban az ALK-génátrendeződés (27). Amennyiben ezekre nincs mód, az IHC-vizsgálat megismétlése és konzultációs kiértékelése jön szóba, aminek újabb pozitív eredménye alapján a daganat ALK-pozitívnak tekinthető (3. ábra).

Az ALK IHC- és FISH-eredmények eltérésének számos technikai oka lehet. A szövet preanalitikai károsodása, az expressziós heterogenitás vagy pecsétgyűrűsejtes tumor álnegatív IHC-diagnózisra vezethet, míg komplex (több töréspontú) átrendeződések jelenléte vagy tumorsejtként azonosított reaktív normális sejtek vizsgálata negatív FISH-eredményezhet. Normális sejtek pozitivitása vagy magas intracitoplazmatikus háttér félreértelmezése az IHC, atípusos jelmintázat (mint pl. multiplex fúziós és különálló zöld jelek keveredése) a FISH esetében adhat álpozitív eredményt (27, 31). Mindezek fényében igen nagy jelentősége van annak, hogy az ALK tesztelését nagy tapasztalattal bíró, a molekuláris diagnosztikában jártas laboratóriumban végezzék, ahol a belső minőségbiztosítás mind a technológiai folyamatokban, mind a kiértékelésben folyamatosan működik. Az ALK-diagnosztikát végző laboratóriumoknak ezen felül részt kell venniük nemzetközi külső minőségbiztosítási felülvizsgálatokon, mint amilyen az Európai Patológus Társaság által folyamatosan szervezett testspecifikus ellenőrzések. A most megjelent és 2014-re vonatkozó hazai ALK-incidencia-adatok tüdőrákban látszólag a nemzetközi trendeket mutatják az 5,02%-os átlagos gyakorisággal (5). Ugyanakkor nyugtalanító az, hogy ettől az átlagtól mindkét

irányban jelentősek az eltérések az egyes diagnosztikus centrumokban. Ennek oka minden bizonnyal a nem egységes ALK-tesztelési és értékelési protokollok használata. Az itt javasolt diagnosztikus algoritmus, a javasolt diagnosztikus technológiák és egységesebb kiértékelési elvek segíthetnek abban, hogy a hazai tüdőrákokban alacsony gyakorisággal előforduló ALK-génátrendeződéssel jellemzett alcsoport felfedezése és ennek révén terápiája javuljon.

ALK-INHIBITOR REZISZTENCIAMECHANIZMUSOK TÜDŐRÁKBAN

Mint azt fentebb bemutattuk, tüdőrákban az ALK-gén mutációi vagy nem fordulnak elő, vagy igen ritkák. Ugyanakkor az ALK+ tüdőrákok TKI-terápiája során előbb vagy utóbb relapszus alakul ki (40, 41). Eddig a legnagyobb tapasztalattal a crizotinibbel kezelt tüdőrákokban fellépő genetikai eltérésekről rendelkezünk, de más ALK-gátlók alkalmazása során megjelenő eltérésekről is gyűlnek az adatok. A crizotinibkezelte betegek 30–40%-ában alakul ki szerzett rezisztencia.



3. ÁBRA. Javasolt ALK-diagnosztikus protokoll tüdőrák esetében

E rezisztenciák egyik része ún. ALK-dependens, más részük alternatív jelpályák aktiválódását jelenti.

Az ALK-gátlók (elsősorban a crizotinib) alkalmazása során a leggyakoribb genetikai eltérések az ALK-gén amplifikációja vagy mutációi: ez utóbbi a kinázszakaszt érinti, és vagy az inhibitor kötődésének erősségét csökkenti, vagy az ATP-affinitást növeli [42]. Önmagában az ALK-gén mutációja nem jelent feltétlenül rezisztenciát ALK-inhibitorra, hiszen a mutációk egy része a gyógyszerhatás szempontjából közömbös, egy részük akár érzékenyíthet is, csak bizonyos formái valódi rezisztenciamutációk. Továbbmenve, a ma alkalmazott különféle ALK-inhibitorok igen eltérő rezisztenciamutációs profillal rendelkeznek, így ma már lehetőség van, hasonlóan az EGFR-mutáns tüdőrákokhoz, az ALK-mutációs profilhoz választani ALK-inhibitorra [43] (1. táblázat).

Az ALK-tól független rezisztenciamechanizmusok között az egyik leggyakoribb az EGFR- vagy KRAS-mutáns daganatpopulációk megjelenése. Ezek minden bizonnyal nem újonnan kialakult (indukált) mutációk az ALK+ populációban, hanem az eredeti daganatban igen alacsony arányban jelen lévő minor populációk kiszelektálódása az ALK-inhibitor kezelés során, hasonlóan pl. a vad-RAS vastagbélrákok anti-EGFR kezelése során kiszelektálódó RAS-mutáns szubpopulációkhoz [44]. Ebből a szempontból megjegyzendő, hogy az egyik újonnan fejlesztett ALK-inhibitor, a brigatinib egyben T790M mutáns EGFR-inhibitor is [45]. Az ALK-független rezisztenciamechanizmusok között megfigyeltek KIT- vagy MET-amplifikációt, ami ezen alternatív jelpályák dominanciájához vezet.

Az ALK-INHIBITOR-REZISZTENCIA DIAGNOSZTIKÁJA

Az ALK-inhibitor-kezelés alatt történő relapszus esetében értelmetlen a kezelés előtti primer tumor genetikai vizsgálata, csakis a kezelés során túlélő daganatos populáció adhat felvilágosítást a lezajlott genetikai eltérésekről, amihez vagy a primer tumor ismételt biopsziájára, vagy az újonnan megjelent léziók (beleértve a testúri folyadékokat is) mintavételére van szükség [46]. Amennyiben ez nem lehetséges, a keringő DNS/RNS vagy keringő daganatsejtek vizsgálata lehetséges alternatívák. Első lépésben meg kell állapítani, hogy a túlélő daganatsejtekben jelen van-e az ALK-transzlokáció: ehhez FISH-vizsgálat esetében daganatsejtekre, RT-PCR esetében keringő RNS-re van szükség. Amennyiben a daganat még ALK-transzlokációt hordoz, a következő feladat az ALK-gén tirozinkináz szakaszának szekvenálása az esetlegesen fellépett rezisztenciamutációk kimutatására, amihez a daganatsejtekből kivont vagy keringő DNS szükséges.

Amennyiben a relapszusban lévő daganat már nem ALK+, az adenokarcinómák esetében eredetileg követett molekuláris profilírozásra van szükség az EGFR- vagy RAS-mutáns státusz elemzésére. Amennyiben e vizsgálatok is negatív eredményhez vezetnek, az alternatív genetikai eltérések keresése folytatódik, mint a KIT- vagy MET-amplifikáció FISH-vizsgálata. E vizsgálatok nagyon munkaigényesek és költségesek, és ekkor minden bizonnyal felmerül multiplex genetikai vizsgálómódszerek alkalmazása, pl. az újgenerációs szekvenálás, amely egy lépésben ad választ valamennyi fentebb felmerült kérdésre.

IRODALOM

1. Voen C, Peola S, Chiarle R. The anaplastic lymphoma kinase as an oncogene in solid tumors. *Front Biosci* 7:269–282, 2015
2. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer. *Nature* 448:561–566, 2007
3. Hirsch FR, Suda K, Wiens J, Bunn PA Jr. New and emerging targeted treatments in advanced non-small cell lung cancer. *Lancet* 388:1012–1024, 2016
4. Tsao MS, Yatabe Y, Hirsch FR. ALK and ROS1 gene rearrangement. In: *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer*. Ed. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. Editorial Rx Press, Aurora, USA 2016, pp. 11–14
5. Ryska A, Berzinec P, Brcic L, et al. NSCLC molecular testing in Central East European countries. *BMC Cancer*, 2017 (elfogadva)
6. Hirsch FR, Wynes MW, Tsao MS. Candidates for ALK and ROS1 testing. In: *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer*. Ed. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. Editorial Rx Press, Aurora, USA 2016, pp. 15–17
7. Christensen JG, Zou HY, Arango ME, et al. Cytoreductive antitumor activity of PF-2341066, a novel inhibitor of anaplastic lymphoma kinase and c-Met, in experimental models of anaplastic large-cell lymphoma. *Mol Cancer Ther* 6:3314–3322, 2007
8. Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J. ALK rearrangements and testing methods in non-small-cell lung cancer: a review. *Genes Cancer* 5:1–14, 2014
9. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 368:2385–2394, 2013
10. Solomon BJ, Mok T, Kim DW. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 371:2167–2177, 2014
11. Shaw AT, Kim DW, Mehra R, et al. Ceritinib in ALK rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 370:1189–1197, 2014

12. Khozin S, Blumenthal GM, Zhang L, et al. FDA approval: ceritinib for the treatment of metastatic anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 21:2436–2439, 2015
13. Soria JC, Tan DS, Chiari R, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase III study. *Lancet* 2017 (in press)
14. Hida T, Nokihara H, Kondo M, et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet* 390:29–39, 2017
15. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1704795
16. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Non-Small Cell Lung Cancer, Version 8. 2017 – July 14, 2017
17. Ou SH, Ahn JS, De Petris L, et al. Alectinib in crizotinib-refractory ALK-rearranged non-small-cell lung cancer: a phase II global study. *J Clin Oncol* 34:661–668, 2016
18. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S, et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 17:234–242, 2016
19. Kim DW, Tiseo M, Ahn MJ, et al. Brigatinib in patients with crizotinib-refractory anaplastic lymphoma kinase-positive non-small-cell lung cancer: a randomized, multicenter phase II trial. *J Clin Oncol* 35:2490–2498, 2017
20. Solomon BJ, Bauer TM, Felip E, et al. Safety and efficacy of lorlatinib (PF-06463922) from the dose-escalation component of a study in patients with advanced ALK+ or ROS1+ non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 34(suppl):9009, 2016
21. Shaw AT, Ou S-HI, Felip E, et al. Efficacy and safety of lorlatinib in ALK+ non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with >1 prior ALK tyrosine kinase inhibitor: A phase 1, 2 study. *J Clin Oncol* 35(suppl):9006, 2017

22. Kwak E, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 368:1693–1703, 2010
23. Lin JJ, Shaw AT. Differential sensitivity to crizotinib: Does EML4-ALK fusion variant matter? *J Clin Oncol* 34:3363–3365, 2016
24. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, et al. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 46:1773–1780, 2010
25. Schildhaus HU, Binot E, Wolf J, et al. Validation of a simplified approach to detect ALK translocations. *Mod Pathol* 29(2s):482A, 2016
26. Camidge D, Kono SA, Flacco A, 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* 16:5581–5590, 2010
27. Yoshida A, Bubendorf L, Varella-Garcia M. ALK testing with FISH. In: *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer*. Ed. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. Editorial Rx Press, Aurora, USA 2016, pp. 41–52
28. Pisapia P, Lozano MD, Vigliar E, et al. ALK and ROS1 testing on lung cancer cytologic samples: perspectives. *Cancer* 2017, doi: 10.1002/cncy.21899
29. Savic S, Bubendorf L. Common fluorescence in situ hybridization applications in cytology. *Arch Pathol Lab Med* 140:1323–1330, 2016
30. Mino-Kenudson M, Chirieac LR, Law K, et al. A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 16:1561–1571, 2010
31. Tunnissen E, Lantuejoul S, Chung JH, Kerr KM. ALK testing with IHC. In: *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer*. Ed. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. Editorial Rx Press, Aurora, USA 2016, pp. 25–33
32. Conklin C, Craddock KJ, Have C, et al. Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non-small-cell lung carcinoma and is antibody dependent. *J Thorac Oncol* 8:45–51, 2013
33. Marchetti A, Di Lorito A, Pace MV, et al. ALK protein analysis by IHC staining after recent regulatory changes: a comparison of two widely used approaches, revision of the literature, and a new testing algorithm. *J Thorac Oncol* 11:487–495, 2016
34. von Laffert M, Schirmacher P, Warth A, et al. ALK-testing in non-small cell lung cancer (NSCLC): Immunohistochemistry (IHC) and/or fluorescence in-situ hybridisation (FISH)? Statement of the German Society for Pathology (DGP) and the Working Group Thoracic Oncology (AIO) of the German Cancer Society. *Lung Cancer* 103:1–5, 2017
35. Bayliss R, Choi J, Fennell DA, et al. Molecular mechanisms that underpin EML4-ALK driven cancers and their response to targeted drugs. *Cell Mol Life Sci* 73:1209–1224, 2016
36. Wu YC, Chang IC, Wang CL, et al. Comparison of IHC, FISH and RT-PCR methods for detection of ALK rearrangements in 312 non-small cell lung cancer patients in Taiwan. *PLoS One* 8:e70839, 2013
37. Li X, Mauro M, Williams Z. Comparison of plasma extracellular RNA isolation kits reveals kit-dependent biases. *Biotechniques* 59:13–17, 2015
38. Yatabe Y, Lantuejoul S, Thunnissen E, et al. Guidelines and standardization studies. In: *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer*. Ed. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. Editorial Rx Press, Aurora, USA 2016, pp. 95–98
39. Bubendorf L, Lantuejoul S, Yatabe Y. ALK and ROS1 analysis in cytology. In: *IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer*. Ed. Tsao MS, Hirsch FR, Yatabe Y. Editorial Rx Press, Aurora, USA 2016, pp. 85–90
40. Gainor JF, Dardei L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. *Cancer Discov* 6:1118–1133, 2016
41. Camidge DR, Pao W, Sequist LV. Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 11:473–481, 2014
42. Dagog-Jack I, Shaw AT. Crizotinib-resistance. Implications for therapeutic strategies. *Ann Oncol* 27(Suppl 3):iii42–iii50, 2016
43. Isozaki H, Takigawa N, Kiura K. Mechanisms of acquired resistance to ALK inhibitors and the rationale for treating ALK positive lung cancer. *Cancer* 7:763–783, 2015
44. Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486:532–536, 2012
45. Sabari JK, Santini FC, Bergagnini I, et al. The activity, safety and evolving role of brigatinib in patients with ALK-rearranged non-small cell lung cancers. *Oncotargets Ther* 10:1983–1992, 2017
46. Paillet E, Oulhan M, Borget I, et al. Circulating tumor cells with aberrant ALK copy number predict progression-free survival during crizotinib treatment in ALK-rearranged non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 77:2222–2230, 2017