

非小细胞肺癌 *EML4-ALK* 融合基因的检测及临床应用进展

Advances in Detection and Clinical Applications of *EML4-ALK* Fusion Gene in Non-small Cell Lung Cancer // CAO Zhuo, WANG Liang-xing

曹 卓¹, 王良兴²

(1. 丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000; 2. 温州医学院, 浙江 温州 325300)

摘要: 分子靶向治疗是目前最具前景的研究领域, 而融合基因分子靶点检测是分子靶向治疗的前提。*EML4-ALK* 融合基因是新近发现主要表达于非小细胞肺癌中, 可能与非小细胞肺癌表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)耐药相关, 文章就其发现过程以及临床应用进行综述。

关键词: 癌, 非小细胞肺; *EML4-ALK*; 表皮生长因子受体; 酪氨酸激酶抑制剂

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)11-0830-05

目前在世界范围内, 肺癌已居恶性肿瘤死亡率之首位。近年来, 针对肿瘤重要分子途径治疗肺癌的靶向药物研究取得很大进展, 其中抗表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和干扰血管内皮细胞生长因子受体(vascular endothelial cell growth factor receptor, VEGFR)的制剂已进入临床, 并取得较好的治疗效果。然而即便同样身为腺癌患者, 使用表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)后有些可以获得疾病的长期缓解, 有些会在 TKI 初始有效后出现获得性耐药, 还有一些患者则原发性耐药。近期发现的 *EML4-ALK* 融合基因, 其与 *EGFR*、*K-ras* 突变的不共存现象以及含有该基因患者的鲜明临床特征, 提示该靶点是肺腺癌特异性较高的分子标志物, 并且很有可能是继 *K-ras* 之后 EGFR-TKI 耐药的又一重要机制, 因此备受关注。因此, 本文就目前肺癌生物学标志物研究领域的新热点如棘皮动物微管相关蛋白 4/间变淋巴瘤激酶(echinoderm microtubule-associated protein-like 4/anaplastic lymphoma kinase, *EML4-ALK*)融合基因进行综述。

1 *EML4-ALK* 的发现及其结构特点

2007 年日本学者 Soda 等^[1]在 1 名 62 岁男性吸

烟肺癌患者手术标本中扩增出一个由 3 926 个碱基组成的 cDNA 片段, 编码一个由 1 059 个氨基酸组成的蛋白质, 该蛋白的氨基端(残基 1 496)是 *EML4* 编码蛋白的一部分, 而羧基端(残基 497~1 059)则由 *ALK* 编码蛋白的一部分构成, 提示这个 cDNA 片段是由 *EML4* 和 *ALK* 融合形成的。此病例的 *EGFR* 和 *K-ras* 基因均为野生型。该融合基因定位于 2 号染色体的短臂上(2p21 和 2p23), 其 5'端为 *EML4* 的片段, 3'端为 *ALK* 的片段, 由倒置后的 *EML4* 基因片段与残余的 *ALK* 片段连接。该融合基因拥有 *EML4* 基因中的 basic 区域、疏水的棘皮动物微管相关蛋白区(hydrophobic echinoderm microtubule-associated protein-like protein, HELP)以及部分 WD 重复区(后两部分在部分亚型中缺失)和 *ALK* 基因中的 Kinase 功能区; 此外在 75 个病例中发现了另外 5 例也具有 *EML4-ALK* 融合基因, 因此, 提示具有 *EML4-ALK* 融合基因的患者可能为非小细胞肺癌(NSCLC)的一个特殊群体。

目前, 已至少发现了 14 种 *EML4-ALK* 的变异体。这些变异体均有功能, 均为 *EML4* 的不同外显子与 *ALK* 的第 20 外显子相融合。变种 1 (V1), 为 *EML4* 的第 13 外显子与 *ALK* 的第 20 外显子相连; 变种 2 (V2), 为 *EML4* 的第 20 外显子与 *ALK* 的第 20 外显子相连^[2]; 变种 3 (V3), 有两个亚变种(V3a/b), V3a 为 *EML4* 的第 6 外显子与 *ALK* 的第 20 外显子相连, 而 V3b 为 *EML4* 的第 6 外显子加上一个

收稿日期: 2012-06-21; 修回日期: 2012-08-07

33bp 的小片段再与 ALK 的第 20 外显子相连^[3];变种 4(V4),为 *EML4* 的第 14 外显子加上一个 11bp 的小片段再与前面缺失 49bp 的 ALK 的第 20 外显子相连;变种 5(V5),有两个亚变种(V5a/b),V5a 为 *EML4* 的第 2 外显子与 ALK 的第 20 外显子相连,而 V3b 为 *EML4* 的第 2 外显子加上一个 117bp 的小片段再与 ALK 的第 20 外显子相连^[4];变种 6(V6),为 *EML4* 的第 13 外显子加上一个 49bp 的小片段再与 ALK 的第 20 外显子相连;变种 7(V7),为 *EML4* 的第 14 外显子与前面缺失 12bp 的 ALK 的第 20 外显子相连;变种 8("V4"),为 *EML4* 的第 15 外显子缺失了后面 19bp 再与前面缺失 20bp 的 ALK 的第 20 外显子相连;变种 9("V5"),为 *EML4* 的第 18 外显子与 ALK 的第 20 外显子相连^[5]。

2 *EML4*-ALK 基因的检测方法

越来越多的标本进行了 *EML4*-ALK 融合基因的检测,不同的检测方法层出不穷,荧光原位杂交技术、RT-PCR、免疫组化、cDNA 末端快速扩增技术均可检测 *EML4*-ALK 融合基因,哪种检测方法更快捷,灵敏度、特异性更高成为了大家面临的新问题。多数学者采用 RT-PCR 法进行 *EML4*-ALK 融合基因的检测,也有研究者采用荧光原位杂交技术法检测。Mino-Kenudson 等^[6]针对 ALK 融合基因的新型抗体(美国细胞信号转导技术公司的兔单克隆抗人 CD246 抗体,克隆号:D5F3 或 D9E4),采用免疫组化法筛查来自临床的石蜡标本,并通过 PCR 和荧光原位杂交技术等检测方法进行验证,结果显示,与传统检测淋巴瘤 ALK 表达的小鼠来源标准抗体相比,灵敏度、特异性均有明显提高。Zhang 等^[7]运用 cDNA 末端快速扩增技术对广东省人民医院、广东省肺癌研究所 2003~2006 年通过手术切除及穿刺活检等手段获得的 103 例 NSCLC 冷冻组织标本进行 *EML4*-ALK 融合基因检测。Sakairi 等^[8]对 109 例经支气管镜超声内镜引导下纵隔淋巴结穿刺标本进行 *EML4*-ALK 融合基因检测,得出了与原发灶组织标本检测类似的结果。免疫组化可检测肿瘤特异性抗原的表达,但传统免疫组化试剂灵敏度较低,即使使用新型免疫组化试剂,结果也可能是微弱和局部的,此外,对结果的判断也具有主观性。RT-PCR 的优势

在于其检测的高灵敏度,但此法的缺点是:不能检测 *EML4*-ALK 融合基因的未知亚型;对引物的要求高;检测甲醛固定的石蜡包埋切片,RNA 易大量降解而降低其灵敏度。荧光原位杂交(FISH)技术可以从病理切片或细胞涂片上检测少数细胞的融合变异,FISH 方法因其高度灵敏度和特异性及高度重复性和可靠性在 *Her-2* 基因检测中被当作金标准用于 *Her-2* 基因检测^[9],是目前 crizotinib Ⅲ期临床试验的入组检测方法,也是 NSCLC 中 *EML4*-ALK 融合基因检测的金标准。但有限的探针片段有时会降低其敏感性。与其他实验技术一样也受到一些因素的影响如标本固定时间长、烤片温度过高、蛋白消化不当、变性温度差异,都会使信号减弱或无信号^[9]。

3 *EML4*-ALK 基因与 NSCLC

Soda 等^[10]在随后的研究中,对于 75 例 NSCLC 患者的组织标本进行了 *EML4*-ALK 融合基因、*EGFR*18、19、20 号外显子突变,以及 *K-ras* 突变的检测,发现 5 例患者存在 *EML4*-ALK 1 型融合基因(3 例腺癌,2 例鳞癌),同时发现该基因阳性的患者与 *EGFR* 以及 *K-ras* 突变阳性的患者没有重叠。并且,在继续检测了 261 例包括非霍奇金淋巴瘤、结直肠癌、胃肠道肿瘤在内的其他恶性肿瘤的 *EML4*-ALK 融合基因后,均未发现含有该基因。此外,研究中还发现了 *EML4* 在 20 号外显子附近断裂后与 ALK 进行融合的第 2 种亚型(2 型)。最终,研究者得出结论,该融合基因很有可能是 NSCLC 特有的一个新型基因靶点。

同年,Inamura 等^[11]检测 221 例包含了腺癌、鳞癌、大细胞癌以及小细胞癌在内的肺癌患者 *EML4*-ALK 融合基因的 mRNA 情况,对于检测阳性的患者,进一步观察融合基因的表达。结果只在腺癌这一组织类型中检测到 5 例患者(3.4%)有融合基因的 mRNA 并均在细胞质中用免疫组化检测到 ALK 融合蛋白。

4 *EML4*-ALK 与 EGFR-TKI 的关系

多项研究发现,EGFR-TKI 有效的患者一般都有其独特的临床病理特征,如亚裔、女性、不吸烟、腺

癌。进一步的研究证实, *EGFR* 的 19、21 外显子突变是决定 *EGFR*-TKI 疗效的关键^[10]。由此可见, 拥有上述临床病理特征的患者, *EGFR* 突变的可能性大。那么, *EML4-ALK* 融合基因阳性的 NSCLC 患者是否有其独特的临床病理特征? Takahashi 等^[3]对 2001 年 5 月至 2005 年 7 月在京都大学医学部胸外科诊断为 NSCLC 并接受手术治疗的 313 例患者进行 *EML4-ALK* 融合基因发生率及相关因素分析的研究, 结果显示, 111 例女性患者中 4 例有 *EML4-ALK* 融合基因, 202 例男性患者中仅有 1 例。所有 *EML4-ALK* 融合基因患者均为腺癌、少吸烟或不吸烟者且不与 *EGFR*、*K-ras* 突变共存。但目前已报道了 8 例 *EML4-ALK* 融合型基因与 *EGFR* 基因突变共存型患者, 其所表现的临床特点与既往的研究有所不同^[12]。这 7 例大部分为女性(4/7)、亚裔(6/7)、无吸烟史(6/7)的晚期患者, 中位年龄 56 岁, 病理类型几乎都是腺癌(6/7), *EGFR* 突变既可以是第 19 外显子缺失(4/7)也可以是第 21 外显子点突变(3/7), 但 *EML4-ALK* 主要是变体 1 的融合。特别指出的是, 在一线使用 *EGFR*-TKI 的 5 例患者中, 疗效均达到部分缓解。Shaw 等^[13]研究了 141 例满足两个以上筛选条件(女性、亚裔、不吸烟或少吸烟、腺癌)的 NSCLC 患者。采用荧光原位杂交技术(FISH)检测 *EML4-ALK* 融合基因的发生率并用免疫组化方法检测 *ALK* 表达水平, 结果表明, 13% 的患者具有 *EML4-ALK* 融合基因, 22% 的患者 *EGFR* 突变, 65% 的患者两者均为野生型。与 *EGFR* 基因突变和两种基因均野生型的患者相比, *EML4-ALK* 融合基因在年轻男性患者中更多。*EML4-ALK* 融合基因患者与两基因均野生型患者相比, 不吸烟或少吸烟者更少。94.7% 的 *EML4-ALK* 融合基因存在于腺癌患者中, 且此类融合基因患者接受 *EGFR*-TKI 治疗后效果不明显。Wong 等^[14]对 266 例 NSCLC 患者的手术冰冻标本进行 *EML4-ALK* 融合基因检测, 结果发现 13 例 *EML4-ALK* 融合基因阳性患者中, 11 例为腺癌, 2 例为腺鳞癌。此外, 该研究发现不吸烟者的 *EML4-ALK* 融合基因阳性率更高; *EGFR* 突变阴性与 *EML4-ALK* 融合基因阳性呈正相关; *EML4-ALK* 融合基因阳性者较阴性者的年龄更小。随着对 *EML4-ALK* 研究的不断深入, *EML4-ALK* 融合基因代表了 NSCLC 中具有独特病理和临床特征的新一类亚型。

综上所述, *EML4-ALK* 融合基因其主要存在于非吸烟或少吸烟的腺癌患者中, 而且通常与 *EGFR* 基因不同时存在。但根据部分报道, 亦有可能部分共存, *EML4-ALK* 融合基因型患者与 *EGFR* 基因突变型患者有相似的临床特征^[15], 如多见于不/轻度吸烟的腺癌患者, 但 *EML4-ALK* 融合基因型患者多为年轻的男性患者, 且不能从 *EGFR*-TKI 治疗中获益。在 NSCLC 患者中, *EML4-ALK* 融合基因型阳性患者预后也较差^[9]。

5 *EML4-ALK* 基因与亚裔关系

复旦大学肿瘤医院进行了一项对东亚非吸烟肺腺癌中主要复发癌基因突变的研究^[16]。52 例不吸烟肺腺癌患者的手术切除标本, 同时检测 *EGFR*、*K-ras*、*N-ras*、*H-ras*、*Her-2*、*BRAF*、*ALK*、*PIK3CA*、*tp53* 和 *LKB1* 突变。结果表明, 41 例肿瘤包含 *EGFR* 突变; 3 例携带 *EML4-ALK* 融合; 2 例有 *Her-2* 插入; 1 例 *K-ras* 突变。所有突变相互排斥。未检测到 *BRAF*、*N-ras*、*H-ras* 或 *LKB1* 突变, 15 例 *tp53* 突变, 4 例包含伴有 *EGFR* 突变的 *PIK3CA* 突变。日本人做的亚裔人群的研究, 他们用胞浆免疫组化的方法在 149 例腺癌、48 例鳞癌、3 例大细胞神经内分泌癌、21 例小细胞肺癌患者中寻找 *EML4-ALK* 基因, 结果是 149 例腺癌中有 5 例检测 *EML4-ALK* 融合基因阳性, 而其他类型的肺癌中无突变^[11]。

目前看来, 亚裔人群 *EML4-ALK* 基因融合发生率略高于高加索人群, 同样与不吸烟、较年轻的发病年龄相关。与性别、病理类型、肿瘤分化程度等因素的关系尚不明朗^[10]。

6 针对 *EML4-ALK* 基因的抑制剂

任何一个肿瘤新靶点的发现, 最后都着眼于设计出安全有效的药物, 在分子水平上治疗肿瘤。由辉瑞公司研制的 crizotinib(PF-02341066)(克唑替尼)治疗 *ALK* 融合基因阳性 NSCLC 患者的 I 期临床试验结果显示^[17], crizotinib 治疗 *ALK* 融合基因阳性 NSCLC 患者有效且不良反应可耐受。crizotinib 在 I/II 期临床试验中的卓越结果让人印象深刻。在 I 期临床试验(PROFILE1001 研究)共入组的 119 例 *ALK* 阳性

的患者中,116例患者疗效可评价,其中94例还在随访生存时间,中位年龄是51岁。患者绝大多数是不吸烟者或戒烟者(占99%),其中97%为腺癌。大部分的患者经历过多程治疗,44%的患者接受过三线治疗,中位随访时间是11个月(95%CI为9.2~12.8),ORR为61%(95%CI为52%~70%),2例CR,69例PR,临床获益率(CR+PR+SD)为88%,反应(CR或者PR)迅速(中位反应时间8周),初步中位缓解持续时间为48.1周^[18]。另一项研究是PROFILE 1005,来自12个国家的136例既往化疗失败的ALK阳性晚期NSCLC患者(930A的患者至少接受过2个以上化疗方案的治疗)接受克唑替尼治疗。结果显示,患者ORR为50%,中位缓解持续时间为41.9周。两项研究观察到的最常见的不良反应($\geq 25\%$)为视力障碍、恶心、腹泻、水肿和便秘。基于以上两项研究结果,2011年8月美国FDA批准克唑替尼用于局部晚期或转移性ALK阳性NSCLC的一线治疗。

不过对相应的TKI来说,总有一小部分肿瘤从开始治疗或在发生初级反应后就存在耐药性。Choi等^[19]报道了1例EML4-ALK阳性的NSCLC病例,应用crizotinib成功治疗5个月后发生耐药。患者28岁,男性,无吸烟史,诊断为肺腺癌,未携带EGFR突变,接受常规化疗。然而,经过6个疗程的治疗后肿瘤进展,FISH法检测发现肿瘤表达EML4-ALK的亚型1。在口服crizotinib治疗后1周,患者症状明显好转。然而5个月后,肿瘤突然开始恢复增长,导致胸腔积液的迅速增长和双侧肺部肿瘤进展。分析患者的胸腔积液样本,发现在EML4-ALK激酶域存在两个突变(野生型ALK的cDNA核苷酸4374和4493,分别发生了GA和CA的改变,频率为41.8%和14.0%),每个都能赋予对ALK抑制剂的抗性。没有发现任何EML4-ALK的cDNA同时携带这两个突变,因此研究者认为每个突变是独立发生的。因为无治疗前基线数据,所以不知道抗性克隆属于原发的还是继发的。这例患者出现的对crizotinib耐药突变表明,还需要其他ALK抑制剂靶向治疗crizotinib耐药的EML4-ALK基因融合病例。在这方面已经取得一些进展。

一项欧美与韩国共同参与的多中心研究初步评价了针对EML4-ALK这一新型靶点的抑制剂TAE684。Koivunen等^[20]分析了305例NSCLC患者

(美国138例,韩国167例)组织以及83个NSCLC细胞株,8例(3%)患者肿瘤中以及3个细胞株中(3.6%)检出融合基因。在1例NSCLC细胞株体外、体内实验中,针对ALK的抑制剂TAE684体现了抑制ALK激酶活性、增加肿瘤细胞凋亡的作用。Galkin等^[21]评价了TAE684,一个高潜力的ALK激酶抑制剂,对携带EML4-ALK的细胞生长的影响。结果表明在3个表达EML4-ALK的细胞系中,TAE684只是明显抑制H3122细胞系的生长并导致细胞凋亡,而且只有H3122细胞系中存在明显的下游信号蛋白Akt和ERK1/2磷酸化的抑制。有趣的是,该研究发现TAE684只是导致STAT3磷酸化程度降至最小,由于STAT3对NPM-ALK介导的淋巴瘤生成是关键,因此STAT3在携带EML4-ALK的NSCLC中到底有何作用,携带NPM-ALK和EML4-ALK的肿瘤之间到底何种信号不同尚需深入研究。

最近Choi等^[19]在1例crizotinib治疗后复发患者的标本中发现第4374号碱基(G→A)和第4493号碱基(C→A)两处突变,导致对应位置的1156号氨基酸(半胱氨酸→酪氨酸)和第1196号氨基酸的改变(亮氨酸→甲硫氨酸)。此后又确定了L1198P和D1203N两个新的EML4-ALK耐药突变^[22]。针对L1196M耐药后,研究人员用活性更强的ALK抑制剂如CH5424802、AP26113、ASP3026及X-376和X-396抑制剂进行治疗,并证实CH5424802能高选择性抑制L1196M突变的细胞生长。最新研究显示X-376和X-396在体内具有良好的药代动力学,3种最常见的肺癌中ALK的融合蛋白(EML4-ALK变体E13,A20,E20,A20和E6B;A20)以及KIF5B-ALK融合蛋白对这两种药物的敏感性相似,进一步证实X-396可以抑制L1196M与C1156Y点突变,较crizotinib抑制ALK活性更强^[23]。

6 结 语

综上所述,EML4-ALK是NSCLC发生发展中独立而又关键的分子靶点,主要发生于腺癌,EGFR、K-ras野生型,轻度吸烟/不吸烟,年轻男性患者。可能是T790M、K-ras和MET之外另一潜在的EGFR-TKI耐药机制之一。针对这一靶点的深入研究,将有助于筛选EGFR-TKI合适的治疗人群并开创EGFR-TKI

耐药的 NSCLC 靶向治疗新领域。现行检测法有多种:包括免疫组化、荧光原位杂交(FISH 检测法)和 RT-PCR。2012 NCCN 肺癌治疗指南认为 FISH 检测法是“金标准”,最新针对 *EML4-ALK* 基因的靶向治疗药物为克唑替尼,目前在临床二线的治疗上取得比较满意的疗效。FISH 检测将有助于确定可从克唑替尼治疗中受益的肺癌患者。尽管 *EML4-ALK* 阳性患者的某些特征(如腺癌、不吸烟或轻度吸烟)与 *EGFR* 突变者相似,但 *ALK* 阳性的患者对 *EGFR*-TKI 耐药。因为 *EGFR* 突变和 *ALK* 重排往往是互相排斥的,对于 *ALK* 阳性但克唑替尼耐药的患者,二线治疗给予厄洛替尼或吉非替尼是无效的。但克唑替尼是否可用于二线治疗还需要进一步认证。

总而言之,目前 NSCLC 的治疗已经逐步进入个体化治疗时代,病理学、免疫表型、预后和预测的标志基因和蛋白已经成为指导肺癌个体化治疗的指标,从而“对症下药”,整体上改善了患者的生存期。当然,一些新的驱动基因被不断发现,也衍生出新的靶向治疗药物,我们还需要更多探索性的研究,寻求新的治疗策略。

参考文献:

- [1] Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming *EML4-ALK* fusion gene in non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2007, 448(7153):561-566.
- [2] Lin E, Li L, Guan Y, et al. Exon array profiling detects *EML4-ALK* fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(9):1466-1476.
- [3] Takeuchi K, Choi YL, Togashi Y, et al. *KIF5B-ALK*, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for *ALK*-positive lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(9):3143-3149.
- [4] Takeuchi K, Choi YL, Soda M, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for *EML4-ALK* fusion transcripts[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(20):6618-6624.
- [5] Fukuyoshi Y, Inoue H, Kita Y, et al. *EML4-ALK* fusion transcript is not found in gastrointestinal and breast cancers[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(9):1536-1539.
- [6] 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[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(5):1561-1571.
- [7] Zhang X, Zhang S, Yang X, et al. Fusion of *EML4* and *ALK* is associated with development of lung adenocarcinomas lacking *EGFR* and *KRAS* mutation and is correlated with *ALK* expression[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:188.
- [8] Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, et al. The biology and treatment of *EML4-ALK* non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(10):1773-1780.
- [9] 姚国栋, 侯明星, 袁宏伟, 等. 荧光原位杂交与免疫组化法检测乳腺癌 HER-2 表达的临床意义[J]. *肿瘤学杂志*, 2012, 8(4):306-308.
- [10] Soda M, Takada S, Takeuchi K, et al. A mouse model for *EML4-ALK*-positive lung cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(50):19893-19897.
- [11] Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. *EML4-ALK* fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(4):508-515.
- [12] 曾珠, 吴一龙. *EML4-ALK* 与 *EGFR* 基因突变共存型非小细胞肺癌研究进展[J]. *中国肺癌杂志*, 2011, 14(11):880-884.
- [13] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor *EML4-ALK* [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(26):4247-4253.
- [14] Wong DW, Leung EL, Kam-Ting K, et al. The *EML4-ALK* fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type *EGFR* and *K-ras* [J]. *Cancer*, 2009, 115(8):1723-1733.
- [15] Sun Y, Ren Y, Fang Z, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian nonsmokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(30):4616-4620.
- [16] Lin E, Li L, Guan Y, et al. Exon array profiling detects *EML4-ALK* fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(9):1466-1476.
- [17] Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. *EML4-ALK* fusion gene and efficacy of an *ALK* kinase inhibitor in lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13):4275-4283.
- [18] Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, et al. *EML4-ALK* fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers[J]. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(1):13-17.
- [19] Choi YL, Soda M, Yamashita Y, et al. *EML4-ALK* mutations in lung cancer that confer resistance to *ALK* inhibitors[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(18):1734-1739.
- [20] Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, et al. *EML4-ALK* fusion gene and efficacy of an *ALK* kinase inhibitor in lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13):4275-4283.
- [21] Galkin AV, Melnick JS, Kim S, et al. Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-*ALK* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(1):270-275.
- [22] Heuckmann JM, Hlzel M, Sos ML, et al. *ALK* mutations conferring differential resistance to structurally diverse *ALK* inhibitors[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(23):7394-7401.
- [23] Ardini E, Galvani A. *ALK* Inhibitors, a pharmaceutical perspective[J]. *Front Oncol*, 2012, 2:17.