

*"Den goda nybeten om ALK
hämmare vid lungcancer ger
hopp om möjligheten till
behandling även för barn
med neuroblastom"*

ALK VERKAR PÅ MYCN

Lovande nya forskningsresultat för barn med neuroblastom. Forskare från Sahlgrenska akademien, Umeå universitet, London och Harvard visade i olika neuroblastommodeller att samtidig hämning av ERK5 och ALK aktiviteten ger en synergistisk effekt som ökar behandlingseffekten samt nedreglerar MYCN proteinet. Är detta framtidens behandlingsmetoder vid ALK muterad cancer och vilka andra angreppspunkter har vi idag?

Mikael Johansson, Institutionen för Strålningsvetenskaper, Onkologi, Umeå Universitet, Damini Chand, Ganesh Umopathy, Ruth Palmer och Bengt Hallberg, Institutionen för Biomedicin, avdelningen för medicinsk kemi och cellbiologi, Göteborgs Universitet berättar.

Generna ALK och MYCN är involverade i många cancersjukdomar, så även i barncancerformen neuroblastom. Sjukdomen uppstår med stor sannolikhet från neuralfjärans celler av sympatiko-adrenalt ursprung, vilket innebär att sjukdomen kan visa sig i hela det sympatiska nervsystemet. De flesta primärtumörerna finns i buken, följt av hals, bröst och bäcken. Trots förbättrade kliniska behandlingar är den långsiktiga överlevnaden för barn med högrisk-neuroblastom fortfarande mindre än 40 procent och den står för cirka 15 procent av alla dödsfall hos barn med cancer¹.

Anaplastisk lymfom kinas (ALK) är en receptor tyrosinkinase (RTK) som normalt är en cellytereceptor som tar emot signaler från omgivningen. ALK är också en onkogen vid många olika cancerformer och är då muterad eller onormalt högt uttryckt. ALK inhibitorn crizotinib är idag en etablerad behandling för patienter med ALK muterad metastaserad lungcancer. Behandling med ALK inhibitorer vid lungcancer uppvisar bät-

re respons och längre överlevnad jämfört med cytostatika, men botar ännu inga lungcancerpatienter.

ALK hämmare har tyvärr inte samma positiva effekt vid behandling av ALK positiva- MYCN (myelocytomatosis viral oncogene) amplifierade neuroblastom.

Forskare från Sahlgrenska akademien har tidigare visat att normalt uttryck av ALK och oreglerat ALK-uttryck styr avläsningen av DNA i cellen och därmed produktionen av MYCN proteinet². Nu har samma forskargrupp tillsammans med forskare från Umeå universitet, London och Harvard visat att kinaset ERK5 är en viktig förmedlare av signaler från ALK till MYCN i högriskfall av ALK positiva och MYCN amplifierade experimentella neuroblastom³. Hypotetiskt borde då hämmare mot ALK eller ERK5 vara för sig vara bra behandlingar och ge möjlighet till synergistiska effekter, vilket forskargrupperna visat. Intressant nog visar det sig att vid samtidig blockering av ALK och ERK5 uppstår mycket riktigt en synergieffekt som medför att uttrycket av MYCN minskar drastiskt och cellens förmåga till tillväxt försvinner.

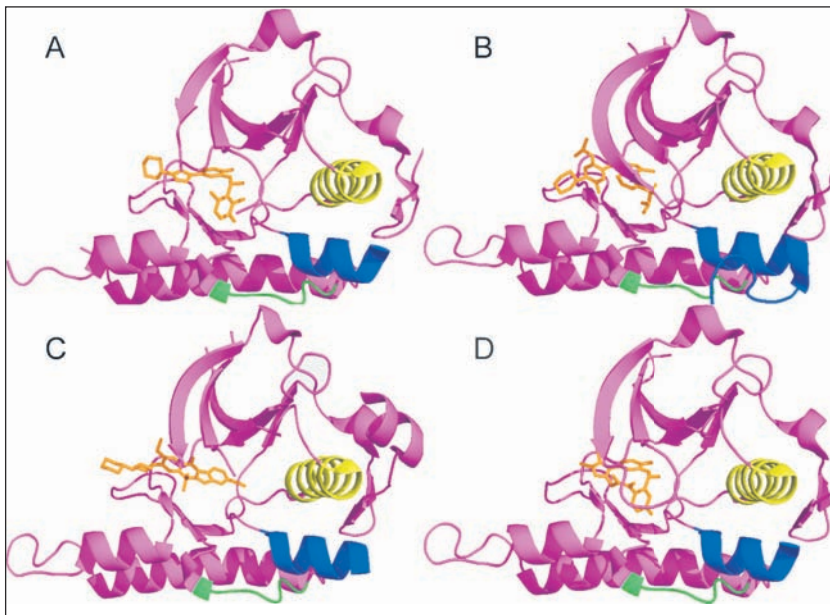
Denna synergieffekt uppstod när bara hälften så hög dos av hämmarna användes. I dagsläget är det svårt att spekulera i vad detta kan ha för betydelse för pa-

tienterna förutom bättre behandlingseffekt. Genom att använda lägre doser av hämmarna vid kombinationsbehandling kan givetvis biverkningarna av ALK hämmarna bli mindre uttalade och genom kombinationsbehandling kan möjligen resistensutveckling på sikt fördröjas.

Om vi går tillbaka endast sju år i tiden till 2007, rapporterades det att ALK var en onkogen i upp till 9% av alla fall av icke-småcellig lungcancer (NSCLC) i världen. Hos NSCLC patienter visade sig ALK genen vara re-arrangerad och den vanligaste genetiska förändringen vara en EML4-ALK translokation^{4,5}. Samma år publicerades det en artikel om en liten molekyl som kunde blockera aktivt ALK, ett precisionhämmare. Detta blev startskottet för läkemedelsindustrin att ta fram ALK-hämmare och idag finns det närmare tio olika blockerare som ingår i kliniska provningar runt omkring i världen (Fig 1)⁶.

Den första kliniskt användbara ALK hämmaren, crizotinib, prövades i en riktad fas I/II prövning vid ALK re-arrangerad icke småcellig lungcancer, NSCLC, och resultaten visade att upp till 60% av patienterna responderade på behandlingen⁷. För det första ska man vara medveten om att alla patienterna i studien hade blivit behandlade mellan två till sju gånger med andra läkemedel innan de fick crizotinib, varav ett flertal linjers

KINASDOMÄNEN AV ALK OCH DESS INTERAKTION MED NÅGRA SMÅ UTVALDA MOLEKYLER SOM TESTAS KLINISKT



Figur 1. Strukturen vidar aminosyrorna 1,903-1,400 av den intracellulära delen av ALK bundet till olika inhibitorer (orange). A, crizotinib, B LKD378, C, AF802, D, PF04463922. Banddiagrammet visar den N-terminala delen av ALK's kinasdomän. α -C helix (1,157-1,173; gul), katalutiska slingan (1,246-1,251; grön) och aktiveringsloopen (1,271-1,288; blå). Figuren är genererad med PyMol och publicerade koordinater (Protein Dara Bank code: 2PC2, 4MKC, 3AOX och 4CLI).

cytostatikabehandling i många fall. För det andra var responsen uppseendeväckande hög då NSCLC är att betrakta som en kemoterapieresistent sjukdom. Resultaten blev uppmärksammade och medförde att crizotinib snabbt godkändes av amerikanska Food and Drug Administration (FDA) 2011 och året efter av European Medicines Agency (EMA). Godkännandet i såväl Nordamerika som Europa gällde metastaserande ALK re-arrangerad NSCLC efter svikt på första linjens kemoterapi. De tidiga resultaten infriades senare i randomiserade fas III studier⁸. Analys av EML4-ALK translokationer med Fluorescent in situ hybridization (FISH) blev således snabbt en rutinanalys för alla patienter med be-

handlingsbar metastaserande NSCLC. Tillsammans med epidermal growth factor receptor (EGFR) mutationsanalyser, blev således analyser av ALK re-arrangemang den andra molekylärpatologiska prediktiva markören som på kort tid blivit rutin vid utredning av icke småskalig lungcancer. Idag har aktivitet av den första generationens ALK hämmare också noterats vid proto-oncogene tyrosine-protein kinase 1 (ROS1) re-arrangerad NSCLC⁹.

Trots de dramatiska behandlingseffekterna botas inga patienter med metastaserade NSCLC med crizotinib. Förr eller senare återkommer sjukdomen som då oftast förvärvat en resistensmutation mot crizotinib¹⁰. Tumörerna uppvisar då

nya mutationer i ALK kinasdomänen i 25% av fallen vilket leder till resistens mot läkemedlet.

Detta har naturligtvis initierat ytterligare ansträngningar från läkemedelsindustrin att ta fram effektivare hämmare som inte leder till resistensutveckling. I de andra fallen där resistens uppstår visar det sig att ALK verkar överuttryckas, vilket borde, men inte är bevisat, leda till liknande signalering som ständigt aktivt ALK. Detta kan även leda till att andra proto-onko receptorer aktiveras som en sidoeffekt av överuttrycket. Detta är inte heller bevisat idag. Andra mutationer har också observerats i andra gener vilket kan förklara en del fall av resistensutveckling.

Den goda nyheten om ALK hämmare vid lungcancer ger hopp om möjlighet till behandling även för gruppen ALK positiva-MYCN amplifierade neuroblastom patienter. Det stora flertalet av ALK positiva neuroblastom bär på en hot-spot mutation, F1174L, som också är mest frekvent i de MYCN amplifierade neuroblastomfallen. Detta är en aggressiv undergrupp med dålig prognos där nya behandlingar är av stort kliniskt värde för de drabbade barnen.

Cell- och molekylärbio-logiska undersökningar indikerar att ALK-mutationer tillsammans med MYCN amplifiering inte bara korrelerar utan även samverkar för att initiera sjukdom och tillväxt av sjukdom. Det är känt att aktivt ALK ökar initieringen av MYCN transkription, vilket leder till ökat uttryck av proteinet MYCN. Detta startar i sin tur tusentals andra processer som normalt inte ska vara påslagna, vilket ökar celltillväxten. Den ökade ALK aktiviteten medför även att MYCN proteinerna blir mer stabila så att de inte bryts sönder så snabbt. I en normal cell har MYCN proteiner en halveringstid på 20 minuter, ökas denna till en timme medför det att mängden MYCN proteiner i cellen ökar och därmed ökar även tillväxten¹¹.

Nyligen avslutades en fas-I studie av crizotinib som visade god respons hos barn med ALK translokationer i storcelligt anaplastiskt lymfom, inflammatoriskt myofibroblastiskt lymfom och NSCLC¹². Dessa sjukdomar är troligtvis framkallade av att ALK bildat ett fusionsprotein med andra gener¹³. En beviselse var dock att crizotinib hade

TEST AV ALK-HÄMMARE

Läkemedel	Utvecklare	Target	Fas
Crizotinib	Pfizer	ALK	Godkänd
Ceritinib (LDK378)	Novartis	ALK	Fas I/II/III
AF802	Chugai	ALK	Fas I/II/III
ASP3026	Astellra	ALK/EGFR	Fas I/II
AP 26113	Ariad	ALK/EGFR	Fas I/II
X396	Xcovery	ALK	Fas I

TABELL 1. Ett urval av ALK inhibitorer i klinisk utveckling. Crizotinib används kliniskt i Sverige.

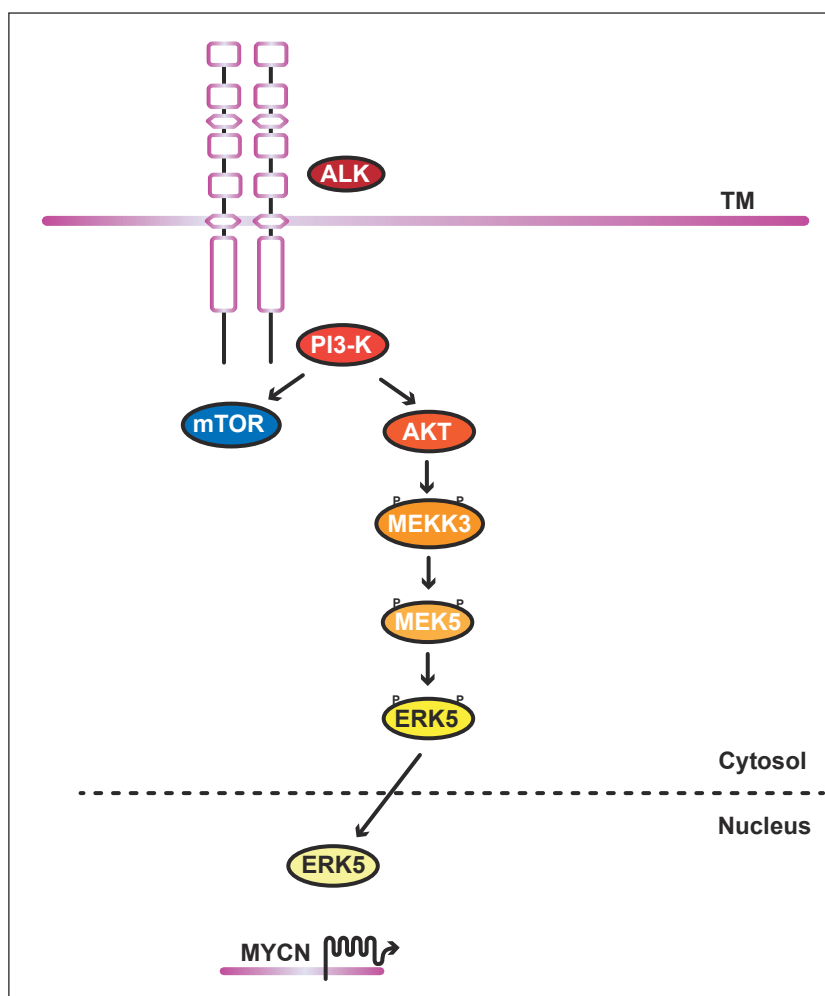
mindre god effekt mot pediatrika ALK positiva neuroblastom. En trolig anledning till detta kan vara att neuroblastom i alla kända fall har fler genetiska fel som 1p och 11q deletion och 17q amplifiering. Dessa regioner kan innehålla tumorsuppressorgener och amplifieringarna på kromosom 17 kan betyda ett överuttryck av ytterligare en proto-onkogen. Tyvärr, har vi ingen aning om vad dessa genetiska fel betyder för sjukdomsbilden idag, vare sig för initiering eller progression, men det pågår intensiv forskning på dessa regioner. En annan trolig orsak kan vara en förhöjd resistensgrad, eller att hämmarens inbindningsaffinitet till ALK är sämre hos dessa patienter. Det är känt att ALK mutation i position R1275Q kräver en högre dos av crizotinib jämfört med vildtyps ALK. En tredje orsak kan vara vetskapen att ALK aktiverar kaskader och signaler som medför att MYCN får förhöjda uttrycksnivåer. Det är känt att MYCN i sin tur aktiverar mer uttryck av ALK, en riktigt dålig autokrin loop för patienten som idag verkar svårstoppad.

ALK kan aktivera proteinet MYCN via en nyupptäckt signalkaskadväg som börjar med ALK och sedan vidare via PI3K-PKB/Akt-MEKK3-MEK5 som aktiverar ERK5, vilket leder till signaler för initiering av transkription, avläsning av oncogenen MYCN (Fig 2). Proteinet extracellulär signal-regulerad kinase 5 (ERK5) är en representant av familjen mitogenaktiverade proteinkinase (MAPK) som ofta aktiveras av receptor tyrosin kinaser (RTK). Det har visat sig att ERK5 är nödvändig för embryonal utveckling och mer specifikt för blodkärlformering¹⁴

I en nyligen publicerad studie utnyttjades denna kunskap genom att kombinera ALK hämmaren crizotinib med en preklinisk ERK5 hämmare. Studien visar att hämning av ALK kinaset medför att en mängd signalkaskadvägar stängs av, samtidigt hämmar man ett nedströms ALK-målprotein, i detta fall ERK5. I och med detta uppnås inte en additiv effekt utan en synnerligen synergistisk hämmande effekt på tillväxten av ALK beroende neuroblastomcelllinjer.

Studien visar även att tillväxten av transplanterade neuroblastom i möss

ERK5 OCH MYCN ÄR NEDSTRÖMS MÅLPROTEINER FÖR AKTIVT ALK



Figur 2. ERK5 aktiveras av ALK genom en linjär signalkaskad som börjar med att ALK aktiverar PI3-Kinase/PKB/Akt, som därefter fosforilerar MEKK2/3. Detta medför aktivering av MEK5 och ERK5. ERK5 transporteras till cellkärnan och initierar avläsning av genen MYCN tillsammans med flera andra i dagsläget icke kända aktörer.

blockeras av den kombinerade behandlingen. Inte nog med det, produktionen av MYCN proteiner slås av samtidigt. Denna nyhet är av stort intresse då MYCN är en gen som medverkar till tillväxt i flertalet cancertyper. Idag finns det ingen hämmare av varken initiering av MYCN proteiner eller av den aktivitet som MYCN har eller utför i cellen. MYCN och det snarlika MYC proteinet har studerats i mer än tre decennier och fortfarande står vi utan ledtrådar hur proteinet ska stoppas. Kan denna blockering av ERK5 vara ett mer vinnande koncept för att reducera MYC/MYCN proteiner i cellen? Studien visar inte i detalj hur ERK5 signalerar till MYCN, men den visar att ERK5 är en intressant kandidat som behandlingsbart målprotein och dess nödvändighet för MYCN

protein produktion. Är detta en framtida möjlighet för kombinationsbehandling vid ALK positiva neuroblastom i synnerhet och ALK positiv cancer i allmänhet?

Den aktuella studien stöder på en punkt en tidigare studie där det visades att monoterapi med crizotinib inte är tillräcklig utan att kombinationsbehandling har större effekt. I den studien kombinerade man ALK hämmaren crizotinib med en TORIN2 (en PI3K-AKT- mammalian target of rapamycin (mTOR) hämmare i samma typ av musmodell som i den aktuella studien. TORIN2 medför att den viktiga signalvägen för stabilisering av MYCN proteiner slås av och därmed degraderas MYCN proteinerna snabbare²². Hämmaren som används i studien av Umapathy et al är

en av de första ERK5 hämmare som visar att det finns en framtid, dock måste en mer förfinad blockerare produceras med högre affinitet och troligtvis kan specificitet också ökas för ERK5 jämfört med det som används av Umopathy et al. Däremot visar studien med klarhet att ERK5 är ett behandlingsbart målprotein plus att ERK5 har en central signaleringsroll i ultrahöggrisk neuroblastomsjukdom.

ERK5 OCH NEUROBLASTOM

Denna studie är början till mer djuplodande studier om ERK5 och dess inverkan vid sjukdomen neuroblastom. Framförallt hur ERK5 förmedlar sina signaler vidare från ALK och hur ERK5 styr initiering av MYCN avläsning. Högriskfall av neuroblastom behöver mer angreppspunkter i framtiden, eftersom en fas 1 provning med ALK hämmaren inte verkar så bra. En kombinationsbehandling skulle kunna vara en modell för framtidens behandling.

Sammantaget finns det tre sätt att generera medicin till ett givet målprotein. För det första kan man generera specifika lågmolekylära inhibitorer som till exempel ALK hämmaren crizotinib och den tidiga ERK5 hämmaren som användes i den beskrivna studien. Dessa små molekyler kan binda såväl intrasom extracellulära mål och kan ha förmågan att blockera receptorsignalering, störa interaktionen mellan två proteiner, och störa nedströms intracellulära molekyler. Den klassiska metoden för att hitta en ny liten molekyl är att screena mycket stora kemiska bibliotek. Det absolut senaste inom denna genre är att sammanfläta två små molekyler till en²³.

ALTERNATIV VÄG

En alternativ väg är att hitta nya terapeutiska indikationer för redan godkända läkemedel, men för andra sjukdomar. Flera studier har bedömt potentiella anti-cancer egenskaper hos befintliga läkemedel eller naturliga föreningar som initialt används för behandling av icke-cancersjukdomar¹⁵. På senare tid har systembiologiska metoder tillämpats för att upptäcka nya effekter för befintliga läkemedel genom att analysera stora datamängder såsom genut-

trycksprofilerna^{16,17}. I synnerhet sekvens- och strukturlikheter mellan läkemedelsmål har framgångsrikt använts för att hitta nya kliniska indikationer för existerande läkemedel.

För det andra; kan antikroppar som binder till ett extracellulärt målprotein hämma signalering effektivt. Nyligen utvecklade tekniker, såsom hybridom eller fag-display, har lett till effektiv generering av antikroppar mot givna mål¹⁸. Antikroppar mot ALK eller associerade proteiner är ännu oprövade i kliniken.

För det tredje; syntetiska peptider är en lovande klass av läkemedelskandidater. Deras egenskaper ligger någonstans mellan antikroppar och små molekyler. Det har förekommit många ansträngningar att skapa peptider som kan påverka intracellulära mål^{19,20}. På samma vis som med antikroppar har flera metoder för att på ett systematiskt vis ta fram hämmande peptider utvecklats på senare tid²¹. En framgångsrik strategi för läkemedelsmål prediktion och validering, måste omfatta både en metod för att generera en lista av malkandidater och ett systematiskt tillvägagångssätt för att validera mål med användning av en eller flera av de sätt som beskrivs ovan.

Sammanfattningsvis är ALK hämmarna här för att stanna. Effekten vid NSCLC är påtaglig och fortsatt utveckling av nya ALK hämmare kommer att förbättra resultaten ytterligare. ALK hämmare vid andra ALK drivna tumörsjukdomar som lymfom och neuroblastom kommer sannolikt inom kort att introduceras och bidra till förbättrade behandlingsresultat för dessa grupper. För att motverka resistensutveckling och ta ytterligare ett steg mot ännu längre remissioner eller till och med bot är kombinationsbehandlingar sannolikt en viktig väg att utforska. ERK inhibitorer är en sådan lovande väg som kan innebära förbättrade behandlingsresultat för patienter med ALK positiv cancer inom en snar framtid.

REFERENSER

1. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med*. 2010 Jun 10;362(23):2202–11.
2. Schönherr C, Ruuth K, Kamaraj S, Wang C-L, Yang H-L, Combaret V, et al. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene*. 2012 Dec 13;31(50):5193–200.

3. Umopathy G, Wakil El A, Witek B, Chesler L, Danielson L, Deng X, et al. The kinase ALK stimulates the kinase ERK5 to promote the expression of the oncogene MYCN in neuroblastoma. *Sci Signal*. 2014 Oct 28;7(349):ra102.
4. 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 Aug 2;448(7153):561–6.
5. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1190–203.
6. Chia PL, John T, Dobrovic A, Mitchell P. Prevalence and natural history of ALK positive non-small-cell lung cancer and the clinical impact of targeted therapy with ALK inhibitors. *CLEP*. 2014 Nov;423.
7. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010 Oct 28;363(18):1693–703.
8. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinò L, Ahn M-J, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jun 20;368(25):2385–94.
9. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014 Sep 27;:140927034510006.
10. 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 Oct 28;363(18):1734–9.
11. Chesler L, Schlieve C, Goldenberg DD, Kenney A, Kim G, McMillan A, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase destabilizes Mycn protein and blocks malignant progression in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2006 Aug 15;66(16):8139–46.
12. Mossé YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, et al. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):472–80.
13. Palmer RH, Vernersson E, Grabbe C, Hallberg B. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J*. 2009 Jun 15;420(3):345–61.
14. Nithianandarajah-Jones GN, Wilm B, Goldring CEP, Müller J, Cross MJ. ERK5: structure, regulation and function. *Cellular Signalling*. 2012 Nov;24(11):2187–96.
15. Telleria CM. Drug Repurposing for Cancer Therapy. *J Cancer Sci Ther*. 2012 Jul 21;4(7):ix–xi.
16. Peck D, Crawford ED, Ross KN, Stegmaier K, Golub TR, Lamb J. A method for high-throughput gene expression signature analysis. *Genome Biol*. 2006;7(7):R61.
17. Hu G, Agarwal P. Human disease–drug network based on genomic expression profiles. *PLoS ONE*. 2009;4(8):e6536.
18. Bradbury ARM, Sidhu S, Dübel S, McCafferty J. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. *Nat Biotechnol*. 2011 Mar;29(3):245–54.
19. Vallespi MG, Fernandez JR, Torrens I, Garcia I, Garay H, Mendoza O, et al. Identification of a novel antitumor peptide based on the screening of an Ala-library derived from the LALF(32–51) region. *J Pept Sci*. 2010 Jan;16(1):40–7.
20. Ueyama H, Horibe T, Nakajima O, Ohara K, Kohno M, Kawakami K. Semaphorin 3A lytic hybrid peptide binding to neuropilin-1 as a novel anti-cancer agent in pancreatic cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011 Oct 14;414(1):60–6.
21. Aina OH, Sroka TC, Chen M-L, Lam KS. Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers*. 2002;66(3):184–99.
22. Moore NF, Azarova AM, Bhatnagar N, Ross KN, Drake LE, Frumm S, Liu QS, Christie AL, Sanda T, Chesler L, Kung AL, Gray NS, Stegmaier K, George RE. Oncotarget. 2014 Sep 30;5(18):8737–49
23. Ostrom JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. *Nature*. 2013 Nov 28;503(7477):548–51. doi: 10.1038/nature12796