

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-4-33-41>

# Роль новой изоформы *ALK* в диагностике и таргетной терапии меланомы кожи

К.С. Титов<sup>1,2</sup>, А.А. Маркин<sup>1</sup>, А.М. Казаков<sup>3</sup>, С.В. Чулкова<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 11123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 21, корп. 3;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а

**Контакты:** Александр Андреевич Маркин [markinalexander1993@yandex.ru](mailto:markinalexander1993@yandex.ru)

Открытия фундаментальной науки последних десятилетий в области онкологии привели к появлению новых высокоэффективных противоопухолевых препаратов: таргетных и ингибиторов иммунных контрольных точек, применение которых вызвало прорыв в лечении онкологических заболеваний, особенно в терапии меланомы кожи. Меланома по-прежнему остается одной из самых злокачественных опухолей. Каждый год в мире увеличивается доля пациентов, резистентных к таргетной терапии и иммунотерапии. У онкологов остается крайне мало опций лечения меланомы после развития резистентности к лекарственной терапии. На данный момент одними из самых распространенных препаратов в лечении меланомы кожи являются BRAF-/MEK-ингибиторы, поскольку мутация *BRAF* в меланоме обнаруживается у 40–60 % пациентов. Однако через 6–8 мес может возникнуть резистентность к данной таргетной терапии у половины таких пациентов. В связи с этим ученые всего мира ищут новые молекулярные мишени для таргетных препаратов, одним из подходов может служить ингибирование новой изоформы киназы анапластической лимфомы (*ALK*).

Цель исследования – систематизировать данные ведущих исследований по изучению новой изоформы *ALK* и определить наиболее перспективные направления ее дальнейшего изучения.

В работе проанализированы 6 наиболее крупных исследований за последние 5 лет, посвященных новой изоформе *ALK*.

Совместное ингибирование новой изоформы *ALK* и *BRAFV600* показало положительные результаты в нескольких исследованиях с различными уровнями экспрессии *ALK<sup>ATL</sup>* (альтернативная инициация транскрипции *ALK*). Новая изоформа *ALK* может стимулировать онкогенез только в пределах определенного «порогового» уровня экспрессии. Иммуногистохимическое исследование не может быть основным методом определения экспрессии новой изоформы *ALK* ввиду его низкой чувствительности. Практически во всех исследованиях установлено, что опухоли с транслокацией *ALK* отвечали на терапию ингибиторами *ALK*.

Несмотря на то что в последние годы активно изучается роль новой изоформы *ALK*, до сих пор не определен оптимальный метод оценки экспрессии *ALK<sup>ATL</sup>* в рутинной практике. Для понимания эффективности применения ингибиторов *ALK* в комбинации с BRAF- и ERK-ингибиторами необходимы дополнительные исследования. Кроме того, представляют интерес блокада способствующих развитию резистентности к терапии внеклеточных везикул и изучение роли интерлейкина 3 в ингибировании *ALK<sup>ATL</sup>*.

**Ключевые слова:** метастатическая меланома, таргетная терапия, ингибиторы BRAF, *ALK* (киназа анапластической лимфомы), *ALK<sup>ATL</sup>* (альтернативная инициация транскрипции *ALK*), *BRAFV600*, лекарственная резистентность

**Для цитирования:** Титов К.С., Маркин А.А., Казаков А.М., Чулкова С.В. Роль новой изоформы *ALK* в диагностике и таргетной терапии меланомы кожи. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(4):33–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-33-41.

## The role of a new *ALK* isoform in the diagnosis and targeted therapy of skin melanoma

Konstantin S. Titov<sup>1,2</sup>, Alexander A. Markin<sup>1</sup>, Alexey M. Kazakov<sup>3</sup>, Svetlana V. Chulkova<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Entuziastov Shosse, Moscow 11123, Russia;

<sup>2</sup>RUDN University; Bld. 3, 21 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

<sup>3</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>4</sup>N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1a Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

**Contacts:** Alexander Andreevich Markin [markinalexander1993@yandex.ru](mailto:markinalexander1993@yandex.ru)

Contemporary discoveries of fundamental science in recent decades in the field of oncology have led to the emergence of new highly effective anticancer drugs: targeted drugs and immune checkpoint inhibitors, use of which has made a breakthrough in the treatment of oncological diseases, including skin melanoma. Melanoma is still one of the most cancerous tumors. The number of patients resistant to targeted therapy and immunotherapy increases in the world every year. Oncologists have practically no leverage to influence the disease after the development of resistance to this type of therapy. In this regard, scientists around the world are looking for new application points for targeted drugs. Nowadays, the most common treatment method is BRAF inhibitors, since the *BRAF* mutation is detected in 40–60 % of patients with skin melanoma. However, the resistance to BRAF inhibitor therapy occur in half cases after 6–8 months. To overcome the resistance to the target therapy is one the most important issue, the studying of new isoform of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) may help to solve this problem.

Purpose of the study – to order the data of the leading researchers of a new isoform of *ALK*, and reveal the most promising directions for its further progress.

In the article, there are comparisons and analyses the 6 of the largest studies over the past 5 years devoted to a new isoform of *ALK*.

The joint inhibition of the new *ALK* isoform and *BRAFV600* showed positive results in several studies with different levels of *ALK<sup>ATI</sup>* expression (alternative initiation of *ALK* transcription). The new *ALK* isoform can stimulate oncogenesis only within a certain “threshold” level of expression. Immunohistochemical examination cannot be the main method for determining the expression of a new *ALK* isoform due to low sensitivity. In almost all studies, tumors with *ALK* translocation responded to therapy with *ALK* inhibitors.

Even though that the role of the new *ALK* isoform has been studied in recent years, the optimal method for evaluating the expression of *ALK<sup>ATI</sup>* in routine practice has not yet been determined. Additional studies are also needed to understand the effectiveness of the use of *ALK* inhibitors in combination with BRAF and ERK inhibitors. Of interest is the blockade of extracellular vesicles and the study of the role of interleukin-3 in the inhibition of *ALK<sup>ATI</sup>*.

**Key words:** metastatic melanoma, targeted therapy, BRAF inhibitors, *ALK* (anaplastic lymphoma kinase), *ALK<sup>ATI</sup>* (alternative initiation of *ALK* transcription), *BRAFV600*, drug resistance

**For citation:** Titov K.S., Markin A.A., Kazakov A.M., Chulkova S.V. The role of a new *ALK* isoform in the diagnosis and targeted therapy of skin melanoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(4):33–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-4-33-41.

## Введение

По данным международных эпидемиологических исследований, отмечается стремительный рост заболеваемости меланомой кожи во всем мире – в среднем на 10 % в год [1]. В России за последние 10 лет заболеваемость меланомой кожи увеличилась на 28,72 % и по общему приросту среди всех злокачественных образований кожи занимала 2-е место [2].

Меланома относится к злокачественным опухолям наружных локализаций, но, несмотря на это, она занимает ведущие позиции в структуре смертности от онкологических заболеваний во многих странах мира [3]. Меланома часто отличается крайне агрессивным течением. Даже при современном уровне развития медицины, диагностических и лечебных технологий каждый 3-й случай меланомы заканчивается летальным исходом [4]. Это обусловлено выраженным инвазивным потенциалом опухолевых клеток меланомы и, как следствие, высоким риском прогрессирования, особенно у больных с ПС–ПНД стадиями, у которых, несмотря на использование совре-

менных режимов лекарственной терапии, диссеминация меланомы наблюдается в первые 2 года [5]. Одной из причин агрессивности течения меланомы, ее устойчивости к проводимой терапии является наличие популяции опухолевых стволовых клеток, которые имеют абберантные фенотипы с экспрессией маркеров резистентности и характеризуются нарушениями различных сигнальных путей [6–8]. Известно, что клетки меланомы, экспрессирующие CD271, обуславливают резистентность к терапии BRAF-ингибиторами [9]. Необходимо отметить, что изучению сигнальных путей, экспрессии различных генов, молекулярных детерминант опухолевых клеток, участвующих в поддержании выживаемости клеток меланомы и способствующих прогрессии этой опухоли, посвящено немало исследований, которые не только раскрывают уникальное фенотипическое разнообразие меланомы, но и подчеркивают важность разнообразных лечебных подходов [10–12].

Особенно сложной задачей является лечение метастатической меланомы, которая требует комплексного

лечебного подхода, один из компонентов которого — хирургический метод [13]. К сожалению, метастатическая меланома прогностически крайне неблагоприятна, поскольку даже использование новейших таргетных и иммуотропных препаратов не позволяет достичь стойкой ремиссии. Развивающаяся резистентность меланомы к проводимой терапии лишает возможности продолжить лечение такой категории больных. Таким образом, на сегодняшний день существует острая необходимость разработки возможных диагностических и прогностических маркеров, которые в будущем могли бы стать потенциальной мишенью лекарственной терапии. Одним из перспективных маркеров является *ALK* (Anaplastic lymphoma kinase) — мутация, исследованная при других опухолях (немелкоклеточном раке легкого, анапластической карциноме щитовидной железы, раке яичников, раке молочной железы и др.) и выявляемая при первичной меланоме кожи в 2–8 % случаев [14]. Существуют 3 изоформы мутантной *ALK* — *ALK<sup>ΔT1</sup>*, *ALK<sup>wt</sup>*, *EML4-ALK*, различающиеся по механизму образования [15, 16]. Мутантная *ALK* содержит преимущественно интрацеллюлярный домен и обладает повышенной способностью к аутоактивации, что вызывает неконтролируемое деление клеток [17]. Интересно, что мутация *ALK* может встречаться как отдельно, так и в комбинации с мутацией *BRAF*. Известно, что у половины больных, получающих таргетную терапию ингибиторами *BRAF*, через 6–8 мес развивается резистентность [18]. Предполагается, что *ALK<sup>ΔT1</sup>* является одним из механизмов резистентности к *BRAF*-ингибиторам [19]. Это открывает новые перспективы в преодолении данного вида лекарственной устойчивости.

**Цель исследования** — систематизировать данные ведущих исследований по изучению новой изоформы *ALK* и определить наиболее перспективные направления ее дальнейшего изучения.

В работе проведен анализ 6 наиболее крупных исследований за последние 5 лет, посвященных новой изоформе *ALK*: T. Wiesner и соавт. (2015) [20], K.J. Busam и соавт. (2016) [21], K.L. Coutts и соавт. (2017) [22], G. Cesi и соавт. (2018) [19], H.T. Niu и соавт. (2020) [23], K.K. Shah и соавт. (2020) [24].

### Строение *ALK*

В конце 80-х годов прошлого столетия была описана повторяющаяся транслокация t(2;5)(p23;q35) в части CD30-позитивных анапластических крупноклеточных лимфом. В 1994 г. был обнаружен рекомбинантный белок слияния трансмембранного рецептора тирозинкиназы анапластической лимфомы (*ALK*) и нуклеофозмина (*NPM*), кодируемый соответствующим геном и названный киназой анапластической лимфомы. В дальнейших исследованиях

обнаружено более десятка генов слияния транслокаций *ALK* [25].

Рецептор *ALK* участвует в миграции, пролиферации и выживании клеток через активацию путей Ras/Raf/MEK/ERK1/2, JAK/STAT, PI3K/Akt и PLC-γ15-8. Белок *ALK* состоит из 1620 аминокислот, включает в себя внеклеточный домен для связи с 2 лигандами *ALK* (мидкин и плеiotропин), одноцепочечный трансмембранный рецептор и внутриклеточный домен [26, 27]. Белок *ALK* должен быть неактивен у взрослых, так как физиологически экспрессируется только во время эмбриогенеза в нервной системе [26, 28, 29]. С помощью секвенирования последнего поколения обнаружено более 20 различных слияний генов. Наиболее часто встречается слияние *NPM1-ALK*, на долю которого приходится до 80 % от всех *ALK*-транслокаций. Перестройки гена *ALK* с участием *EML4* гораздо чаще встречаются при немелкоклеточном раке легких, чем при других опухолях. Транслокации *EML4-ALK* (echinoderm microtubule-associated protein like 4) имеют более 10 различных вариантов, но в большинстве случаев сосредоточены на интроне 19 [30].

Редкие перестройки в генах *ALK* встречаются и в других новообразованиях, например при колоректальном раке, раке молочной железы, почечно-клеточном раке, раке пищевода, яичников, анапластической карциноме щитовидной железы, диффузной В-клеточной лимфоме и злокачественных новообразованиях кожи [31]. Во всех вариантах транслокации *ALK*, в то время как С-терминальный домен киназы *ALK* не изменен, на N-терминальном конце находятся активированные промоторы различных генов, усиливающие экспрессию белков слияния. Таким образом, уровень экспрессии *ALK* зависит от генов слияния. Это также может объяснить разную чувствительность различных белков слияния *ALK* к ингибиторам тирозинкиназы [32].

Химерные белки *ALK* активируют множество путей, в том числе PI3K/AKT и MEK/ERK, влияющих на клеточную пролиферацию и апоптоз. Однако, помимо транслокаций, ген *ALK* может участвовать в других генетических изменениях. Амплификации гена *ALK* со сверхэкспрессией белка *ALK* были обнаружены в различных опухолях, включая меланому, мелкоклеточный рак легких, нейробластому, глиобластому, рабдомиосаркому, рак яичников, молочной железы, астроцитому, саркому Юинга и ретинобластому. Сверхэкспрессия белка *ALK* встречается редко, поэтому чрезмерная экспрессия *ALK* может быть вызвана как известными, так и неизвестными генетическими механизмами [33].

### Новая изоформа

В 2015 г. в журнале Nature были опубликованы результаты исследования T. Wiesner и соавт., в котором

определили в 11 % тканей меланомы изменение в инициации транскрипции, расположенное в интроне 19, что приводит к экспрессии новой усеченной изоформы *ALK* – *ALK<sup>ATI</sup>* (alternative transcription initiation, ATI), которая включает в себя длинный конечный повтор (LTR) в интроне 19 и длинную цепь в интроне 18 [20]. Было изучено более 5000 образцов из 15 различных типов опухолей для определения участков альтернативной инициации транскрипции (ATI). *ALK<sup>ATI</sup>* была обнаружена в 1600 образцах методом секвенирования РНК. Мутации F1174L (*ALK<sup>F1174</sup>*) и EML4–*ALK* были обнаружены, главным образом, в цитоплазме или на клеточной мембране. Иммуногистохимически подтверждена ядерная и цитоплазматическая локализация *ALK<sup>ATI</sup>*. Была обнаружена онкогенная способность дикого типа, которая согласуется с предыдущими сообщениями о том, что высокая эндогенная экспрессия или геномная амплификация *ALK* стимулирует онкогенез. Однако установлено, что повышение уровня экспрессии *ALK<sup>ATI</sup>* не ускоряет формирование и рост опухолевого трансплантата, что указывает на то, что *ALK<sup>ATI</sup>* может стимулировать онкогенез только в пределах порога экспрессии. Также продемонстрирован ответ пациентов с мутацией *ALK<sup>ATI</sup>* на терапию стандартными ингибиторами *ALK* [20].

#### Встречаемость *ALK* и методы исследования

Первое время считалось, что мутация *ALK<sup>ATI</sup>* встречается только в меланоме Шпица [20]. В 2016 г. K.J. Busam и соавт. [21] попытались определить, может ли *ALK* экспрессироваться в других меланоме, и изучили экспрессию *ALK<sup>ATI</sup>* в метастатической меланоме кожи. Однако в своем исследовании они использовали иммуногистохимический (ИГХ) метод на 1-м этапе, из-за чего *ALK<sup>ATI</sup>*-экспрессия была обнаружена лишь в 7 (2,3 %) первичных и 9 (3 %) метастатических опухолях; 5 из 7 опухолей были узловыми меланомами [21]. Такой низкий процент заставил задуматься о целесообразности выявления данной мутации.

В 2017 г. K.L. Couts и соавт. исследовали 45 меланом методом полимеразной цепной реакции и обнаружили, что 24,4 % меланом экспрессировали *ALK*; в 7 из 45 меланом выявлена *ALK<sup>ATI</sup>*, причем гистологически это были абсолютно разные опухоли (3 узловые, 2 слизистые, 1 поверхностная и 1 акральная) [22]. Такие результаты обнадеживают, несмотря на малую выборку пациентов, так как секвенирование — слишком дорогостоящий метод для использования в рутинной практике, а ИГХ-метод имеет низкую чувствительность (55 %), по данным некоторых исследований [24].

Стоит отметить, что, по данным сравнительного изучения мутаций *ALK* ИГХ-методом с несколькими клономми моноклональных антител и методом *ALK*-

FISH, лучшие результаты показал ИГХ-метод с использованием моноклонального антитела клона D5F3A (Cell signaling) [34]. Однако в данном исследовании оценивали опухоли легкого и изучалась только транслокация *ALK*. При изучении экспрессии *ALK* у больных меланомой A. Uguen и соавт. [35] не выявили ни одной мутации в серии из 133 больных с метастазами, используя ИГХ-метод с моноклональным антителом клона 5A4 (Novocastra).

В исследовании I. Yeh и соавт. обнаружена лишь 1 мутация слияния *SDHA-ALK* (ни одной экспрессии *ALK<sup>ATI</sup>*) при изучении 122 акральных меланом [36]. По данным G. Cesi и соавт. [19], ИГХ-метод определяет наличие мутации лишь при ее выраженном проявлении (3+). Также они провели изучение данных о пациентах с меланомой, используя базы данных TCGA. Установлено, что у 203 из 470 пациентов имеется мутация *BRAFV600*, у 111 (23,6 %) пациентов — мутация в *ALK*, а в 41 случае мутации установлены в обоих генах [28].

В таблице представлены результаты основных исследований новой изоформы *ALK*.

#### Роль ингибиторов *ALK* при лечении пациентов с мутациями гена *ALK* в меланоцитарных опухолях

Учитывая успех таргетной терапии у пациентов с транслокацией *ALK* при немелкоклеточном раке легкого и наличие клинически эффективных ингибиторов *ALK*, в последних исследованиях ученые стремились выявить меланомы с измененными *ALK* и проанализировать эффективность их ингибиторов.

Уже в исследовании T. Wiesner и соавт. была продемонстрирована терапевтическая эффективность ингибиторов *ALK*: авторы отмечали регрессию опухоли в ответ на все ингибиторы *ALK* [20]. Можно было бы сказать, что все исследования проводились на клеточных линиях (NIN3T3, Ba/F3 и melan-a), которые экзогенно экспрессируют *ALK<sup>ATI</sup>*, а не на клеточных линиях меланомы человека или опухолях, имеющих эндогенную экспрессию *ALK<sup>ATI</sup>*. Однако у пациента с отрицательной динамикой на фоне иммунотерапии ипилимумабом и ниволумабом, паллиативного облучения метастазов и химиотерапии дакарбазином наблюдали выраженную регрессию опухоли на фоне ингибиторов *ALK*. Несмотря на это, результаты последующих исследований оказались противоречивыми [22, 25].

Так, уже в 2017 г. K.L. Couts и соавт. показали, что опухоли с транслокацией EML4–*ALK* отвечали на ингибиторы *ALK*, в то время как опухоли с *ALK<sup>ATI</sup>* никак не реагировали на эти препараты [22]. Все проанализированные в работе меланомы, экспрессирующие *ALK<sup>ATI</sup>*, имели сопутствующую мутацию или слияние в 1 из распространенных генов-драйверов



Сравнение основных исследований новой изоформы ALK (2015–2020 гг.)  
Comparison of the main studies of a new isoform of ALK (2015–2020)

Характеристика Characteristic	Т. Wiesner и соавт. (2015) [3] T. Wiesner et al. (2015) [3]	К.Л. Coutts и соавт. (2017) [5] K.L. Coutts et al. (2017) [5]	Г. Cesi и соавт. (2018) [2] G. Cesi et al. (2018) [2]	Н.Т. Ниу и соавт. (2020) [6] H.T. Niu et al. (2020) [6]	К.К. Шах и соавт. (2020) [7] K.K. Shah et al. (2020) [7]
Исследовано меланом Researched melanomas	334	45	Отобрано $26 \times 10^3$ клеток A375X1 из 20 клонов. В 4 (15 %) из 26 случаев выявлена мутация ALK, во всех из них выявлена мутация BRAF 26 × 10 <sup>3</sup> A375X1 cells were selected from 20 clones. In 4 (15 %) out of 26 cases, an ALK mutation was detected. And the BRAF mutation was detected in all of them	30 образцов азиатской популяции 30 samples of the Asian population	324 (153 опухоли пациентов с III стадией и 171 опухоль от пациентов с IV стадией) 324 (153 tumors from patients of stage III and 171 tumors from patients of stage IV)
Метод исследо- вания Method of investigation	RNA-seq, ИГХ-метод с D5F3 (Cell Signaling) Immuno-histological analysis with D5F3 (Cell Signaling)	qRT-PCR с подтверждением иммуноблоттингом qRT-PCR confirmed by immunoblotting	Определение микроРНК с последующей ПЦР, ИГХ-метод с D5F5 Determination of microRNAs followed by PCR. Immuno-histological analysis with D5F5	Флуоресцентная гибридизация in situ, ИГХ-метод с D5F3 Fluorescence in situ hybridization, Immuno-histological analysis with D5F3	ИГХ-метод с D5F3 (чувствительность – 52,2 %, специфичность – 100 %), NanoString (чувствительность – 81,5 %, специфичность – 84,9 %), Immuno-histological analysis with D5F3 (sensitivity 52.2 %, specificity 100 %), NanoString (sensitivity 81.5 %, specificity 84.9 %)
Выявление ALK ALK detection	11,34 % ALK в 7 (2,3 %) первичных и 9 (3 %) метастатических опухолях ALK in 7 (2.3 %) primary and 9 (3 %) metastatic tumors	11 (24,4 %) из 45 метаном экспрессировали ALK; 4 (8,9 %) из 45 – ALK <sup>wt</sup> , 7 (15,6 %) из 45 – ALK <sup>wt</sup> и 1 (2,2 %) из 45 – EML4-ALK 11 (24.4 %) out of 45 melanomas expressed ALK. In 4 (8.9 %) out of 45 – ALK <sup>wt</sup> , in 7 (15.6 %) out of 45 – ALK <sup>wt</sup> and 1 (2.2 %) out of 45 – EML4-ALK	–	Транслокация ALK в 4 (13,3 %) образцах ALK translocation was detected in 4 (13.3 %) samples	Экспрессия ALK выявлена в 23 опухолях ИГХ-методом, в 37 – методом NanoString; ALK <sup>wt</sup> – в 12,7 % опухолей III стадии и в 4,8 % – IV стадии ALK expression was detected in 23 tumors by Immuno-histological analysis and in 37 by NanoString. ALK <sup>wt</sup> in 12.7 % of stage III and 4.8 % at stage IV

Окончание таблицы  
End of table

Характеристика Characteristic	T. Wiesner и соавт. (2015) [3] T. Wiesner et al. (2015) [3]	K.J. Busam и соавт. (2016) [4] K.J. Busam et al. (2016) [4]	K.L. Coutts и соавт. (2017) [5] K.L. Coutts et al. (2017) [5]	G. Cesi и соавт. (2018) [2] G. Cesi et al. (2018) [2]	H.T. Niu и соавт. (2020) [6] H.T. Niu et al. (2020) [6]	K.K. Shah и соавт. (2020) [7] K.K. Shah et al. (2020) [7]
Тип опухоли Type of tumor	Опухоли Шпица Spitz tumors	В 5 из 7 первичных опухолей $ALK^{AT}$ обнаружена в узловых меланомах, 1 — в подногтевой In 5 out of 7 primary tumors, $ALK^{AT}$ were found in nodular melanomas, 1 in the subarticular	2 слизистые, 1 поверхностная, 1 акральная, 3 узловые 2 mucous, 1 superficial, 1 acral, 3 nodular	—	—	Без гистологического определения Without histological determination
Использованные лекарственные препараты Drugs were used	Кризотиниб, перитиниб, TAE-684 Crizotinib, ceritinib, TAE-684	—	Кризотиниб, перитиниб, энтректиниб, ASP3046, алектиниб; траметиниб, вемурафениб Crizotinib, ceritinib, entrectinib, ASP3046, alectinib, trametinib, vemurafenib	PLX4032 (вемурафениб) в сочетании с кризотинибом, перитинибом, ASP3026 PLX4032 (vemurafenib) with crizotinib, ceritinib and ASP3026	—	—
Ответ на лечение Response to medications	Кризотиниб: выраженное улучшение и уменьшение опухоли в течение 6 недель терапии метастатической опухоли с делецией $CDKN2A$ и $PTEN$ (без интерлейкина 3) Treatment with crizotinib resulted in a marked symptomatic improvement and reduction of the tumor during 6 weeks of therapy of metastatic tumor with $CDKN2A$ and $PTEN$ deletion (without interleukin 3)	—	Ответ на траметиниб без выигрыша от добавления кризотиниба. Слияние $EML4-ALK$ и $ALK^{AT}$ продемонстрировало сильный ответ на оба ингибитора. А ингибирование только $ALK^{AT}$ не показало результатов The answer to trametinib without the benefit of adding crizotinib. The fusion of $EML4-ALK$ and $ALK^{AT}$ demonstrated a strong response to both inhibitors. And inhibition of only $ALK^{AT}$ did not show results	Комбинация ингибиторов $ALK$ и вемурафениба эффективна в резистентных клетках меланомы The combination of $ALK$ inhibitors and vemurafenib is effective in resistant melanoma cells	—	Ингибиторы BRAF/MEK с $ALK$ — у 4 пациентов с мутациями $BRAF/ALK$ отмечен начальный ответ, но затем прогрессия. Уровни экспрессии $ALK^{AT}$ в этой подгруппе пациентов были низкими Four patients with $BRAF/ALK$ mutations were treated with inhibitors $BRAF/MEK$ with $ALK$ and showed the initial response, but then progressed. Levels of $ALK^{AT}$ expression in this subgroup of patients were low

**Примечание.** ИГХ-метод — иммуногистохимический метод; ПЦР — полимеразная цепная реакция.  
Note. PCR — polymerase chain reaction.

меланомы (*BRAF*, *NRAS*, *GNAI1*). Было предположено, что наличие дополнительного драйвера онкогена может предотвращать ответ на ингибирование ALK, но комбинация ингибитора ALK с ингибитором MEK на клеточной линии меланомы, содержащей слияние *AGK-BRAF*, не улучшила чувствительность к ингибиторам ALK. Интересно, что ни в одной опухоли не было обнаружено *ALK<sup>ATP</sup>* совместно с *BRAFV600* [22].

В 2018 г. группа исследователей из Люксембурга опубликовала свой опыт в журнале *Molecular Cancer* [19]. Авторы анализировали гиперэкспрессию белка усеченной формы ALK (*ALK<sup>RES</sup>*) как новый механизм приобретения лекарственной устойчивости в клетках меланомы. В исследовании показано, что угнетение *ALK<sup>RES</sup>*-экспрессирующих резистентных клеток меланомы ингибиторами siRNA или ALK в комбинации с любым из ингибиторов BRAF или MEK приводит к эффективному подавлению роста клеток и запуску апоптоза.

G. Cesi и соавт. впервые установили, что экспрессирующийся *ALK<sup>RES</sup>* выделяется во внеклеточные везикулы (extracellular vesicles, EVs) и переносится на чувствительные ALK-отрицательные клетки меланомы. Там *ALK<sup>RES</sup>* функционирует при активации сигнального пути MAPK и таким образом участвует в передаче лекарственной устойчивости. Наконец, при комбинированном использовании ингибиторов BRAF и ALK у мышей с *ALK*-положительными опухолями образования резко уменьшались в объеме. Было установлено, что *ALK* является драйвером резистентности в субклоне BRAF-резистентных клеток. На примере транслокации с вирусной последовательностью мышинного лейкоза было показано, что к усеченному белку приводит лишение N-концевой части (экзоны 1–17). Чтобы определить реакцию на лекарства, было протестировано 3 различных ингибитора ALK в комбинации с ингибитором BRAF. Как и ожидалось, комбинированный режим работает эффективно, а ингибирование в монорежиме не оказывало никакого влияния на рост резистентных клеток, если фосфорилирование *ERK* не было блокировано. Таким образом, комбинированное ингибирование BRAF и ALK может иметь непосредственное клиническое значение для тех пациентов, которые приобрели вторичные мутации дополнительно к *ALK*, или для тех, кто несет *BRAFV600E* вместе с онкогенной изоформой *ALK* и проявляет внутреннюю устойчивость к ингибитору BRAF в монорежиме [19]. Передача фенотипических признаков через EVs — это развивающаяся область исследований [37].

В апреле 2020 г. K.K. Shah и соавт. провели исследование экспрессии *ALK<sup>ATP</sup>* и ответа на терапию у пациентов с меланомой [24]. Из 324 пациентов только у 4 были одновременно мутации *ALK* и *BRAF*, и они

были выбраны кандидатами для комбинированной терапии BRAF/ALK. Пациенты получали ингибитор BRAF или комбинированный ингибитор BRAF/MEK и изначально показывали ответ на комбинацию с *ALK*, но впоследствии наступило прогрессирование заболевания, в отличие от результатов, полученных G. Cesi и соавт. [19]. Интересно, что экспрессия *ALK<sup>ATP</sup>* у этих 4 пациентов была на низком уровне и ни в одном случае не наблюдали уровня экспрессии ALK, прогнозирующего чувствительность к монотерапии (сильное диффузное окрашивание) [24].

### Обсуждение

Возможно, *ALK<sup>ATP</sup>* является одним из механизмов резистентности к BRAF-ингибиторам. Совместное ингибирование *ALK<sup>ATP</sup>* и *BRAFV600* показало положительные результаты в нескольких исследованиях [26, 27]. Учитывая полученные в исследовании T. Wisner и соавт. данные о том, что *ALK<sup>ATP</sup>* может стимулировать онкогенез только в пределах определенного «порогового» уровня экспрессии, низкий уровень экспрессии *ALK<sup>ATP</sup>* в сочетании со статусом *BRAF* также может служить биомаркером устойчивости к BRAF-и пользы от назначения ALK-ингибиторов.

По данным K.K. Shah, экспрессия *ALK<sup>ATP</sup>* в метастатических опухолях оказалась ниже, чем в первичных, что может свидетельствовать о потере данной мутации с развитием болезни. Практически во всех исследованиях ингибиторы ALK работали при транслокации *ALK* в клетках меланомы [24].

Дополнительный интерес представляет блокада внеклеточных везикул (EVs) и изучение роли интерлейкина 3 в ингибировании *ALK<sup>ATP</sup>*, поскольку в исследовании T. Wisner и соавт. в присутствии интерлейкина 3 возникала резистентность к ингибиторам ALK.

В настоящее время идет II фаза исследования эффективности ингибиторов ALK в лечении пациентов с меланомой и изменениями *ALK* или ее гиперэкспрессией [38].

### Заключение

Иммуногистохимическое исследование не может быть основным методом определения экспрессии *ALK<sup>ATP</sup>* ввиду низкой чувствительности метода. Учитывая возможный эффект ингибиторов ALK на фоне низкой экспрессии *ALK<sup>ATP</sup>* с сопутствующей мутацией *BRAFV600*, важность определения низкой экспрессии *ALK<sup>ATP</sup>* возрастает.

Требуются дополнительные исследования для определения оптимального, недорогого метода оценки *ALK<sup>ATP</sup>* в рутинной практике, способного детектировать низкий уровень экспрессии; кроме того, необходимо продолжить поиск способов ингибирования данной генетической мишени.

## Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Karimkhani C., Green A.C., Nijsten T. et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease study 2015. *Br J Dermatol* 2017;177(1):134–40.
2. Потекаев Н.Н., Титов К.С., Маркин А.А., Кашурников А.Ю. Эпидемиология меланомы кожи в Российской Федерации и в городе Москве за 10 лет (2008–2018 гг.). *Клиническая дерматология и венерология* 2020;19(6):810–6. [Potekaev N.N., Titov K.S., Markin A.A., Kashurnikov A.S. Epidemiology of skin melanoma in the Russian Federation and in Moscow for 10 years (2008–2018). *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya* = Russian Journal of Clinical Dermatology and Venereology 2020;19(6):810–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17116/klinderma202019061810.
3. Melanoma of skin. Globocan, 2020. Available at: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/16-Melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>.
4. Чулкова С.В., Маркина И.Г., Чернышева О.А. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в развитии лекарственной резистентности меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(2):6–14. [Chulkova S.V., Markina I.G., Chernysheva O.A. et al. The role of tumor stem cells in the development of drug resistance of melanoma. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(2):6–14. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-6-14.
5. Михеева О.Ю., Титов К.С., Серяков А.П. и др. Метастатическое поражение кожи при меланоме. Злокачественные опухоли 2016;3:37–43. [Mikheeva O.Y., Titov K.S., Seryakov A.P. et al. Melanoma skin metastasis. *Zlokachestvennye opukholi* = Malignant Tumours 2016;3:37–43. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-3-37-43.
6. Титов К.С., Барышникова М.А., Казаков А.В. и др. Прогностическое значение стволовых клеток опухоли и экспрессии ALK у пациентов с первичной меланомой кожи. *Практическая онкология* 2019;20(1):72–9. [Titov K.S., Baryshnikova M.A., Kazakov A.M. et al. Prognostic significance of stem cells tumors and ALK expression in patients with primary skin melanoma. *Prakticheskaya onkologiya* = Practical oncology 2019;20(1):72–9. (In Russ.)]. DOI: 10.31917/2001072.
7. Чулкова С.В., Маркина И.Г., Антипова А.С. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в канцерогенезе и прогнозе меланомы. *Вестник Российского научного центра рентгенодиагностики* 2018;18(4):100–16. [Chulkova S.V., Markina I.G., Antipova A.S. et al. The role of stem tumor cells in carcinogenesis and prognosis of melanoma. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii* = Bulletin of the Russian Scientific Center of X-ray Radiology 2018;18(4):100–16. (In Russ.)].
8. Topczewska J.M., Postovit L.M., Margaryan N.V. et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* 2006;12(8):925–32. DOI: 10.1038/nm1448.
9. Lehraiki A., Cerezo M., Rouaud F. et al. Increased CD271 expression by the NF- $\kappa$ B pathway promotes melanoma cell survival and drives acquired resistance to BRAF inhibitor vemurafenib. *Cell Discov* 2015;1:15030. DOI: 10.1038/celldisc.2015.30.
10. Ротин Д.Л., Титов К.С., Казаков А.М. Васкулогенная мимикрия при меланоме: молекулярные механизмы и клиническое значение. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(1):16–24. [Rotin D.L., Titov K.S., Kazakov A.M. Vasculogenic mimicry in melanoma: molecular mechanisms and clinical significance. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(1):16–24. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-16-24.
11. Chernysheva O., Markina I., Demidov L. et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells* 2019;8(6):627. DOI: 10.3390/cells8060627.
12. Чулкова С.В., Рябчиков Д.А., Дудина И.А. и др. Перспективы использования микроРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(4):51–6. [Chulkova S.V., Ryabchikov D.A., Dudina I.A. et al. The Prospects for the use of microRNA as diagnostic and prognostic melanoma biomarkers. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(4):51–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-51-56.
13. Титов К.С., Михеева О.Ю., Казаков А.М., Егорова А.В. Роль хирургии в лечении отдаленных метастазов меланомы кожи. *Злокачественные опухоли* 2016;3(3):27–33. [Titov K.S., Mikheeva O.Y., Kazakov A.M., Egorova A.V. The role of surgery in the treatment of distant metastases of skin melanoma. *Zlokachestvennye opukholi* = Malignant Tumours 2016;3(3):27–33. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-3-27-33.
14. Титов К.С., Ротин Д.Л., Казаков А.М. и др. Частота экспрессии тирозинкиназы гена ALK и онкобелка TAG-72 при первичной меланоме кожи. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(3):50–4. [Titov K.S., Rotin D.L., Kazakov A.M. Expression rate of ALK Tyrosine Kinase and TAG-72 oncoprotein in primary skin melanoma. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal* = Russian journal of biotherapy 2018;17(3):50–4. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-50-54.
15. Montavon G., Jauquier N., Coulon A. et al. Wild-type ALK and activating ALK-R1275Q and ALK-F1174L mutations upregulate Myc and initiate tumor formation in murine neural crest progenitor cells. *Oncotarget* 2014;5(12):4452–66. DOI: 10.18632/oncotarget.2036.
16. Takezawa K., Okamoto I., Nishio K. et al. Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2140–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2798.
17. Lemmon M.A., Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141(7):1117–34. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011.
18. Holderfield M., Deuker M.M., McCormick F., McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer* 2014;14(7):455–67. DOI: 10.1038/nrc3760.
19. Cesi G., Philippidou D., Kozar I. et al. A new ALK isoform transported by extracellular vesicles confers drug resistance to melanoma cells. *Molecular Cancer* 2018;17(1):145. DOI: 10.1186/s12943-018-0886-x.
20. Wiesner T., Lee W., Obenaus A.C. et al. Alternative transcription initiation leads to expression of a novel ALK isoform in cancer. *Nature* 2015;526(7573):453–7. DOI: 10.1038/nature15258.
21. Busam K.J., Vilain R.E., Lum T. et al. Primary and metastatic cutaneous melanomas express ALK through alternative transcriptional initiation. *Am J Surg Pathol* 2016;40(6):786–95. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000611.
22. Coutts K.L., Bemis J., Turner J.A. et al. ALK inhibitor response in melanomas



- expressing EML4-ALK fusions and alternate *ALK* isoforms. *Mol Cancer Ther* 2018;17(1):222–31. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0472.
23. Niu H.T., Zhou Q.M., Wang F. et al. Identification of anaplastic lymphoma kinase break points and oncogenic mutation profiles in acral/mucosal melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;26(5):646–53. DOI: 10.1111/pcmr.12129.
  24. Shah K.K., Neff J.L., Erickson L.A. et al. Correlation of Novel *ALK*<sup>WT</sup> with ALK Immunohistochemistry and Clinical Outcomes in Metastatic Melanoma. *Histopathology* 2020;77(4):601–10. DOI: 10.1111/his.14191.
  25. Чернышова Е.В., Абрамов Д.С., Коновалов Д.М. и др. Молекулярно-биологические характеристики ALK-позитивной анапластической крупноклеточной лимфомы. *Онкогематология* 2016;1(4):25–31. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-25-31. [Chernyshova E.V., Abramov D.S., Kononov D.M. et al. Molecular biological characteristics of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Onkogematologia = Oncohematology* 2016;1(4):25–31. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-4-25-31.
  26. Holla V.R., Elamin Y.Y., Bailey A.M. et al. (2017) ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 2017;3(1):a001115. DOI: 10.1101/mcs.a001115.
  27. Zito Marino F., Liguori G., Aquino G. et al. Intratumor heterogeneity of ALK-rearrangements and homogeneity of *EGFR*-mutations in mixed lung adenocarcinoma. *PLoS One* 2015;10(9):e0139264. DOI: 10.1371/journal.pone.0139264.
  28. Iwahara T., Fujimoto J., Wen D. et al. Molecular characterization of *ALK*, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* 1997;14(4):439–49. DOI: 10.1038/sj.onc.1200849.
  29. George R.E., Sanda T., Hanna M. et al. Activating mutations in *ALK* provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 2008;455(7215):975–8. DOI: 10.1038/nature07397.
  30. Li G., Dai W.R., Shao F.C. Effect of *ALK*-inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017;21(15):3496–503.
  31. Lin J.J., Riely G.J., Shaw A.T. Targeting *ALK*: precision medicine takes on drug resistance. *Cancer Discov* 2017;7(2):137–55. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-1123.
  32. Lin J.J., Shaw A.T. Differential sensitivity to crizotinib: does EML4-*ALK* fusion variant matter? *J Clin Oncol* 2016;34(28):3363–5. DOI: 10.1200/JCO.2016.68.5891.
  33. Ronchi A., Montella M., Cozzolino I. et al. The potential diagnostic and predictive role of anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene alterations in melanocytic tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2020;24(7):3829–38. DOI: 10.26355/eurrev\_202004\_20849.
  34. Hutarew G., Hauser-Kronberger C., Strasser F. et al. Immunohistochemistry as a screening tool for *ALK* rearrangement in NSCLC: Evaluation of five different ALK antibody clones and ALK FISH. *Histopathology* 2014;65(3):398–407. DOI: 10.1111/his.12399.
  35. Uguen A., Uguen M., Guibourg B. *ALK* Expression in Melanomas: Looking for a Needle in a Haystack. *Am J Surg Pathol* 2016;40(10):1437. DOI: 10.1097/pas.0000000000000686.
  36. Yeh I., Jorgenson E., Shen L. et al. Targeted genomic profiling of acral melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2019;111(10):1068–77. DOI: 10.1093/jnci/djz005.
  37. Tkach M., Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell* 2016;164(6):1226–32. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.043.
  38. A Phase 2 Study of the ALK Inhibitor Ensartinib for Patients With Melanomas Harboring ALK Alterations or Aberrant ALK Expression. Xcovery Holding Company, LLC. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03420508#studydesc>.

#### Вклад авторов

К.С. Титов, А.М. Казаков, С.В. Чулкова: разработка дизайна исследования, написание текста статьи;

А.А. Маркин: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста статьи.

#### Authors contribution

K.S. Titov, A.M. Kazakov, S.V. Chulkova: research design development; writing the text of the manuscript;

A.A. Markin: research design development, review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript.

#### ORCID авторов / ORCID of authors

К.С. Титов / K.S. Titov: <https://orcid.org/0000-0003-4460-9136>

А.А. Маркин / A.A. Markin: <https://orcid.org/0000-0002-9180-9264>

А.М. Казаков / A.M. Kazakov: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The Authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

**Financing.** The work was performed without external funding.

Статья поступила: 06.07.2021. Принята к публикации: 01.10.2021.

Article submitted: 06.07.2021. Accepted for publication: 01.10.2021.