

NIEUWE THERAPEUTISCHE OPTIES **VOOR NEUROBLASTOMA**

Anne-Laure Detremerie

Stamnummer: 01207586

Promotor: Prof. dr. Tim Lammens

Masterproef voorgelegd in het kader tot het behalen van de graad Master of Medicine in de Geneeskunde

Academiejaar: 2018 - 2019



Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.
Universiteitsbibliotheek Gent, 2021.

This page is not available because it contains personal information.
Ghent University, Library, 2021.

1 Inhoudstafel

Inhoud

1	Inhoudstafel.....	1
2	Abstract.....	1
3	Inleiding.....	2
3.1	Definitie.....	2
3.2	Epidemiologie.....	3
3.3	Etiologie.....	5
3.3.1	Familiale neuroblastoom.....	5
3.3.1.1	<i>PHOX2B</i> mutaties.....	5
3.3.1.2	<i>ALK</i> mutaties.....	7
3.3.2	Sporadische neuroblastoom.....	8
3.4	Symptomen.....	8
3.5	Diagnose.....	10
3.5.1	Microscopie.....	10
3.5.2	Beeldvorming.....	10
3.5.3	Urinaire catecholamine metabolieten.....	12
3.5.4	Biopsie.....	12
3.5.5	Liquid biopsies.....	12
3.6	Prognose en risico.....	13
3.7	Behandeling laag-risico en intermediair-risico neuroblastoma.....	16
3.8	Behandeling hoog-risico neuroblastoom.....	19
4	Methodologie.....	21
5	Resultaten.....	22
5.1	Anti-GD2.....	22
5.1.1	Werkingsprincipe.....	22
5.1.1.1	KIR en KIR ligand.....	23
5.1.1.2	Transverse myelitis.....	25
5.1.2	Ontwikkelingsfasen.....	26
5.1.2.1	Eerste generatie anti-GD2 mAbs.....	27
5.1.2.2	Tweede generatie.....	30
5.1.3	Toekomstige ontwikkelingen.....	32
5.2	<i>ALK</i> -inhibitoren.....	35
5.2.1	Algemeen.....	35
5.2.2	Ontwikkelingsfasen.....	36

5.2.2.1	Eerste generatie ALK inhibitoren	37
5.2.2.1.1	NSCLC.....	37
5.2.2.1.2	ALCL en NB	37
5.2.2.2	Tweede generatie ALK inhibitoren	38
5.2.2.3	Derde generatie ALK inhibitoren	39
5.3	MDM2 – inhibitoren	42
5.3.1	Algemeen.....	42
5.3.2	Ontwikkeling van Nutlins	44
5.3.3	Combinatie.....	47
5.4	CDK4/6 inhibitoren	48
5.4.1	Algemeen.....	48
5.4.2	Ontwikkeling.....	49
6	Discussie.....	53
7	Referentielijst	55

2 Abstract

Neuroblastoom ontstaat in de voorlopercellen van het sympathisch zenuwstelsel en maakt 6% uit van kanker op kinderleeftijd. Meestal treedt de ziekte sporadisch op, terwijl de familiale vorm voorkomt in 1 tot 2% van neuroblastoom. Tumoren worden ingedeeld volgens het classificatiesysteem van de International Neuroblastoma Risk Group. Patiënten met een laag-risico en intermediair-risico NB kennen goede overlevingskansen na behandeling. In tegenstelling, kinderen met een hoog-risico neuroblastoom zijn echter vaak ongeneeslijk ziek met overlevingspercentages van minder dan 40% ondanks de hoge intensiteit van de cytotoxische chemoradiotherapie.

In deze literatuurstudie werd onderzocht welke nieuwe therapiemogelijkheden er bestaan of in ontwikkelingsfase zijn voor deze heterogene ziekte. Er werd voornamelijk gebruik gemaakt van de database PubMed.

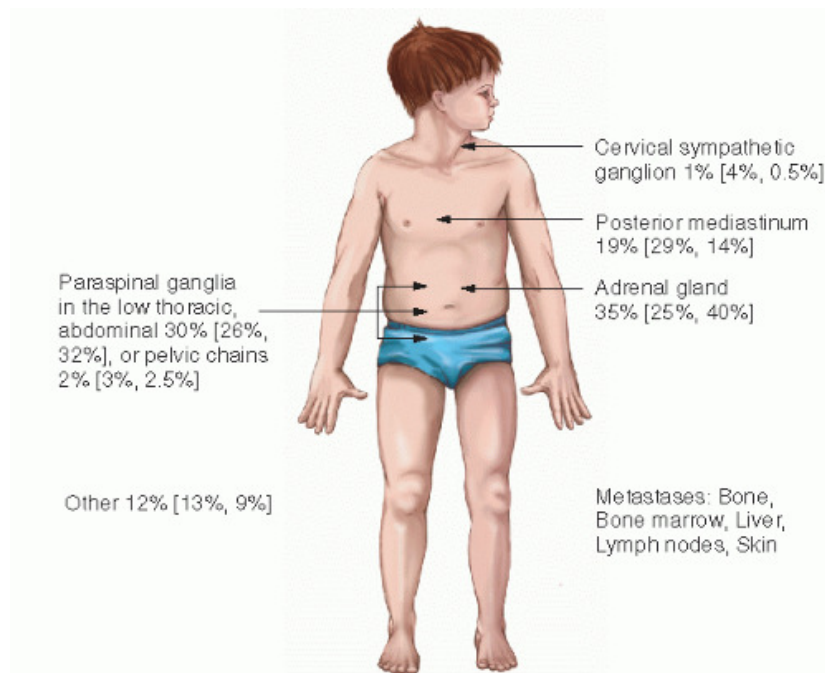
Een belangrijk deel van deze scriptie werd besteed aan het beschrijven van anti-GD2 antistoffen. Sinds 2010 worden patiënten, die voldoen aan enkele criteria, behandeld met chimere anti-GD2 antistoffen om deze overlevingspercentages te verbeteren. Het werd aangetoond dat de combinatie van ch14.18 anti-GD2 (dinutuximab) met cytokinen (IL-2 en GM-CSF) de 2 jaars event-vrije overleving en algemene overleving significant verbetert bij hoog-risico NB patiënten. Omtrent andere therapeutische mogelijkheden zoals ALK inhibitoren, nutlins en CDK4/6 inhibitoren werden de ontwikkelingsfasen, centrale studies en hun resultaten besproken. Ook werd er aandacht besteed aan eventuele bijwerkingen en mogelijke oplossingen voor enkele problemen bij deze therapiemogelijkheden. Eveneens werd er voor deze vormen nagegaan of er combinatiemogelijkheden zijn met reeds bestaande therapieën.

Er kan besloten worden dat enkel de behandeling met anti-GD2 reeds in de kliniek wordt toegepast. Echter, vele andere therapeutische strategieën zijn nog in preklinische fase en klinische studies moeten dus nog uitgevoerd worden om hun bijdrage aan overleving en impact op toxiciteit na te gaan.

3 Inleiding

3.1 Definitie

Neuroblastoom is een embryonale tumor die voortkomt uit de afwijkende groei van progenitorcellen van de neurale lijst van het zich ontwikkelende sympathische zenuwstelsel (1). Onder normale omstandigheden, migreren neurale lijstcellen vanuit de dorsale neurale buis en differentiëren in weefsels en organen van het sympathische zenuwstelsel. In sommige gevallen treden defecten op in migratie, maturatie en differentiatie van neurale buiscellen, wat aanleiding kan geven tot ontwikkeling van neuroblastoom (2). Tumoren ontstaan meestal in het bijniemergweefsel of paraspinale sympathische ganglia. Deze presenteren zich als massa's in de buik, borstkas of nek (zie figuur 1).



Figuur 1 frequente aangetaste locaties van neuroblastoom, naar Bernstein et al. (3).

Neuroblastoom komt voor bij zeer jonge kinderen, waarbij de diagnose gesteld wordt op een mediane leeftijd van 19 maanden. Het is de meest voorkomende maligniteit gedurende kleutertijd, goed voor meer dan 20% van de kankers gediagnosticeerd tijdens het eerste levensjaar. Deze tumor kan bovendien worden gedetecteerd *in utero*. Hoewel neuroblastoom slechts ongeveer 6% van diagnoses van alle pediatrie kanker vormt, veroorzaakt het tot 15% van de kankersterfte in de kindertijd (4) (zie figuur 2).

Een kenmerk van neuroblastoom is de heterogeniteit in klinische presentatie, verloop en algemene prognose, variërend van kinderen met tumoren die spontaan regressie vertonen, tot kinderen met gelokaliseerde tumoren met gunstige genomische kenmerken die een uitstekende *overall survival* (OS) hebben met beperkte cytotoxische chemotherapie. In extreme gevallen kan dit zelfs variëren tot ernstig zieke oudere kinderen, adolescenten of jongvolwassenen met een uitgebreide tumor (metastasen in lever, beenmerg, huid en andere

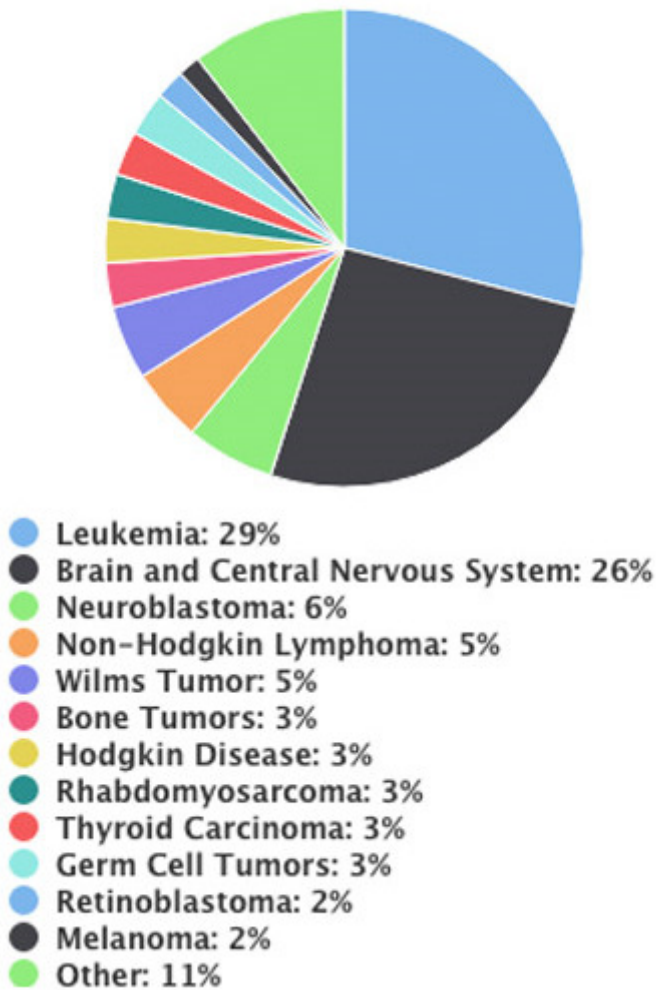
organen komen hierbij voor) die ondanks intensieve multimodale chemoradiotherapie onophoudelijk kan groeien. Deze klinische heterogeniteit wordt ook vertaald in heterogene biologische, morfologische en genetische karakteristieken. Door het heterogene klinische gedrag van de ziekte blijft het bepalen van het individuele risico op het moment van diagnose belangrijk bij het bepalen van een adequate therapeutische aanpak (5).

Hoewel er de afgelopen drie decennia vorderingen zijn gemaakt voor kinderen met een tumor in het lagere stadium, blijven kinderen met een hoog-risico neuroblastoom vaak ongeneeslijk ziek met overlevingspercentages van minder dan 40% ondanks verhoging in intensiteit van de cytotoxische chemoradiotherapie (6). Laag-risico NB wordt meestal gedetecteerd bij kinderen jonger dan 18 maanden, terwijl hoog-risico meestal na deze leeftijd wordt gedetecteerd .

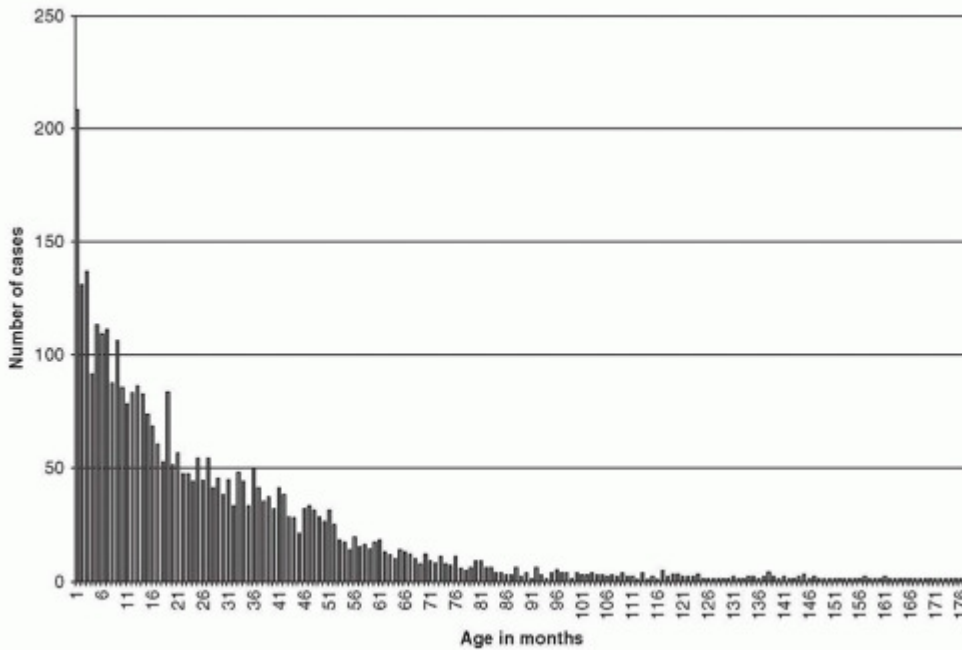
3.2 Epidemiologie

De geschatte incidentie van neuroblastoom in Noord-Amerika en Europa bedraagt 10,5 diagnosen per miljoen. Neuroblastoom is hoofdzakelijk een kanker van jonge kinderen, aangezien de meerderheid van de kinderen met neuroblastoom gediagnosticeerd worden vóór het 5^{de} levensjaar. Een mediane leeftijd van diagnose wordt geschat op 19 maanden (zie figuur 3). De leeftijdsdistributie is als volgt: 40 % van de patiënten is jonger dan 1 jaar, 35 % is tussen 1 en 2 jaar oud en 25 % is ouder dan 2 jaar op het tijdstip van diagnose (zie figuur 3) (7). Bij zuigelingen is neuroblastoom de meest voorkomende vorm van kanker, met een hoger percentage bij jongens dan bij meisjes (8). De incidentie van neuroblastoom bij zwarte zuigelingen is ten opzichte van de incidentie bij blanke zuigelingen iets lager (9). Zeer zeldzaam komt deze ziekte ook voor bij kinderen ouder dan 10 jaar en bij volwassenen.

Number of Childhood Cancer Diagnoses Per Year
Total = 15,270, Age 0-19



Figuur 2 totaal aantal kankerdiagnosen bij kinderen per jaar volgens de American Cancer Society, Cancer Facts and Figures.



Figuur 3 Diagnose van neuroblastoom volgens leeftijd (in maanden), volgens W.B. London, COG Statistical Office.

3.3 Etiologie

3.3.1 Familiale neuroblastoom

Familiale neuroblastoom is eerder zeldzaam en komt in 1 tot 2 % van neuroblastoom voor. Familiale neuroblastoom wordt op een autosomaal dominante wijze overgeërfd. Deze patiënten zijn meestal jonger op het moment dat de diagnose gesteld wordt dan patiënten met sporadisch NB. Ook worden frequenter multifocale primaire tumoren aangetroffen zoals voorspeld door de *two hit* hypothese beschreven door Knudson (10).

Families met neuroblastoom vertonen vaak een variabiliteit in de ernst van de ziekte, waarbij gevallen met een laag en een hoog risico worden waargenomen in dezelfde stambomen (11).

3.3.1.1 PHOX2B mutaties

Dit predisponerende gen voor neuroblastoom werd geïdentificeerd in families die getroffen waren door neuroblastoom samen met de ziekte van Hirschsprung en/of het congenitaal centrale hypoventilatiesyndroom (ook bekend als 'Ondines vloek'). Deze stoornissen worden neurocristopathieën genoemd en komen soms voor in combinatie met neuroblastoom (12). Families met *paired-like homeobox 2b (PHOX2B)* mutaties kennen een variabele penetrantie van de neurocristopathieën, waarbij de *non-polyalanine repeat expansion mutaties (NPARM)* aanleiding geven tot het meest ernstige fenotype (13).

Een klein aantal familiale en sporadische neuroblastomen, meestal gepaard gaande met afwijkingen in neurale lijst weefsels, wordt veroorzaakt door *loss of function* mutaties in het *PHOX2B* gen op chromosoom 4p12. Het codeert voor een transcriptiefactor, die essentieel is voor de ontwikkeling van het autonome centrale zenuwstelsel alsook voor structuren afgeleid van de neurale lijst (14). *PHOX2B* mutaties komen voor bij de meerderheid van de kinderen met congenitale centrale hypoventilatie syndroom (CCHS) en bij sommige kinderen met de ziekte van Hirschsprung (14) (15). Kiembaanmutaties in *PHOX2B* werden vervolgens in een kleine hoeveelheid (10%) van de stambomen met familiale neuroblastoom gevonden, waardoor dit het eerste authentieke neuroblastoom predispositie-gen is (16).

Er werd vastgesteld dat CCHS-patiënten een hogere frequentie van *triplet expansion* mutaties hebben die een polyalanine-kanaal in de C-terminale regio van het eiwit verlengen(14). Niet-syndromale diagnoses van familiale neuroblastomen vertonen vaker *missense* mutaties of *nonsense* mutaties. Kiembaanmutaties van het *PHOX2B* gen komen voor in ongeveer 6,4% van de diagnoses van familiale neuroblastoom en worden zelden aangetroffen in de sporadische vorm (14) (17).

Aan de hand van *PHOX2B* immunohistochemische kleuring kan een onderscheid gemaakt worden tussen ongedifferentieerd neuroblastoom en andere *small round blue cell* tumoren (18).

Kinderen met een familiegeschiedenis van neuroblastoom worden standaard getest op kiembaan *ALK* of *PHOX2B* mutaties. Deze testen moeten ook overwogen worden bij kinderen met bilaterale bijniertumoren. Asymptomatische kinderen met een geïdentificeerde *ALK* mutatie of *PHOX2B* mutatie worden elke 3 maanden gescreend aan de hand van abdominale echo en urinaire catecholaminewaarden tot de leeftijd van 5 jaar.

Aangezien *PHOX2B* mutaties in lage frequentie voorkomen bij familiale neuroblastoom werd het duidelijk dat een bijkomende genmutatie noodzakelijk is voor de ontwikkeling van de meerderheid van familiale neuroblastoom. Mutaties in het *ALK* gen werden geïdentificeerd als de belangrijkste oorzaak van familiale neuroblastoom, en vervolgens werd bepaald dat *PHOX2B*-transcriptiefactor *ALK* opreguleert (19).

3.3.1.2 ALK mutaties

Gain of function mutaties in het *anaplastic lymphoma kinase (ALK)* gen worden weerhouden als de belangrijkste oorzaak van zeer penetrante, erfelijke neuroblastoom (20) (21). ALK is een receptor tyrosine kinase dat een belangrijke rol heeft in het ontstaan van verschillende tumoren, zoals anaplastisch grootcellig lymfoom en niet-kleincellig longcarcinoom. In tegenstelling tot neuroblastoom, wordt ALK bij deze tumoren geactiveerd door translocatie. In het geval van familiaal neuroblastoom wordt ALK geactiveerd door mutaties in het kinasedomein. Identieke activerende mutaties worden ook geïdentificeerd in sporadische neuroblastoomtumoren (20)(21).

Hoewel de meest voorkomende *ALK* kiembaan mutatie ook de meest voorkomende somatische *ALK* mutatie is (een arginine-tot-glutamine-substitutie op codon 1275 [R1275Q]), lijken de meest activerende somatische *ALK* varianten meestal niet te worden getolereerd in de kiembaan. De *ALK* mutatie met substitutie van fenylalanine naar valine bij codons 1245 en 1174 (F1245V en F1174V, respectievelijk) resulteren zowel in familiaal neuroblastoom als in neurocognitieve stoornissen wat suggestief is voor de rol van ALK regulatie in de normale ontwikkeling van het centrale zenuwstelsel (22) (23).

De afwijkende kinase activiteit van ALK kan in het geval van neuroblastoom worden toegeschreven aan genamplificatie of activerende mutaties, meestal binnen het tyrosinekinasedomein (24) (25) (26). Deze kiembaanmutaties komen in hoge percentages voor bij familiale neuroblastoom en bij sporadisch neuroblastoom in 6-12% van de gevallen (24) (25) (26). ALK mutaties houden echter geen verband met het stadium van de ziekte. Er worden in totaal 21 verschillende ALK mutaties beschreven met invloed op 14 aminozuurresiduen.

F1174L wordt uitsluitend aangetroffen in sporadische vorm neuroblastoom, terwijl R1275Q wordt aangetroffen in zowel familiale als sporadische tumoren. Familiale neuroblastoom is goed voor 1-2% van het totaal aantal diagnoses waarbij dominante *ALK* mutaties voorkomen in ongeveer 50% van deze gevallen (27). De R1275Q mutatie is de meest voorkomende *ALK* mutatie van de kiembaan, voorkomend bij ongeveer 45% van de familiale neuroblastomen (28).

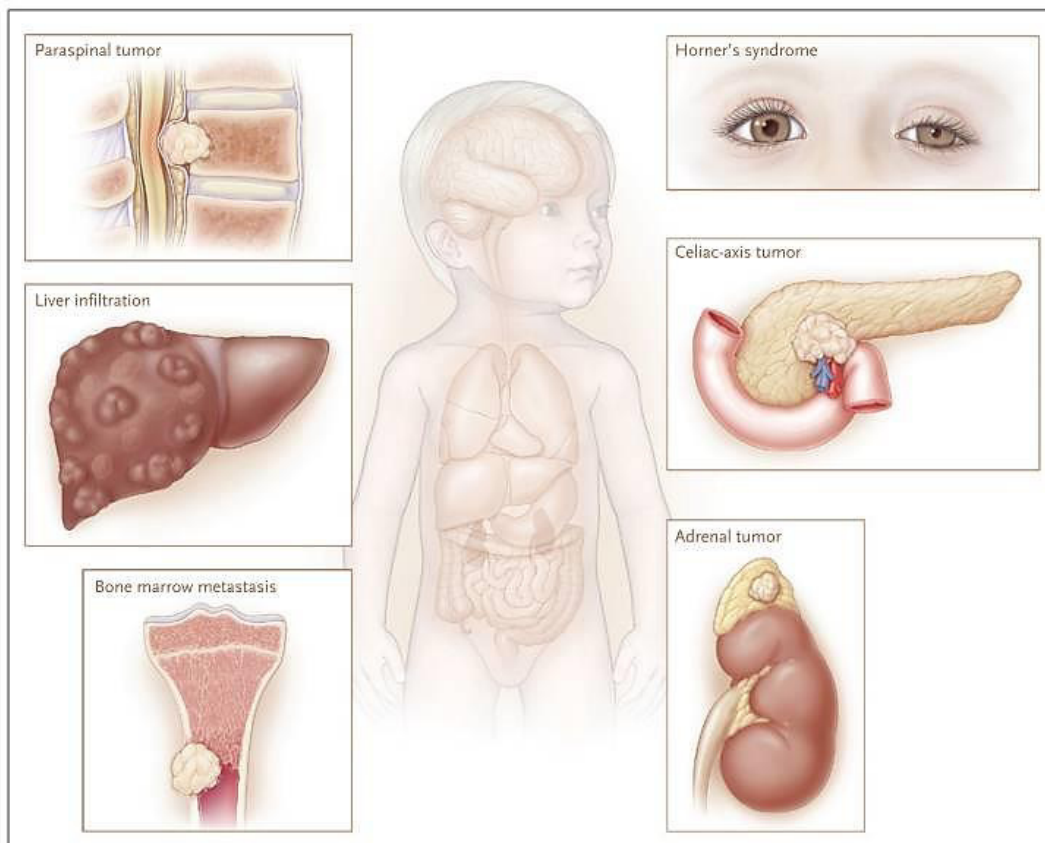
3.3.2 Sporadische neuroblastoom

De meerderheid van NB gevallen ontstaat op sporadische wijze. Een grote *genome-wide association* studie identificeerde verschillende polymorfe allelen die sterk geassocieerd zijn aan vatbaarheid voor NB (28). Variaties in *LMO1*, *BARD1* en *FLJ22536* zijn geassocieerd met hoog-risico NB (29) (30) (31). Variaties in *USP12*, *DDX4*, *IL21RA* en *HSD17B12* zijn gelinkt aan laag-risico NB (32).

3.4 Symptomen

De symptomen bij kinderen met neuroblastoom variëren op basis van het aantal en de locatie van tumoren en kunnen zowel lokale als systemische symptomen omvatten.

Lokale symptomen worden veroorzaakt door regionale aantasting. Een unieke lokalisatie is aanwezig bij ongeveer de helft van de patiënten. Bij de overige patiënten komen metastasen op afstand voor, waarbij het bot, het beenmerg en lever veelvoorkomende metastatische plaatsen zijn (zie figuur 4). Bij zuigelingen kan ook de huid een plaats zijn van metastasering.



Figuur 4 Klinische presentaties van neuroblastoom, naar Maris et al. (33).

Afhankelijk van de locatie zullen lokale symptomen optreden. Als de tumor zich cervicaal bevindt (1%), zal een massa zichtbaar zijn ter hoogte van de hals. Indien de tumor zich thoracaal bevindt (19%), kunnen respiratoire klachten zoals bijvoorbeeld hoesten optreden. De meeste neuroblastoomtumoren ontstaan in het abdomen en de meest voorkomende primaire locatie is de bijnier (35%). In enkele gevallen komt de tumor paravertebraal voor (30%) in het abdomen. Abdominale massa's kunnen asymptomatisch zijn of kunnen resulteren in buikpijn, abdominale zwelling of obstipatie indien ze groot genoeg zijn. Bij ongeveer 10-15% van patiënten met neuroblastoom zal de tumor uitbreiden naar de epidurale of intradurale ruimte, wat kan leiden tot compressie van het ruggenmerg en paraplegie (34) (zie figuur 4). Neuroblastoom verspreidt zich ook frequent naar de orbita, resulterend in periorbitale ecchymosen (wasbeerogen of brilhematoom) die kenmerkend zijn voor neuroblastoom. Proptosis en visus beperking kunnen hier ook een gevolg van zijn (35). De 3 belangrijkste oculaire tekens van NB zijn proptosis, Horner syndroom en opsoclonus. Deze tekens zijn elk gerelateerd aan tumorstadium, plaats van de tumor en *outcome* voor de patiënt (35). Tumoren die hun oorsprong hebben in cervicale of thoracale regio's komen meer frequent voor bij baby's en kunnen geassocieerd worden met het Horner syndroom en respiratoire symptomen (zie figuur 4) (36) (37) (38).

Bijkomstige paraneoplastische syndromen kunnen leiden tot systemische symptomen. Het opsoclonus myoclonus syndroom (OMS) (dat ook het syndroom van Kinsbourne wordt genoemd) komt voor bij ongeveer 2-3% van de kinderen met neuroblastoom en komt vaak voor in de setting van goed gedifferentieerde laag-risico tumoren (39) (40). De symptomen ontstaan ten gevolge van een immunreactie van het lichaam tegen deze tumor. Kinderen met het syndroom van Kinsbourne lijden aan myoclonische schokken en willekeurige oogbewegingen die af en toe geassocieerd voorkomen met ataxie (40). Symptomen van het OMS syndroom houden vaak aan na resectie en kunnen ook worden geassocieerd met ernstige motorische beperking op lange termijn, spraakproblemen en significante cognitieve stoornissen (2).

Ook symptomen zoals vermagering, zweten, diarree en hoge bloeddruk kunnen ontstaan als klachten en deze ontstaan op basis van de excretie van catecholaminen door de tumor.

3.5 Diagnose

De definitieve diagnose van neuroblastoom kan worden bevestigd door:

- Biopsie van het tumorweefsel met histopathologische diagnose aan de hand van lichtmicroscopie (met of zonder immunohistologie) (41).
- Of door verhoogde catecholaminewaarden (in het serum of in de urine) in combinatie met een positieve MIBG scan en een beenmergaspiraats (waarin tumorcellen aanwezig zijn) (41).

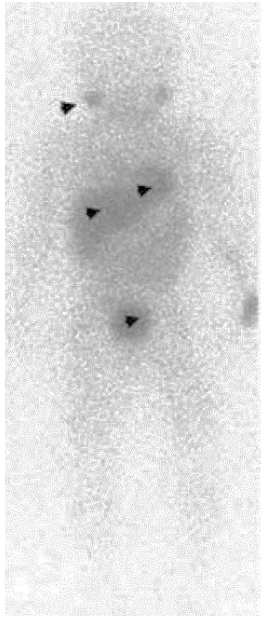
3.5.1 Microscopie

Neuroblastoom tumoren worden gekenmerkt door immature *small round blue cells* met een hyperchromatische kern met verschillende graden van differentiatie die positief kleuren voor neuron specifiek enolase (NSE), tyrosine hydroxylase, synaptofysine en NB84. Microscopische analyse zal ook de karakteriserende Homer Wright pseudorosetten onderscheiden (42).

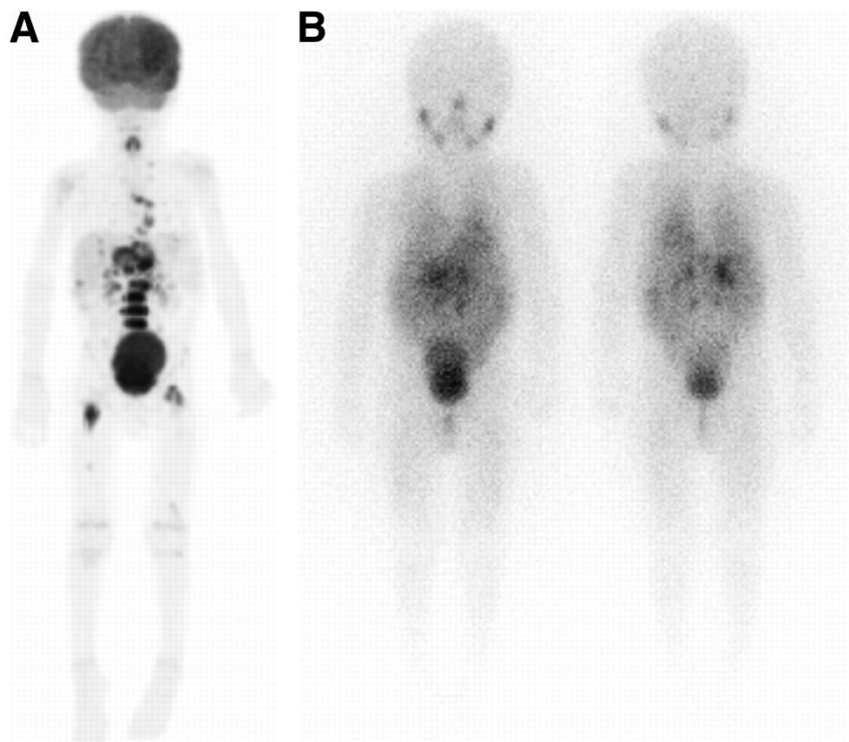
3.5.2 Beeldvorming

De evaluatie om het ziektestadium te bepalen bij kinderen met neuroblastoom omvat in het algemeen beeldvorming van de primaire tumorplaats met CT of MRI om de omvang, invasie en verspreiding van de tumor te bepalen. Additionele beeldvorming van de borst, de buik en het bekken worden uitgevoerd om verspreiding in deze regio's na te gaan. Meta-iodobenzylguanidine (MIBG) scans kunnen gebruikt worden om primaire tumoren en metastasen te detecteren (43) (zie figuur 6). Deze scan kan subklinische metastasen aantonen op voorwaarde dat de primaire tumor MIBG opneemt (90 % van de tumoren). Bij patiënten die geen MIBG-positieve tumoren hebben (10%), kunnen [*18 F*]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) scans of technetium botsintigrafie gebruikt worden om tumorweefsel te detecteren (43). Wanneer intracraniale metastasen vermoed worden of hiervoor een klinische indicatie is, moet ook een CT of MRI van de hersenen worden uitgevoerd.

Aangezien de excretie van MIBG in de urine doorgaat, kleuren de urineblaas en urinewegen sterk aan met een toegenomen activiteit. MIBG wordt in fysiologische omstandigheden opgenomen voornamelijk door de lever en in kleinere hoeveelheden door de milt, longen, speekselklieren, schildklier, skeletspieren en myocard (zie figuur 5) (44).



Figuur 5 Een ¹³¹I MIBG scan die de fysiologische opname aantoont. De pijlen tonen de opname aan in de parotisklier, het hart, de lever en de urineblaas, naar Kembhavi et al. (44).



Figuur 6 een casus van een 3 jaar oude jongen met stage 4 NB. (A) Een ¹⁸F-FDG opname toont verhoogde opname ter hoogte van het retroperitoneum en het mediastinum. Ook is er een sterke opname in de lumbale wervelzuil en proximale femora. (B) Een anterieure en posterieure ¹²³I-MIBG scan toont retroperitoneale opname, naar Sharp et al. (45)

3.5.3 Urinaire catecholamine metabolieten

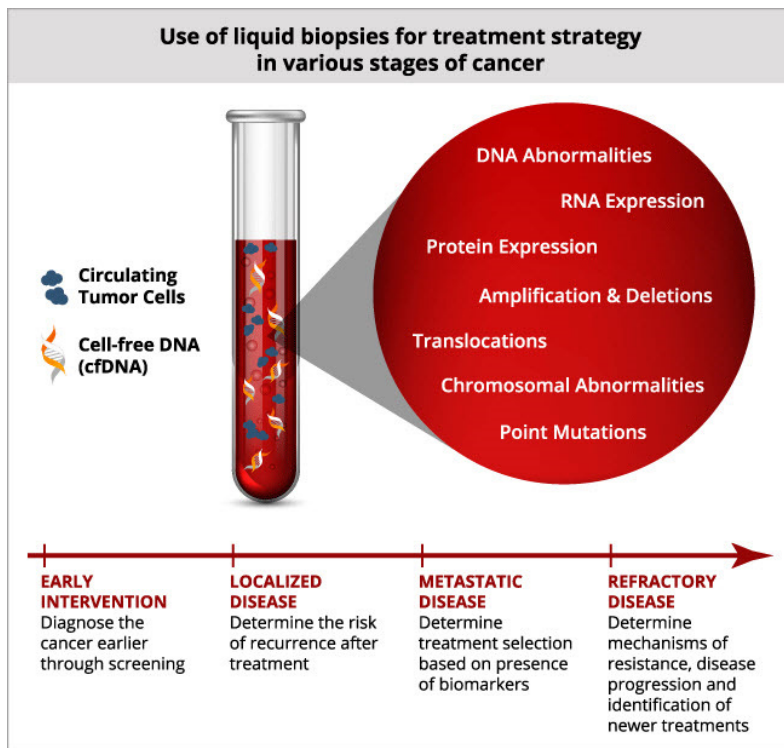
De excretie van vanillylmandelzuur (VMA) en homovanillinezuur (HVA) per milligram uitgescheiden creatinine wordt vóór de therapie gemeten. Deze afbraakproducten van catecholamine worden in de urine gemeten (41). Het verzamelen van urine gedurende 24 uur is niet noodzakelijk. Indien deze waarden verhoogd zijn, kunnen deze markers gebruikt worden om de persistentie van de ziekte te bepalen. Het bepalen van serum catecholamines wordt niet routinematig uitgevoerd om de diagnose van neuroblastoom vast te stellen, maar dit kan uitgevoerd worden in bijzondere omstandigheden. Homovanillinezuur (HVA) is het eindproduct de metabolisatie van dihydroxyphenylalanine (DOPA) en dopamine. Vanillylmandelzuur (VMA) ontstaat uit de metabolisatie van epinefrine en norepinefrine.

3.5.4 Biopsie

Het tumorweefsel, dat door biopsie verkregen wordt, is vaak nodig om alle biologische gegevens te verzamelen die nodig zijn voor de toewijzing aan risicogroepen en de daaropvolgende behandelingsstratificatie in huidige klinische studies van o.a. de Children's Oncology Group (COG) en International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma (SIOPEN). Om de International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC) te bepalen is het verkrijgen van weefselbiopsie een absoluut noodzakelijk (46). In het kader van de risicotoekenning voor COG studies, wordt INPC gebruikt om de behandeling te bepalen voor patiënten met stadium 3-ziekte, patiënten met stadium 4S-ziekte en patiënten van 18 maanden of jonger met stadium 4-ziekte. Bovendien is er een aanzienlijk aantal tumorcellen nodig om *MYCN copy number*, DNA-index en de aanwezigheid van segmentale chromosomale afwijkingen te bepalen (zie prognose).

3.5.5 Liquid biopsies

De voorbije jaren is het meer en meer duidelijk geworden dat circulerende tumorcellen of vrij circulerende nucleïne-zuren (*cfNA: cell free Nucleic acids*) in bloed of plasma een evenwaardig alternatief kunnen bieden voor een tumorbiopsie. Deze *liquid biopsies* kunnen gebruikt worden voor diagnose, monitoring van therapierespons en het voorspellen van herval bij kankerpatiënten (47) (48) (zie figuur 7). In het geval van NB werden aan de hand van *liquid biopsies* reeds *MYCN* amplificaties en *ALK* mutaties gedetecteerd (49) (50). Van Roy et al. detecteerden *DNA copy-number alterations* (CNAs) aan de hand van *shallow whole genome sequencing* (sWGS). Ze stelden voor om bij hoog-risico NB patiënten deze sWGS als een alternatief te beschouwen voor een tumorbiopsie, maar bij laag-risico patiënten zal dit biopsie echter nog steeds nodig zijn.



Figuur 7 verschillende doeleinden van liquid biopsies volgens <https://www.healio.com/hematology-oncology/>.

3.6 Prognose en risico

Er zijn verschillende prognostische kenmerken geïdentificeerd die geassocieerd kunnen worden met *patient outcomes*.

Behandelstrategieën voor kinderen met neuroblastoom zijn op maat gemaakt volgens het voorspelde antwoord op therapie en het risico op herval. Deze prognostische factoren variëren van klinische factoren zoals tumorstadium en de leeftijd van de patiënt bij diagnose, biologische kenmerken van de tumor zoals histologie en DNA-ploidie, cytogenetische factoren zoals amplificatie van het *MYCN* oncogen, chromosomale deleties, *gain of function* mutaties en serumtumormerkers eveneens als andere moleculaire markers (51).

Er zijn ook echter raciale verschillen in tumorbiologie, waarbij Afro-Amerikaanse kinderen een hogere kans hebben om een hoog-risico neuroblastoom en fatale *patient outcomes* te ontwikkelen. Afro-Amerikaanse en Indiaanse patiënten hebben eveneens een grotere kans om een meer agressieve vorm te ontwikkelen met lagere overlevingspercentages, hoewel de oorzaak van deze verschillen onduidelijk is (2) (52).

Risicostatificatie bij neuroblastoom is in de loop der tijd geëvolueerd om zowel eenvoudig te meten klinische variabelen, zoals leeftijd van de patiënt en tumorstadium, als genomische afwijkingen te omvatten. Deze variabelen voorspellen het klinisch resultaat (6).

De International Neuroblastoma Staging System (INSS) richtlijnen werden ontwikkeld in 1986 en vervolgens herzien in 1993 (zie figuur 8). INSS wordt gebruikt om de stadia van neuroblastoom tumoren te bepalen op basis van gegevens van de chirurgische resectie. De ontwikkeling en het gebruik van internationaal stadiëringssystemen zoals de INSS hebben gezorgd voor consistentie in de stadiëring van patiënten met neuroblastoom wereldwijd. Echter, samenwerkingsgroepen vanuit verschillende regio's ter wereld gebruikten niet dezelfde merkers om het risico en de behandelingsstrategieën van patiënten te classificeren. Hierdoor waren de patiëntencohorten niet uniform, waardoor het moeilijk is om de resultaten van klinische trials te vergelijken (2).

Stage	Description
1	Localized tumor with gross total resection with or without microscopic residual disease, and identifiable bilateral lymph nodes negative microscopically
2A	Unilateral tumor with incomplete resection, and Identifiable bilateral lymph nodes negative microscopically
2B	Unilateral tumor with complete or incomplete resection, and Microscopically positive ipsilateral nodes but contralateral regional lymph nodes negative
3	Crosses midline with or without positive regional lymph nodes, or Unilateral tumor with positive contralateral regional lymph nodes. Midline tumor with positive bilateral regional lymph nodes
4	Metastatic disease to distant lymph nodes, bone, bone marrow, liver and/or other organs (except as in 4S)
4S	Stage 1 or 2 primary tumor with metastases limited to liver, skin, and/or bone marrow (with <10% tumor) in a child less than one year of age

Figuur 8 INSS , naar Brodeur et al. (41)

Om de resultaten van klinische studies gemakkelijker te vergelijken, hebben onderzoekers van grote nationale en internationale samenwerkingsverbanden uit Noord-Amerika, Europa en Azië in 2004 de International Neuroblastoma Risk Group (INRG) ontwikkeld. Aan de hand van gegevens van 8800 internationale patiënten met neuroblastoom ontstond dit classificatiesysteem om de INSS bij te werken en te vervangen (2). Een cohorte van 8800 patiënten, behandeld gedurende 12 jaar, werden geanalyseerd op basis van 13 potentiële prognostische factoren (53) (54). Het INRG-classificatiesysteem is ontwikkeld op basis van de analyse van deze 13 klinische en biologische variabelen om de effecten na te gaan op event-vrije overlevingspercentages. Leeftijd van de patiënt bij diagnose, tumor stadium, serum lactaat dehydrogenase, ferritine waarden, histologische categorie van de tumor, graad van differentiatie, tumor mitose-karyorrhesis index (MKI), *MYCN* genamplificatiestatus, de aanwezigheid of afwezigheid van chromosoom 1p of 11q abnormaliteiten, DNA-ploidie, de primaire tumorplaats (bijnier of niet-adrenaline) en de aanwezigheid of afwezigheid van gemetastaseerde ziekte behoren allen tot deze prognostische factoren (53) (54).

Er werden 4 prognostische klinische categorieën geïdentificeerd (zeer laag-risico, laag-risico, intermediair-risico en hoog-risico) uit analyses van de 7 belangrijkste prognostische factoren op het moment van de diagnose van de tumoren: leeftijd bij diagnose, tumorstadium, histologische categorie van de tumor, graad van differentiatie, DNA-ploïdie en *copy-number status* van *MYCN* en het chromosoom 11q. De categorieën zeer laag-risico, laag-risico, intermediair-risico en hoog-risico zijn gecorreleerd respectievelijk met de *5 jaar event free survival (EFS)* van > 85%, ≥75% tot ≤ 85%, ≥50% tot ≤ 75% of ≤ 50% (53).

Het INRG staging systeem (INRGSS) maakte gebruik van preoperatieve radiologische kenmerken en *image-defined risk factors* (IDRFs) (53) (zie figuur 9). Een implementatie van het classificatiesysteem is aan de gang in de huidige neuroblastoom klinische onderzoeken en zal een betere vergelijking toelaten van de resultaten van de *trials* in verschillende landen (6). In dit systeem werd NB opgedeeld in lokale tumoren (L), gemetastaseerde tumoren (M) en specifieke presentatie tumoren (MS). Een verder onderscheid werd nog gemaakt in het L stadium waarbij het L1 stadium de afwezigheid en het L2 stadium de aanwezigheid van een aantal risicofactoren kenmerkt. Deze risicofactoren worden bepaald tijdens de beeldvorming.

Stage	Description
L1	Localized tumor not involving vital structures as defined by the list of IDRFs and confined to one body compartment
L2	Loco regional* tumor with presence of one or more IDRF
M	Distant metastatic disease (except stage MS)
MS	Metastatic disease in children younger than 547 days and metastases confined to skin, liver and/or bone marrow (<10% of total nucleated cells on smears or biopsy)

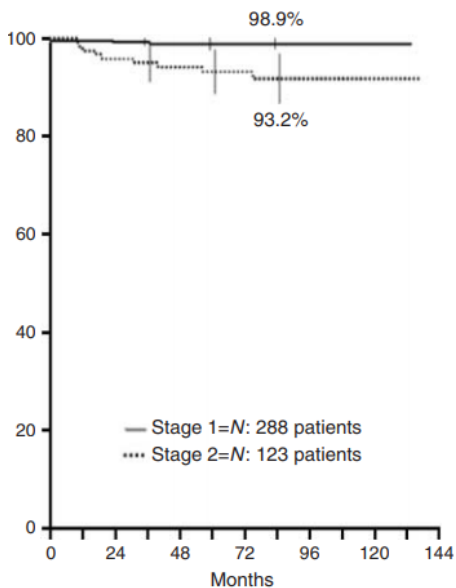
Figuur 9 INRGSS , naar Monclair et al. (53).

Voor de risico stratificatie en prognosebepaling werden nieuwe biomerkers en nieuwe cellulaire *pathways* geïdentificeerd. Deze cellulaire *pathways* kunnen een doeleinde zijn voor nieuwe therapeutische strategieën.

3.7 Behandeling laag-risico en intermediair-risico neuroblastoma

Patiënten met een laag-risico of intermediair-risico neuroblastoom zijn een heterogene groep, die iets meer dan de helft van de nieuw gediagnosticeerde patiënten vertegenwoordigen. Patiënten met niet-*MYCN* geamplificeerde, gelokaliseerde tumoren (INRGSS L1) evenals de meeste kinderen met metastasen (INRGSS stage MS) maken onderdeel uit van deze groep. De overlevingsresultaten zijn over het algemeen uitstekend voor deze jonge kinderen, zelfs met verschillende behandelingsmogelijkheden (55) (56). Deze mogelijkheden bestaan uit onder andere uitsluitend observatie ofwel chirurgische resectie ofwel matige doses chemotherapie met chirurgische resectie.

Chirurgische resectie is in het algemeen genezend voor patiënten met gelokaliseerde, reseceerbare ziekte. Voor patiënten die recidieven hebben na resectie kan chemotherapie een effectief reddingsmiddel zijn (57) (58) (zie figuur 10).



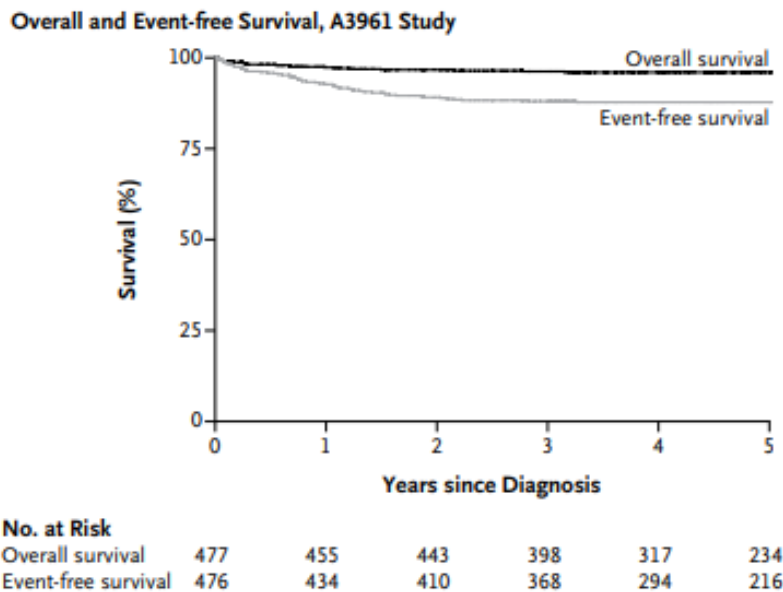
Figuur 10 de 5 jaar OS voor stadium 1 was 98.9% , voor stadium 2 93.2% , naar De Bernardi et al. (58).

Tumoren die zich in een laag stadium bevinden met gunstige biologische kenmerken zullen vaak niet metastaseren, zelfs niet na onvolledige resectie. Daarom is chemotherapie voorbehouden voor patiënten met levens- of orgaanbedreigende symptomen, zoals ruggenmerg compressie of respiratoire problemen/symptomen.

Prospectieve studies bij zuigelingen met gelokaliseerde bijniertumoren toonden uitstekende resultaten waarbij een behandeling met uitsluitend observatie werd toegepast (59). Deze tumoren hebben de neiging om spontaan te verkleinen en deze kunnen met observatie behandeld worden en vereisen geen chirurgische resectie of chemotherapie. In een COG prospectief onderzoek bij zuigelingen van minder dan 6 maanden oud met kleine

bijniermassa's, werden 81% van de patiënten effectief behandeld met afwachterende observatie alleen, terwijl de resterende 19% uiteindelijk een resectie onderging. Geen enkele patiënt vereiste chemotherapie. De 3jaars EFS was 97% met een OS van 100% (59). Deze strategie wordt standaard toegepast in de praktijk en het huidige COG ANBL1232-onderzoek (NCT02176967) gaat na of observatie ook gepast is voor de leeftijdsgroep van 12 maanden. Zuigelingen met stadium 4S / MS neuroblastoom kunnen spontane regressie vertonen, waarschijnlijk omwille van de unieke biologische kenmerken van neuroblastoom bij zuigelingen, inclusief bijna-triploïde DNA-inhoud en toename van expressie van genen uit het chromosoom 1p36-gebied. Een subgroep van deze patiënten vereist echter onmiddellijke behandeling wegens een verhoogd risico op complicaties en overlijden als gevolg van de ziekte. Deze subgroep omvat patiënten met enorme hepatomegalie of zeer grote tumoren die mechanische obstructie veroorzaken, respiratoire nood en leverdysfunctie. De jongste patiënten (minder dan 3 maanden oud) met stadium 4S / MS neuroblastoom kennen de hoogste sterftcijfers en vereisen strikte observatie en onmiddellijke behandeling bij het vertonen van een van bovenstaande symptomen (60). Een scoresysteem dat de klinische verslechtering van bovenstaande symptomen evalueert wordt prospectief onderzocht in een COG studie (NCT02176967).

De behandeling voor een intermediair-risico (IR) neuroblastoom bestaat uit matige doses van multimodale chemotherapie en chirurgische resectie. Met behulp van klinische en genetische gegevens werden de behandelingen voor deze patiënten verminderd, terwijl een uitstekende overleving behouden bleef. Risicofraticatie werd bepaald op basis van de leeftijd van de patiënt en tumorstadium, maar ook op biologische kenmerken van de tumor, inclusief DNA-inhoud, segmentale chromosomale afwijkingen en histologische kenmerken. De COG A3961-studie verdeelde patiënten met IR neuroblastoom in verschillende groepen (NCT00003093). Patiënten met gunstige biologische kenmerken (met zowel gunstige histologie als een DNA-index van meer dan 1) en patiënten met ongunstige biologische kenmerken (hebben ongunstige histologie, een DNA-index van 1 of minder, of beide), waarbij patiënten met een gunstige biologie 4 cycli kregen van chemotherapie en mensen met ongunstige biologie 8 cycli ontvingen. De definitieve resultaten toonden een EFS aan van 88% en een 96% OS na 3 jaar met deze aanpak, wat suggereert dat subgroepen van patiënten uitstekende resultaten kunnen blijven behouden met verminderde behandeling (zie figuur 11) (55).



Figuur 11 EFS en OS bij intermediair-risico NB patiënten, naar Baker et al.(55).

Een vermindering van het aantal cycli voor bepaalde subgroepen van patiënten wordt geëvalueerd in bijkomende onderzoeken. In een recent Europees onderzoek ontvingen kinderen met gelokaliseerd, niet-operatief neuroblastoom zonder *MYCN* amplificatie chemotherapie met een verminderde dosisintensiteit vooraleer een poging werd ondernomen tot chirurgische resectie. Hoewel deze strategie gunstige resultaten aantoonde bij kinderen ouder dan 12 maanden, werden er slechtere resultaten ondervonden bij kinderen met gunstige klinische kenmerken maar met tumoren met ongunstige genomische kenmerken of histologie dan bij kinderen met gunstige biologische eigenschappen (61). Bij kinderen tussen 12 en 18 maanden met stadium 4 en diploïde neuroblastoom tumoren of voor diegenen met gelokaliseerde inoperabele tumoren met een ongunstige histologie, kan therapie niet worden gereduceerd als gevolg van slechtere resultaten voor deze patiënten (61) (55).

In het algemeen, blijven resultaten voor patiënten met een laag-risico of intermediair-risico neuroblastoom uitstekend ondanks significante reducties in therapie tijdens de afgelopen jaren. Inspanningen om blootstelling aan chemotherapie en chirurgische morbiditeit te verminderen, zijn aan de gang in bepaalde subsets van deze groep. De huidige COG studie ANBL1232 (NCT02176967) onderzoekt verdere reductie van therapie voor kinderen jonger dan 18 maanden met gelokaliseerd tumoren en gunstige biologie. Ook wordt de uitbreiding van de observatie voor zuigelingen jonger dan 12 maanden met kleine tumoren verder bestudeerd. Deze studie onderzoekt ook een klinisch scoresysteem om de therapie te begeleiden bij niet hoog-risico patiënten met de hoogste sterftcijfers, namelijk zuigelingen met stadium 4S-ziekte met evoluerende hepatomegalie (2).

3.8 Behandeling hoog-risico neuroblastoom

Ongeveer de helft van alle NB gevallen behoort tot de hoog-risico groep. Tot deze categorie van hoog-risico (HR) neuroblastoom behoren *MYCN* geamplificeerde tumoren van alle INSS-stadia (stadium 1 *MYCN* geamplificeerde tumor blijft controversieel) en metastatische neuroblastomen stadium 4 op de leeftijd van 18 maanden (INRG-groep M).

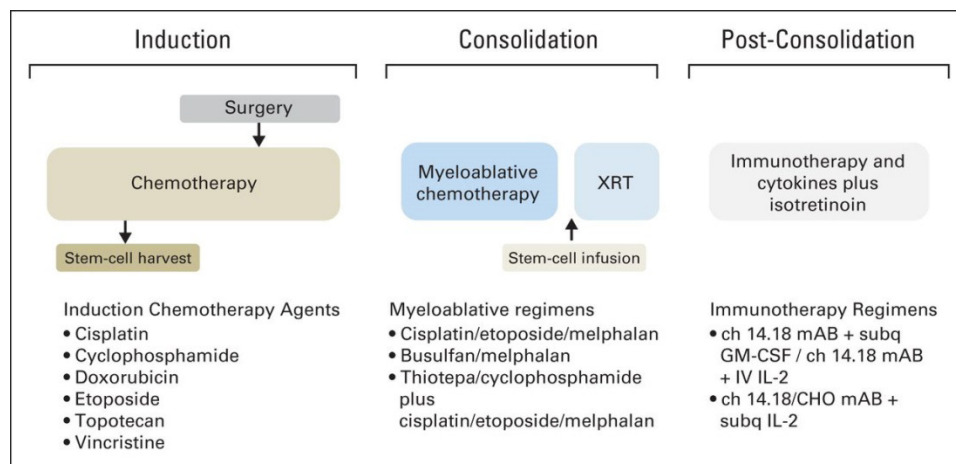
Meer dan de helft van de overlevenden op de lange termijn lijden aan laattijdige complicaties zoals hoge frequentie gehoorverlies en endocriene defecten (62) (zie figuur 12). De teleurstellende resultaten bij hoog-risico neuroblastomen zijn niet specifiek voor pediatrische oncologie: beperkte resultaatverbetering heeft plaatsgevonden in andere metastatische solide tumoren zoals medulloblastoom, zacht weefsel sarcoom, bottumoren, hepatoblastoom. Voor al deze patiënten zijn doeltreffendere therapieën met minder lange termijn gevolgen urgent noodzakelijk (63).

Potential Late Effect	Therapeutic Exposure
Thyroid dysfunction	Radiation to the neck or scatter Total body irradiation Iodine-131 Meta-iodobenzylguanidine (I-131 MIBG) therapy High-dose alkylating agents prior to transplant
Growth hormone deficiency	Radiation to the hypothalamic-pituitary axis (≥ 18 Gy) Total body irradiation
Gonadal dysfunction	Alkylating agents Cisplatin Radiation to the gonads
Skeletal dysplasia	Radiation to the spine or long bones Cis-retinoic-acid
Diabetes Mellitus	Abdominal radiation Total body irradiation
Hearing loss	Cisplatin Myeloablative doses of carboplatin Ototoxic antibiotic exposures
Pulmonary dysfunction	Busulfan Radiation to the chest or upper abdomen
Cardiac dysfunction	Anthracyclines Radiation to the chest or upper abdomen
Renal dysfunction	Nephrectomy Platinum-based chemotherapy (cisplatin, carboplatin) Radiation therapy involving the kidney
Subsequent malignancies	Epipodophyllotoxins Alkylating agents Anthracyclines Radiation therapy

Figuur 12 potentiële laattijdige effecten ten gevolge van NB therapie , naar Friedman et al. (64)

Hoewel de behandelingsmogelijkheden die worden gebruikt voor kinderen met een hoog-risico neuroblastoom de afgelopen tien jaar iets geëvolueerd zijn, bevatten de standaardregimes nog steeds 4 hoofdcomponenten: (1) inductietherapie, (2) consolidatietherapie en (3) onderhoudstherapie (zie figuur 13) (2). De huidige behandeling van HR neuroblastoompatiënten bestaat uit 4-9 maanden chemotherapie voor remissie-inductie, chirurgische tumorverwijdering, myeloablatieve chemotherapie met autologe

stamceltransplantatie en 6-12 maanden onderhoudsbehandeling (momenteel met retinoïnezuur / retinoïde structuur).



Figuur 13 standaardtherapie voor hoog-risico NB, naar Pinto et al. (65).

Om de lokale behandeling te vergemakkelijken, wordt vooraf de inductietherapie toegepast met als doel de tumoromvang te reduceren. Voor deze inductiefase wordt chemotherapie gebruikt, waarbij verschillende combinaties van producten mogelijk zijn. (66) Patiënten die niet reageren op de inductiechemotherapie of patiënten die ziekteprogressie vertonen in deze behandelingsfase zijn moeilijk te behandelen. Bij deze patiëntengroep daalt de overleving op lange termijn onder 20% (2). COG inductieschema's bestaan uit combinaties van anthracyclines, alkylerende middelen, platinumbevattende middelen en topoisomerase II inhibitoren (67). Deze worden in 5 tot 7 cycli toegediend, elke 21 dagen. SIOPEN therapie vindt plaats elke 10 dagen (68).

Myeloablatieve chemotherapie is een geaccepteerde standaardtherapie (69). Over de impact van volledige chirurgische verwijdering van de primaire tumor, het gebruik van percutane radiotherapie, het gebruik van therapeutische MIBG-bestraling en het type onderhoudsbehandeling wordt nog gediscussieerd (63).

4 Methodologie

Om relevante literatuur te vinden over neuroblastoom werd stap per stap te werk gegaan. Allereerst werd met prof. dr. Lammens een gesprek gevoerd over de mogelijke inhoud en de aandachtspunten. Prof. dr. Lammens gaf reeds in het eerste gesprek aan wat de grote thema's waren die absoluut aan bod moesten komen. Voor het schrijven van de introductie werden artikels gevonden aan de hand van Mesh-termen zoals "Neuroblastoma", "Prognosis", "Diagnosis". Ook risk assessment werd als bijkomende zoekstrategie gebruikt.

Vervolgens werden de thema's die aan bod moesten komen in de resultaten gezocht in PubMed. Als eerste komt de anti-gd2 therapie aan bod. De relevante artikels werden gevonden op basis van "Neuroblastoma AND anti-GD2" als zoekopdracht in te geven. Na aanvinken van 'clinical trial' en '10 years' werden 16 artikels weerhouden. Ook werd 'review' aangevinkt en werden op die manier 25 reviews gevonden. Aan de hand van enkele van deze reviews kon een inleidend woord rond anti-gd2 therapie kort toegelicht worden. Belangrijke artikels rond vorinostat en HDACi werden door prof. dr. Lammens gemaild en verwerkt in de tekst.

Daaropvolgend werden de ALK-inhibitoren in de resultaten opgenomen. Als zoekopdracht werd "anaplastic lymphoma kinase neuroblastoma" ingevuld en verder werd 'clinical trial' geselecteerd. Zo werden 3 artikels weerhouden. Ook werd er gezocht naar relevante reviews.

Vervolgens werden de MDM2-inhibitoren besproken in de resultaten. In overeenstemming met prof. dr. Lammens werd hier uitdrukkelijk gezocht naar artikels van Van Maerken et al. Aan de hand van 'Van maerken nutlin' als zoekopdracht werden 6 artikels gevonden. Om een volledig beeld te krijgen over deze therapie werd ook gezocht naar enkele reviews.

Daarna werden op basis van 'neuroblastoma cdk' als zoekopdracht 41 artikels gevonden bij de bespreking omtrent CDK inhibitoren.

Over het algemeen werd bij de selectie van de artikels rekening gehouden met de relevantie van het abstract, het jaartal en de meerwaarde voor deze thesis. Belangrijke artikels werden ook geselecteerd via 'related citations' en de referentielijst van bepaalde artikels.

5 Resultaten

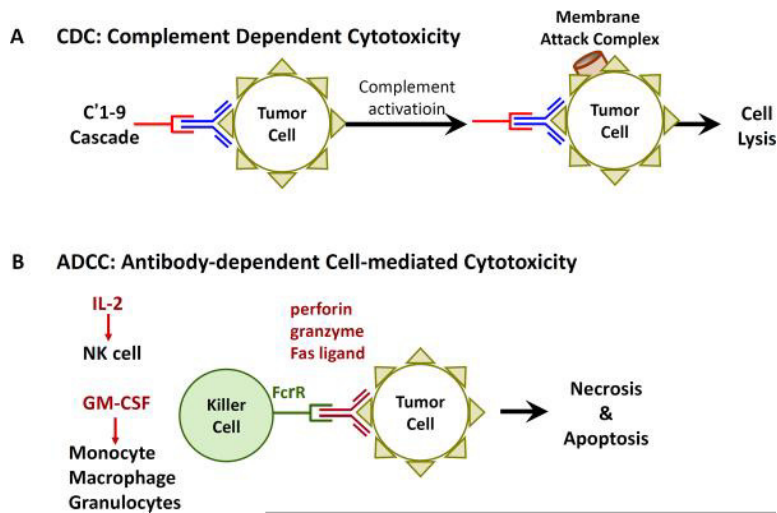
5.1 Anti-GD2

5.1.1 Werkingsprincipe

De traditionele multimodale therapeutische mogelijkheden zoals chemotherapie, chirurgische excisie van de primaire tumor en radiotherapie kunnen de tumorbelasting drastisch verminderen in inductieschema's en consolidatieschema's. Vele hoog-risico patiënten hervallen echter, waarbij metastatische foci, resistent aan verschillende farmaca, voorkomen (33). Het centrale aandachtspunt in de verdere behandeling van NB is de ontwikkeling van farmaca en/of therapeutische modaliteiten gericht op het doden van het beperkt aantal cellen die de inductie- en consolidatietherapie overleefden. Deze cellen vormen de basis voor de metastasen door proliferatie en migratie. NB cellen brengen net zoals andere neurectodermale tumoren het membraan disialoganglioside GD2 tot expressie op het oppervlakte van hun cellen. Dit wordt uniform tot expressie gebracht door neuroblastomen en gliomen, alsook sommige melanomen en sarcomen (70). In normale weefsels, is de GD2-expressie zwak en beperkt tot neuronen, melanocyten en perifere pijnvezels (70). Aldus is GD2 een ideaal antigeen doelwit voor immunotherapie van NB.

GD2 is een molecule waartegen monoklonaal antilichamen (mAbs) zijn ontwikkeld (71) (70). Deze mAbs binden aan cellen met hoge affiniteit, waardoor ze vooral werken aan de hand van *antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)* (71) (zie figuur 1). Aangezien ADCC bekend staat als het belangrijkste mechanisme bij mAb-afhankelijke kankertherapie, werd eerst 14G2a-afhankelijke ADCC activiteit tegen GD2-positieve HTLA-230 neuroblastoomcellen onderzocht. Deze activiteit wordt gemedieerd door macrofagen en/of *natural killer (NK)*-cellen. Beide celtypes zijn betrokken, hoewel macrofagen iets effectiever zijn in een dosisafhankelijke manier. De cytotoxische activiteit van de macrofagen is bovendien onafhankelijk van *effector/target (E/T) cell ratio*, terwijl NK-cellen alleen een cytotoxisch effect verkrijgen vanaf een E/T ratio van 50 of meer. *In vitro* experimenten bevestigen ook dat *complement-dependent cytotoxicity (CDC)* een rol speelt bij de mAb-afhankelijke kankertherapie (72) (zie figuur 14).

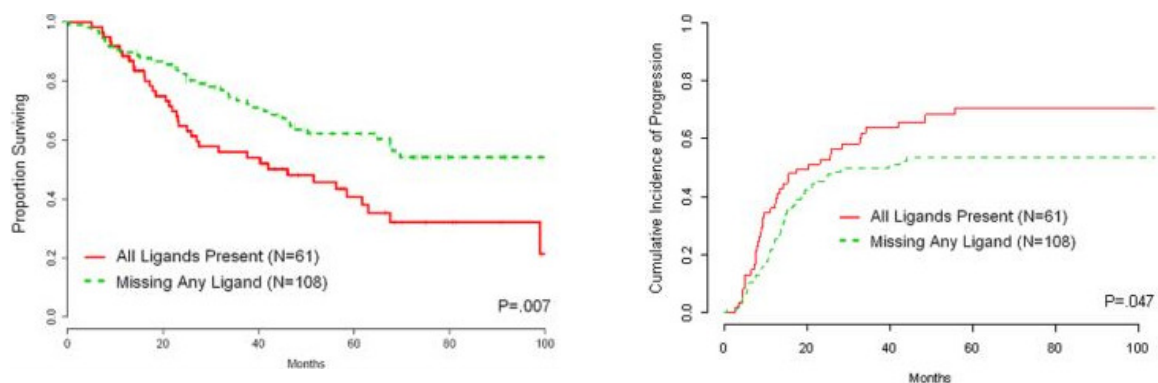
Om de effector mechanismen te bestuderen, werd tevens een *in vivo* experimenteel model opgestart. In deze studie werd een lage dosis anti-GD2 mAb therapie geëvalueerd in een dierenmodelstudie waarbij een *minimal residual disease (MRD)* status in NB werd nagebootst (73). In tegenstelling tot *in vitro* observaties, volstond een totale dosis van 4 mg/kg 14G2a anti-GD2 mAb om 100% van de dieren te beschermen. Deze *in vivo* observaties impliceren dat macrofagen marginaal (of helemaal niet) betrokken zijn bij ADCC (74).



Figuur 14 Werkingsmechanisme van anti-GD2 therapie bij NB op basis van ADCC en CDC, naar Matthay et al (75).

5.1.1.1 KIR en KIR ligand

Verschillen in immuunfunctie van de NB patiënten kunnen de variabiliteit in klinische presentatie van neuroblastoom en het antwoord op immunotherapie verklaren. NK-cellen dragen bij aan ADCC. *Killer-Immunoglobulin-like Receptors (KIRs)* zijn een familie van sterk polymorfe receptoren die de functie van NK-cellen reguleren via activerende of inhiberende signalen (76). Het merendeel van de inhiberende KIRs hebben liganden die behoren tot de HLA klasse I-familie. NK-cellen die inhiberende KIRs tot expressie brengen, interverniëren indien de ADCC daalt wanneer de KIR interageren met de KIR liganden op de tumor (77) (78). Er werd beschreven dat NB patiënten die 1 KIR ligand ontbreken (“*KIR-ligand missing*”) die interageert met een inhiberende KIR een betere *outcome* hebben, in vergelijking met NB patiënten die alle KIR liganden overerven (“*KIR-ligands present*”) bij het toedienen van anti-GD2 mAb therapie (79) (80) (81) (zie figuur 15).



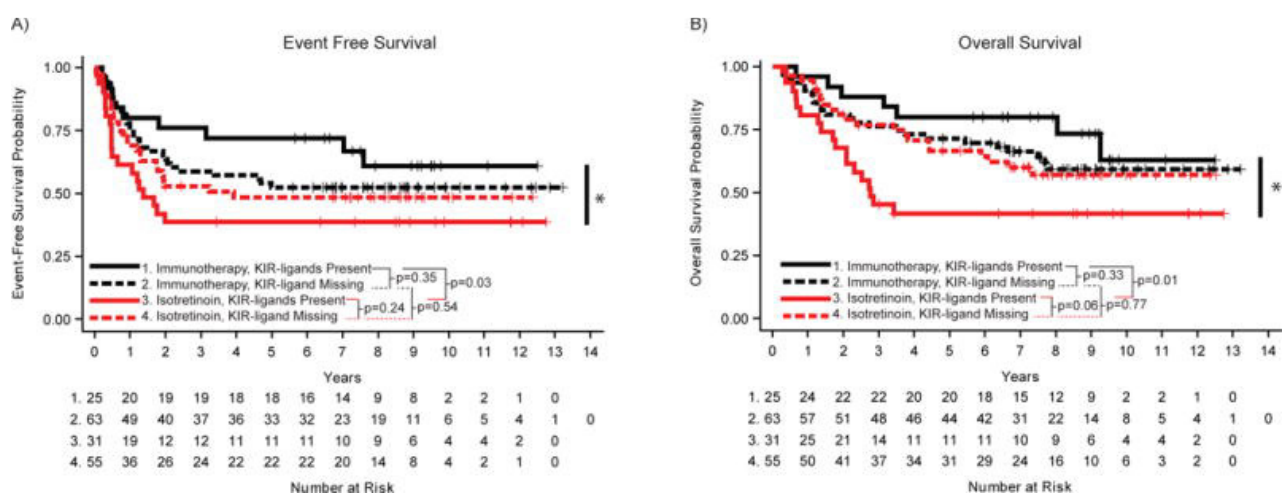
Figuur 15 *Overall survival* en cumulatieve incidentie van progressie bij stadium 4 NB patiënten met vergelijking tussen patiënten die alle KIR liganden overerven en patiënten die 1 of meer KIR liganden ontbreken, naar Venstrom et al (79).

De voorgaande studies omtrent dit onderwerp rapporteerden een betere *outcome* na behandeling met anti-GD2 mAb therapie bij *KIR-ligand missing* patiënten in tegenstelling tot *KIR-ligands present* patiënten (78) (81) (79) (80). Deze studies zijn afkomstig van het Memorial Sloan Kettering Cancer Center waarbij murien 3F8 anti-GD2 mAb therapie werd onderzocht bij patiënten na het voltooien van chemotherapie. Individuen waarbij minstens 1 KIR ligand afwezig is, bezitten NK cellen die een sterkere celdood kunnen induceren in tumorcellen die HLA tot expressie brengen (82) (83)(84) (77). Er wordt verondersteld dat deze individuen immunotherapie niet nodig hebben om hun NK cel capaciteit te stimuleren. In contrast tot voorgaande rapporten, werd er door Erbe et al. echter geen associatie beschreven tussen *KIR-ligand missing* en een verbeterde *outcome* bij patiënten die behandeld werden met immunotherapie (85).

Een significant voordeel in EFS en OS werd vermeld bij patiënten met een KIR ligand aanwezig genotype indien deze met immunotherapie behandeld werden in tegenstelling tot isotretinoïne alleen (85) (zie figuur 3).

In de groep van patiënten die behandeld werden met isotretinoïne werd een toegenomen OS beschreven bij patiënten waarbij een KIR ligand ontbreekt (OS $p=0.06$) (zie figuur 3). Dit zou mogelijks te wijten zijn aan een toegenomen inhibitie op NK cellen door KIR liganden waardoor patiënten met een genotype waarbij een KIR ligand ontbreekt minder inhibitie ondervinden en bijgevolg de belasting van de tumor beter kunnen opvangen in afwezigheid van immunotherapie.

In het algemeen geldt dat ongeacht het patiënt KIR / KIR-ligand genotype de groep patiënten die immunotherapie ontving een betere uitkomst had vergeleken met patiënten die alleen isotretinoïne ontvingen (85) (zie figuur 16).



Figuur 16 Associatie tussen KIR/KIR ligand status en *outcome*, naar Erbe et al (85).

5.1.1.2 Transverse myelitis

Ding et al. rapporteren 3 patiënten met klinische en radiologische kenmerken van transverse myelitis (TM) volgend op immunotherapie met dinutuximab, een ch14.18 anti-GD2 mAb (86). Deze 3 personen ervoeren bilaterale zwakte in de onderste ledematen, urinaire retentie en progressie naar paraplegie. De klinische symptomen kwamen tot uiting gedurende of volgend op de tweede cyclus van dinutuximab. Dit wijst op alloreactiviteit bij individuen die eerder blootgesteld werden aan dinutuximab. De MRI scan vertoonde diffuse abnormaliteiten ter hoogte van de ruggengraat, vanaf het C4-C5 niveau tot de conus medullaris. Deze abnormaliteiten komen overeen met transverse myelitis. De behandeling met dinutuximab werd stopgezet en de individuen kregen corticosteroïden toegediend. Alle patiënten vertoonden snel klinische verbetering. Aangezien slechts 3 patiënten beoordeeld werden, kunnen specifieke factoren die een predispositie kunnen veroorzaken voor het ontwikkelen van transverse myelitis door dinutuximab niet bepaald worden. Twee patiënten kregen dinutuximab op de wijze, beschreven in de COG studie, terwijl de andere patiënt dinutuximab in combinatie met irinotecan en temozolomide kreeg (87). Alle patiënten kregen voorafgaand radiotherapie op plaatsen grenzend aan de ruggengraat.

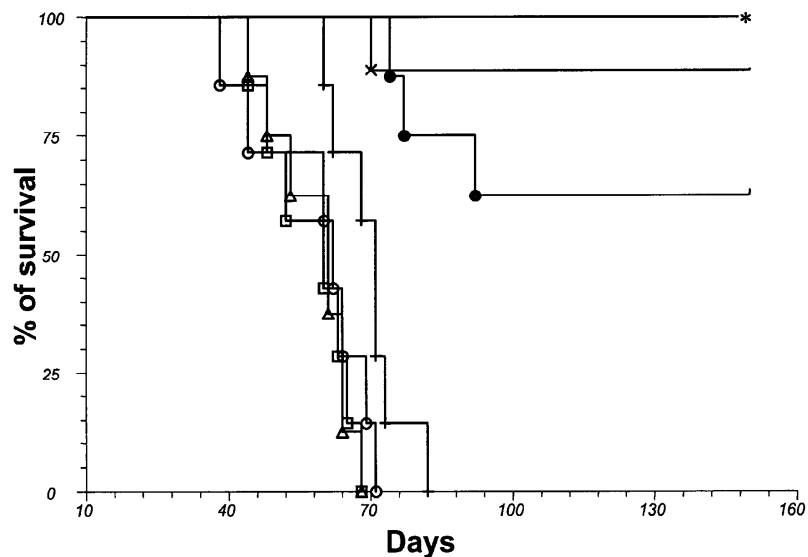
In normale weefsels komt GD2 tot expressie op neuronen, pijnvezels en melanocyten. Bij ratten wordt allodynie beschreven na dinutuximab-toediening, bij mensen daalt het serum-complementniveau en herstelt vervolgens na 24 uur (88). Hoewel dinutuximab de bloedhersenbarrière niet in aanzienlijke hoeveelheden doorkruist, bindt murien anti-GD2 mAb aan de granulaire laag van het cerebellum, nervus vagus en nervus ischiadicus (89). m3F8 doorbreekt de bloedhersenbarrière en veroorzaakt posterieur reversibel encefalopathiesyndroom (90). De pathologie van transverse myelitis na toediening van dinutuximab kan mogelijks te wijten zijn aan een interactie tussen dinutuximab en ruggengraatneuronen die GD2 tot expressie brengen. Aangezien deze complicatie nog niet eerder vermeld is in voorgaande anti-GD2 klinische studies en deze complicatie zeldzaam is, kan de transverse myelitis te wijten zijn aan een meer specifieke anti-idiotypische kruisreactie tussen antidinutuximab antilichamen en ruggengraatneuronen. Het is eveneens mogelijk dat andere factoren, zoals radiotherapie resulteren in een verhoogde permeabiliteit van de bloedhersenbarrière voor dinutuximab. Transverse myelitis is dus een ernstige, maar reversibele complicatie bij toediening met dinutuximab. Vroege detectie, behandeling en revalidatie zijn geassocieerd met een snel en bijna volledig herstel.

5.1.2 Ontwikkelingsfasen

De monoklonale antilichaamtherapie gericht tegen de disialoganglioside GD2 is de best ontwikkelde immunotherapie voor NB. Er zijn reeds verschillende varianten ontwikkeld (muriën, chimeer, gehumaniseerd) (91). Het is aangetoond dat de combinatie van chimeer ch14.18, ook gekend als dinutuximab, anti-GD2 met cytokinen (IL-2 en GM-CSF) de 2 jaar EFS en OS significant verbetert bij hoog-risico NB patiënten waarbij deze combinatie als een onderdeel van consolidatietherapie wordt toegepast en dit bij nieuw gediagnosticeerde NB patiënten (87). Echter, werden er frequenter bijwerkingen zoals hypotensie, capillaire-lek-syndroom, allergische reacties en pijn beschreven (87). Het muriene anti-GD2 mAb 3F8 (in combinatie met GM-CSF) heeft doeltreffendheid vertoond als consolidatietherapie voor patiënten in de eerste remissie (80). Data van de *German Cooperative Neuroblastoma trials* toont aan dat patiënten die enkel anti-GD2 antilichaam ontvingen, ook een lange termijn overlevingsvoordeel hebben (92). Het is belangrijk om te beseffen dat anti-GD2 immunotherapie vooral effectiviteit heeft als consolidatietherapie na complete respons (CR) of partiële respons (PR) aan het einde van de inductie. Het is niet duidelijk of patiënten met resistente of recurrenente *bulky disease* een potentieel voordeel hebben. Polymorfismen in de Fcγ receptor zijn geassocieerd met een betere respons tegen anti-GD2 immunotherapie (81) (93).

In fase I en II *clinical trials* met gebruik van muriene (14G2a) en muis/mens chimere (ch.14.18) monoklonale antilichamen bij NB-patiënten vertoonden enkele patiënten een langdurige en volledige remissie (94) (95). Grote tumormassa's zijn minder toegankelijk voor mAbs. Patiënten met MRD, waarbij tumorcellen circuleren in de bloedbaan en het beenmerg, bleken een betere respons te hebben op deze anti-GD2 mAbs immunotherapie. In een studie van Raffaghello et al. bleek 14G2a mAb extreem effectief in het verhinderen van micro- en macroscopische metastasevorming en verlengt 14G2a mAb de lange termijn overleving van menselijke NB- dragende muizen (96). Muizen werden intraveneus HTLA 230 cellen toegediend en kregen een behandeling met verschillende doses van 14G2a mAb (96). Een dosisafhankelijk effect werd beschreven en dit effect was significant vanaf een totale dosis van 1mg/kg. Hierbij werd de lange termijn overleving verlengt bij 60 % van de dieren. Met een totale dosis van 2 mg/kg en 4mg/kg nam dit percentage respectievelijk toe tot 90% en 100% (96)(zie figuur 17). Aan de hand van Fab fragmenten werd geen effect beschreven, wat duidt op de complement gemedieerde mechanismen. We gaan hieronder even meer in detail in op de verschillende ontwikkelingsfasen en vormen.

Aangezien muizen en mensen genetisch gelijkaardig zijn, worden voor genetisch onderzoek gemodificeerde muizen of 'muismodellen' gebruikt. Er bestaan voor muizen genetische tools om bepaalde aspecten van ziekten na te bootsen.



Figuur 17 Kaplan – Meier curve van muizen geïnjecteerd met verschillende concentraties van anti-GD2 14G2a mAb. Verschillende doses: controle (○), anti-GD2 mAb 0.1 mg/kg totale dosis (◊), anti-GD2 mAb 1 mg/kg totale dosis (●), anti-GD2 mAb 2 mg/kg totale dosis (X), anti-GD2 mAb 4 mg/kg totale dosis (*), naar Raffaghello et al. (96).

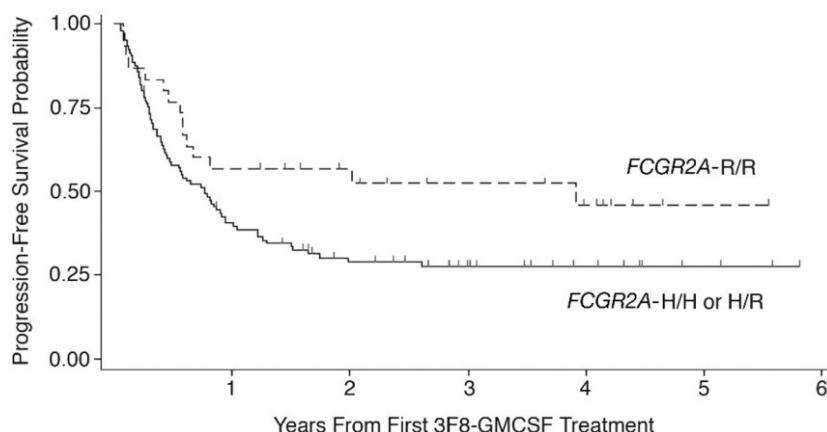
5.1.2.1 Eerste generatie anti-GD2 mAbs

14G2a is een IgG2a murine anti-GD2 monokonaal antilichaam. In twee fase I studies, uitgevoerd door Yu et al. en Murray et al., werd de dosis verhoogd van 25 tot 500 mg / m² / kuur (95) (94). Toxiciteit bij dit murine mAb houdt voornamelijk reversibele pijn, tachycardie, koorts, bloeddrukschommelingen, hyponatriëmie en urticaria in. Door binding van het mAb op perifere zenuwvezels die GD2 tot expressie brengen ontstaat vermoedelijk pijn (97). In deze twee fase I studies werden 19 neuroblastoom-, 3 osteosarcoom- en 11 melanoompatiënten opgenomen. De geobserveerde therapeutische resultaten konden onderverdeeld worden in 1 volledige respons en 2 partiële responsen bij NB patiënten, en 6 ondergeschikte reacties waaronder 3 bij NB patiënten (94) (2). Aangezien ADCC het belangrijkste antitumormechanisme van antilichamen is en IL-2 de lymfocyt-gemedieerde ADCC *in vitro* doet stijgen en de anti-tumoractiviteit van 14G2a *in vivo* eveneens, werd een fase I studie in verband met 14G2a in combinatie met IL2 uitgevoerd. Er werden 31 NB patiënten en 2 osteosarcoompatiënten geïncludeerd, resulterend in 1 volledige respons in osteosarcoom en 1 gedeeltelijk respons bij de neuroblastoompatiënten (98). Cytokines worden gebruikt om ADCC te verhogen, maar gaan gepaard met toxische neveneffecten (87). Bijgevolg is het noodzakelijk te zoeken naar methoden die het cytotoxische effect ten opzichte van de tumor maximaliseren en de toxische neveneffecten minimaliseren. Het hu14.18-IL2 fusie eiwit biedt mogelijkheden op dit vlak (99). Andere mogelijkheden zijn beta-glucanen die de functie van NK cellen verbeteren (100) en fenretinide, een synthetisch derivaat van vitamine A, wat de sensitiviteit van NB versterkt tegenover anti-GD2 antilichamen (101).

3F8 is een murien IgG3-anti-GD2-antilichaam, ontwikkeld in de jaren 1980, met vergelijkbare bijwerkingen en indicaties als 14G2A (102). Een fase II studie toonde aan dat 13 van de 34 stadium 4 neuroblastoompatiënten progressievrij bleven gedurende 40-130 maanden (102). Een follow-up fase II rapport van 3F8 + GM-CSF bij 136 patiënten vertoonde een 5 jaar EFS van 38% voor patiënten zonder voorafgaand recidief (zie figuur 18). Ook werd een beter resultaat waargenomen bij patiënten met het FCGR2A genotype polymorfisme, wat de binding van het IgG3-antilichaam bevordert (93).

Fase I klinische studies bevestigden de activiteit bij recidief neuroblastoom en bevestigden een vergelijkbaar toxiciteitsprofiel als mAb14G2a (103) (95). GM-CSF verhoogt het aantal leukocyten en verbetert ook de anti-GD2 gemedieerde ADCC (104).

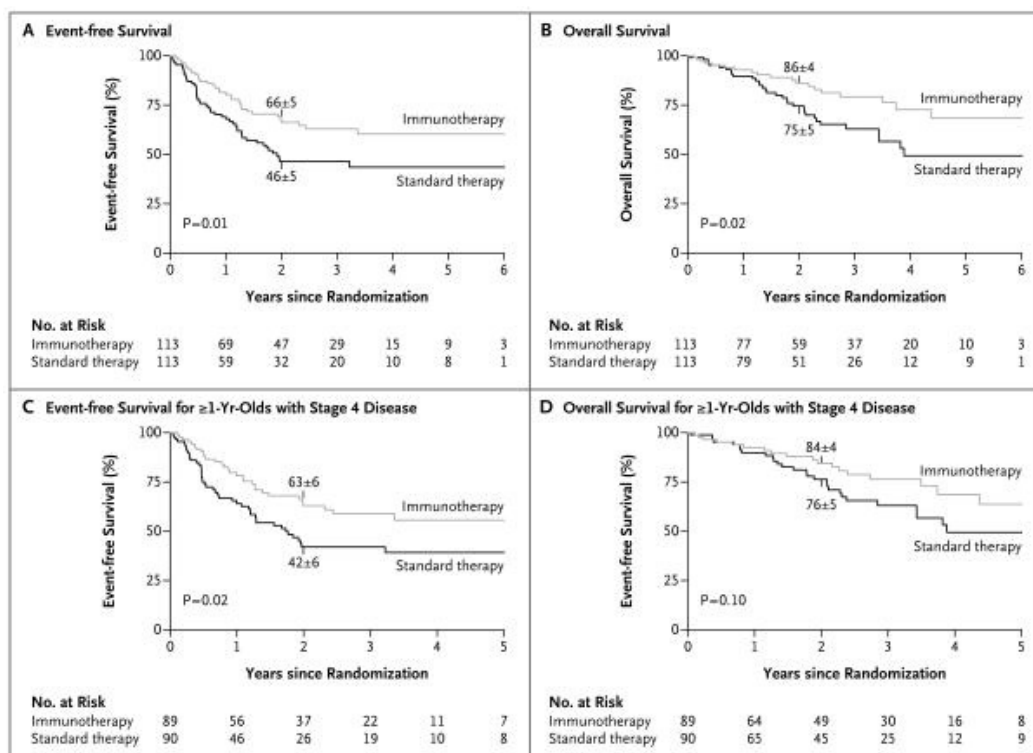
Tijdens de eerste *clinical trials* in verband met 3F8 vertoonden de meeste patiënten *human anti-mouse antibody (HAMA)* respons (105). HAMA respons resulteert in een afgenomen binding met GD2 en aldus een verminderde anti-tumor werkzaamheid (106). Ook in 14.18 en 14.G2a blijkt deze HAMA respons aanwezig in een significant deel van patiënten (98) (107). Er werden chimere anti-GD2 antilichamen ontwikkeld met als doel deze HAMA respons te onderdrukken. Dinutuximab induceert *in vitro* een sterkere ADCC dan 14.G2a in GD2 positieve NB cellen (104).



Figuur 18 Kaplan Meier curve van *progression-free survival* bij 135 hoog-risico NB patiënten rekening houdend met FCGR2A genotype, behandeld met 3F8+ GM-CSF, naar Cheung et al (93).

Een fase II nationale studie bevestigde de werkzaamheid van ch14.18 + GM-CSF in 32 patiënten met recidiverend/refractair neuroblastoom (108). Aangezien de meeste responsen verkregen werden in het beenmerg of het bot, werd vooropgesteld dat deze aanpak het meest effectief zou zijn in de context van MRD. Vervolgens werd de mogelijkheid om ch14.18 in combinatie met GM-CSF, IL2 en isotretinoïne te geven tijdens de vroege post-transplantatieperiode aangetoond in 2 *pilot* fase I onderzoeken (109) (110).

Deze klinische onderzoeken hebben aanleiding gegeven tot de centrale gerandomiseerde COG fase III studie om te bepalen of bij kinderen met een hoog-risico neuroblastoom in eerste respons na myeloablatieve therapie en stamceltransplantatie immunotherapie met ch14.18 in combinatie met GM-CSF, IL2 en isotretinoïne de overleving zou verbeteren in vergelijking met uitsluitend isotretinoïne (NCT00026312) (87). Deze studie vormt de basis voor het toedienen van anti-GD2 therapie bij NB behandelingsschema's (87). Patiënten die in aanmerking kwamen, werden gerandomiseerd na stamceltransplantatie tot 6 cycli isotretinoïne (standaard) of isotretinoïne met 5 geïntercaleerde cycli van ch14.18 gecombineerd met GM-CSF of IL2 in afwisselende cycli (immunotherapie). 113 patiënten werden gerandomiseerd naar immunotherapie en 113 patiënten naar isotretinoïne. De EFS was significant hoger bij de patiënten die immunotherapie kregen, waarbij de 2 jaar EFS geschat wordt op $66\% \pm 5\%$ in tegenstelling tot $46\% \pm 5\%$ ($p = 0.0115$) bij de patiënten die behandeld werden met uitsluitend isotretinoïne. De OS was eveneens significant hoger bij de immunotherapie groep, namelijk $86\% \pm 4\%$ in tegenstelling tot $75\% \pm 5\%$ na 2 jaar (87) (zie figuur 19).



Figuur 19 *Event-free survival (A) en overall survival (B) voor alle 226 patiënten en event-free survival (C) en overall survival (D) voor 179 patiënten met een leeftijd van 1 jaar of ouder bij registratie, naar Yu et al (87).*

Hoewel de resultaten van ch14.18 in combinatie met IL2 en GM-CSF significant beter zijn, gaat deze behandeling gepaard met belangrijke toxiciteit, vooral in de cycli die IL2 bevatten. SIOOPEN voert daarom een onderzoek uit om deze toxiciteit te verbeteren aan de hand van *long-term infusion* (LTI). Lode et al. bestudeerden 97 hoog-risico NB patiënten die behandeld werden met 100 mg/m² ch14.18/CHO per cyclus gedurende 10 dagen (111). Deze LTI behandeling werd geassocieerd aan het verminderd optreden van pijn als bijwerking en een verminderd morfine gebruik (111).

Ch14.18/CHO

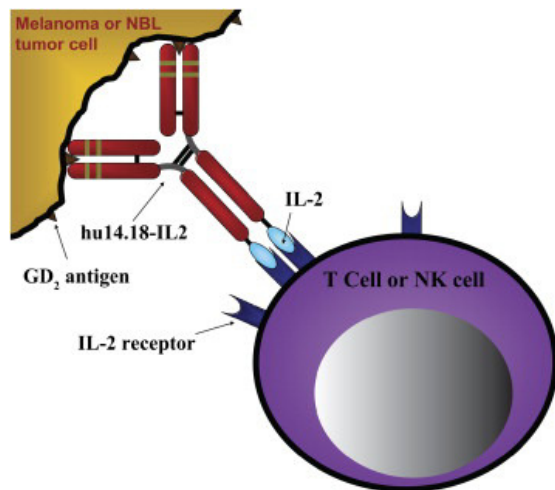
Het reeds beschreven chimeer antilichaam ch14.18 bestaat uit variabele regio's afkomstig van het murien anti-GD2 antilichaam 14G2a en uit constante regio's van het humane IG1 molecule (112) (113). In opdracht van SIOOPEN werd de productie van een ch14.18 antilichaam in ovariële cellen van hamsters gestart (*Chinese hamster ovary*, CHO) aangezien de muriene productie ervan niet mogelijk is in Europa (114).

Zeng et al. concludeerden dat er geen verschil bleek in CDC activiteit tussen ch14.18 SP2/0 (dinutuximab), ch14.18 NS0 (*non secreting myeloma* cellen) en ch14.18/CHO. Ch14.18/CHO wordt ook dinutuximab beta genoemd. Ook werd er geen verschil in bindingscapaciteit en effector functies beschreven. Echter werd bij lage antilichaamconcentraties een gunstigere ADCC activiteit beschreven bij ch14.18/CHO in vergelijking met ch14.18/SP2/0 of ch14.18/NSO. Deze bevindingen in verband met ch14.18/CHO kunnen een belangrijke piste zijn voor het *in vivo* gebruik van ch14.18/CHO bij NB patiënten met metastasen (114).

In een SIOOPEN fase 1 studie werd de veiligheid, farmacokinetiek en biodistributie van ch14.18/CHO in refractaire of recurrenente stadium 4 NB patiënten bestudeerd (115). Ch14.18/CHO vertoont geen verandering in toxiciteit en farmacokinetiek in vergelijking met ch14.18/SP2/0 bij NB patiënten. (115).

5.1.2.2 Tweede generatie

Hu14.18-IL2 is een fusie-eiwit van gehumaniseerd anti-GD2 antilichaam (hu14.18) en IL-2 (zie figuur 20). De *maximum tolerated dose* (MTD) in een fase I onderzoek was 12 mg / m² / d (116). Deze dosis komt overeen met ongeveer 50% van de dosis van ch14.18. De klinische toxiciteit was vergelijkbaar met deze van IL-2 en anti-GD2 mAbs. Anti-tumoractiviteit werd opgemerkt in drie van de 27 neuroblastoom-patiënten, hoewel er geen meetbare volledige of gedeeltelijke respons was (116). Patiënten met *KIR-ligand mismatch* bleken geassocieerd te zijn met een betere klinische respons op immunotherapie met anti-GD2 (81). Momenteel is een grote COG fase II studie bezig met het verdere onderzoek over toevoeging van GM-CSF.



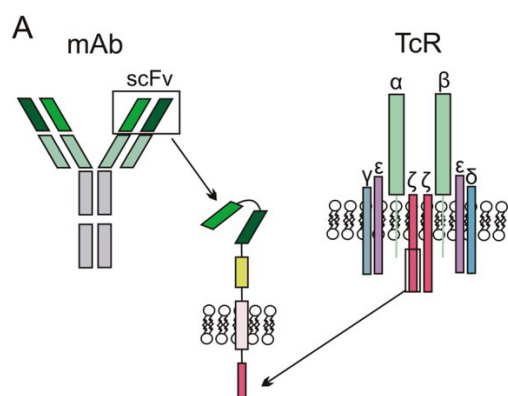
Figuur 20 hu14.18 –IL2 naar Grupp et al (117).

Hu14.18K332A is een gehumaniseerde ch14.18 waarbij een mutatie plaatsvindt van alanine naar lysine 322 waardoor het vermogen afneemt om complement te binden. Hierdoor vermindert de pijn die geassocieerd is met ch14.18, maar blijft de ADCC activiteit behouden. Preklinische studies bij ratten bevestigden dat hu14.18K322 significant minder allodynie opwekt dan ch14.18 (118). Voorlopige bevindingen van een fase I klinische studie omtrent hu14.18K322 toonde aan dat de MTD 70 mg / m² / d × 4 was waarbij verminderde neuropathische pijn optrad (119).

mAb1A7 is een anti-idiotypie antilichaam gericht tegen een muriene anti-GD2, 14G2a. Het verkregen effect bootst dat van GD2-antigeen na. Yu et al hebben een klinische studie van mAb 1A7 uitgevoerd bij 31 patiënten met een hoog-risico neuroblastoom die eerste of daaropvolgende responsen verkregen (120). Er vond geen systemische toxiciteit plaats, maar wel lokale reacties zoals transiënte koorts bij vier patiënten en serumziekte bij één patiënt. Alle patiënten genereerden anti-mAb1A7 en hun immuunsysteem vertoonde CDC- en ADCC activiteit. Het mAb1A7-vaccin heeft weinig toxiciteit, is effectief in het induceren van biologisch actief anti-GD2 en kan nuttig zijn bij het beheersen van MRD (121) (ongepubliceerde gegevens van Yu et al).

Omwille van de lage toxiciteit van mAb1A7 en hu14.18K332A, zou het geschikt zijn om ch14.18 te vervangen door een van voorgaande producten of om Hu14.18-IL2 te vervangen bij de behandeling met ch14.18 met exogeen IL2. Zo zal het zijn belangrijk zijn om te bepalen of mAb1A7-vaccin of het mutante anti-GD2-mAb een vergelijkbare therapeutische werkzaamheid hebben als ch14.18. Het zal eveneens nuttig zijn om de werkzaamheid van anti-GD2 mAbs in combinatie met chemotherapie te bepalen bij neuroblastoom, gezien het associatievoordeel tussen chemotherapie en mAb, zoals rituximab (122) en trastuzumab (123) bij kankertherapie.

Recent, zijn door genetische manipulatie van menselijke T-lymfocyten GD2-gerichte chimere antigeenreceptoren (CAR) tot expressie gebracht door de specificiteit van 14G2a op een T-celreceptor te enten (124) (zie figuur 21). Deze CAR-T-cellen worden gebruikt om tumorregressie te mediëren bij patiënten met neuroblastoom en bieden dus een mogelijke strategie voor GD2-gerichte immunotherapie (125). Er moeten echter nog *trials* opgestart worden. Gezien het succes van CD19 CAR-T cellen bij acute lymfatische leukemie, moet het gebruik van CAR-T cellen bij neuroblastoom ook verder bestudeerd worden (126). Fase I studies bij hervallen of recurrenente NB patiënten vertoonden reeds gunstige resultaten omtrent remissie, tumor regressie en necrose bij sommige patiënten (124) (125).

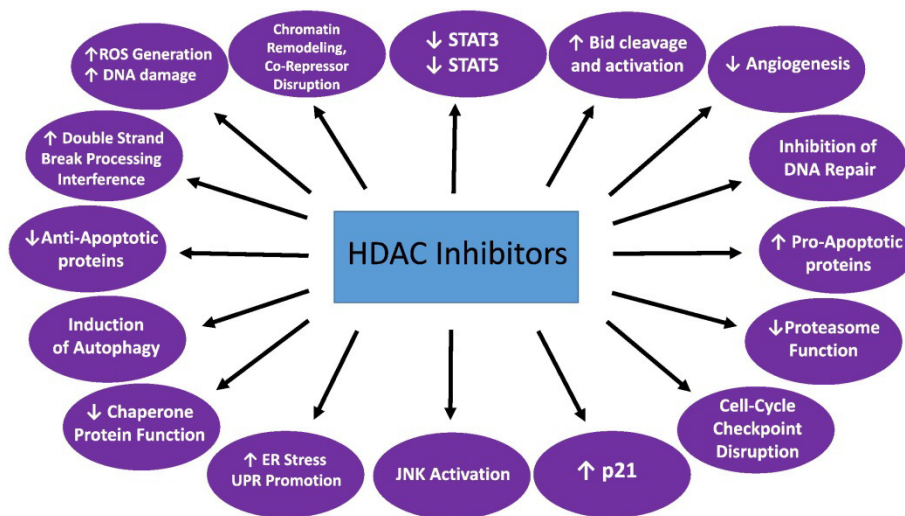


Figuur 21 De structuur van chimere antigeenreceptoren (CAR) bestaat uit 2 delen. Het extracellulaire single chain variable fragment (scFv) is afkomstig van de variabele regio van een mAb. Het intracellulaire deel is afkomstig van de CD3- ζ keten van de T cel receptor en zorgt voor het activatie signaal, naar Titov et al (127).

5.1.3 Toekomstige ontwikkelingen

In de toekomst zal het mogelijk zijn om te voorspellen welke patiënten het meeste baat zullen hebben bij deze therapie en dit op basis van ziektepatroon en hun immunogenotype. Gezien de beperkingen van immunotherapie, bijvoorbeeld bij *bulky disease*, zijn er andere immunologische toepassingen ontwikkeld. Zo werden anti-idiotypen antilichamen, immuunstimulerende antilichamen zoals ipilimumab (anti-CTLA4) en infusies van dendritische cellen of NK cellen ontwikkeld (128) (129) (130) (131). Ook werden autologe T-cellen ontwikkeld die anti-tumoractiviteit bezitten (125). Een andere mogelijkheid is het gebruik van allogene hematopoietische stamceltransplantatie (HSCT) aan de hand van een graft-versus-tumor effect. Een recente publicatie van *Center for International Blood and Bone Marrow Transplant Research* stelt zeldzame gevallen vast van genezingen na allogene HSCT bij chemotherapie resistente patiënten (5 jaar EFS 3%, OS 6%) (132). Resultaten waren significant beter voor patiënten die reeds gereageerd hadden op de aanvankelijke behandeling.

Een andere mogelijkheid om de doeltreffendheid van NB behandeling te verbeteren is door anti-GD2 mAb immunotherapie met nog andere *tumor-targeted* therapie te combineren. Het doel van deze gecombineerde therapie is het induceren en versterken van anti-tumor immuniteit en het tegengaan van de door tumor veroorzaakte immuunsuppressie. Een recent ontwikkelde *tumor-targeted* therapie maakt gebruik van histone deacetylase inhibitoren (HDACi) als epigenetische modulatoren om tumorcellen te elimineren (133). De werking van HDACi zorgt voor een verhoogde acetylatie van histonen, wat resulteert in veranderingen in genexpressie (134) (zie figuur 22). HDACi hebben zowel invloed op normale cellen als op tumorcellen, hoewel tumorcellen gevoeliger zijn hiervoor (135). In de tumorcellen leidt deze veranderde genexpressie tot activatie van intrinsieke en extrinsieke apoptose (136). Bovendien induceert HDACi hyperacetylatie van pro-apoptotische eiwitten zoals bijvoorbeeld p53 (137). De klassieke HDACi blokkeren de functie van een of meerdere van de 11 klassieke HDAC-enzymen. Deze enzymen kunnen onderverdeeld worden in een klasse 1 en klasse 2. PanHDACi hebben een invloed op beide klassen. Momenteel bevinden verscheidene panHDACi zich in fase 1-3 *trials* voor kankerbehandeling (138).



Figuur 22 Werkingsmechanisme HDAC inhibitoren, naar Bose et al (139).

Er werd een transplanteerbaar autoloog NB model ontwikkeld dat afgeleid is van een transgene TH-MYCN muismodel. In NB is het *MYCN* proto-oncogen vaak geamplificeerd, wat gepaard gaat met een ongunstige prognose (140) (141). Dit muismodel is sterk gelijkend op humaan hoog-risico NB door de overexpressie van *N-MYC* (142) (143). Ook de expressie van het GD2 antigeen komt voor in dit muismodel (144). Anti-GD2 mAb en het HDACi Vorinostat hebben een synergistische werking als anti-tumor effect in dit autologe muismodel. TH-MYCN transgene NB cellen zijn zeer gevoelig voor celdood, gemedieerd door HDACi. MYCN transgene NB cellen zijn gevoelig voor panHDACi en klasse 1 HDACi. Deze gevoeligheid ontstaat door interacties van N-MYC met verschillende klasse 1 histone deacetylasen (HDACs) (145) (146). Vorinostat resulteert eveneens in upregulatie van het GD2 antigeen in overlevende NB cellen zodat een verhoogde anti-GD2 mAb gemedieerde celdood kan plaatsvinden. Op welke manier deze GD2 expressie door Vorinostat wordt beïnvloed is nog niet duidelijk. Ten slotte verandert Vorinostat de functie van myeloïde cellen in NB tumoren, resulterend in myeloïde cellen die minder immuunonderdrukkende genen tot expressie brengen en meer actieve FcR (147).

De combinatie van anti-GD2 mAb therapie en retinoïnezuur (een vitamine A metaboliet dat NB differentiatie induceert) verkrijgt geen groot klinisch effect bij de behandeling van NB patiënten (92). Anti-GD2 mAb gecombineerd met IL-2, GM-CSF en retinoïnezuur resulteert in een 20% verbeterde 5 jaars-overleving. De combinatie van anti-GD2 mAb en Vorinostat hebben een doeltreffendheid aangetoond bij NB muizen aan de hand van NB differentiatie en apoptose (148). Zoals eerder meegegeven werd bij combinatie van IL-2 en GM-CSF graad 3 en 4 capillaire-lek-syndroom waargenomen bij 10% tot 20% van de behandelde patiënten. Op basis van deze informatie kan het belangrijk zijn om therapiemogelijkheden op basis van Vorinostat en anti-GD2 mAb in afwezigheid van systemische cytokines te onderzoeken (87) (149).

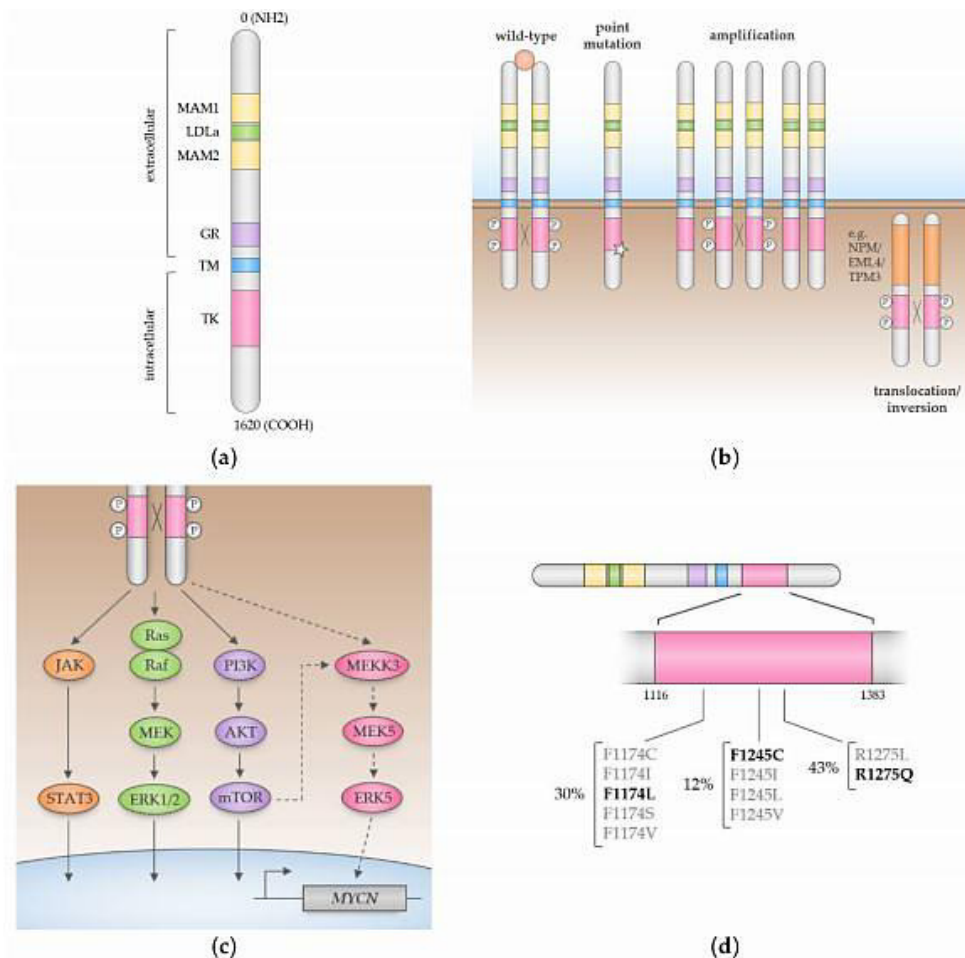
Verder onderzoek naar het optimale tijdstip van HDACi behandeling tijdens de immunotherapie dient ondernomen te worden, aangezien deze de doeltreffendheid *in vivo* bepaalt (150).

5.2 ALK-inhibitoren

5.2.1 Algemeen

In 1994 werd het *Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)* gen beschreven in de context van kanker, meer bepaald als een partner in de fusie tussen nucleofosmine (*NPM*) en ALK in het *anaplastic large cell lymphoma (ALCL)*, een type non Hodgkin lymfoom (151). Het humane *ALK* gen is gelegen op chromosoom 2 (2p23). ALK expressie wordt uitsluitend waargenomen in het zenuwstelsel, hoofdzakelijk in de hersenen van neonaten, met een daling van de expressie na de geboorte (152).

Er werden in 2008 activerende mutaties in het *ALK* gen beschreven in de familiale en sporadische vormen van NB door Mossè et al. (153) (zie figuur 23 a,b en c). Deze mutaties werden meer bepaald in het tyrosine kinase domein van ALK aangetroffen. Dit leidt tot constitutieve activatie van het ALK kinase domein (154). In 85 % van de *ALK* mutaties in NB komen deze mutaties voor op 1 van volgende 3 *hotspots*, namelijk R1275, F1174, en F1245 (155). Volgens de studie van Mossè et al. is de meest frequent voorkomende mutatie R1275Q en komt deze voor in 45% van de familiale gevallen van NB en in een derde van de sporadische gevallen van NB (156). Mutaties in F1174 en F1245 komen uitsluitend voor in de sporadische vorm van NB en dit met frequenties van 30% en 12% respectievelijk (155) (28) (zie figuur 23d). De F1174L mutatie komt voornamelijk voor in *MYCN* geamplificeerde tumoren en versterkt de oncogene activiteit van *MYCN* in NB (157).



Figuur 23 a: Domein structuur van ALK, b: aberrante vormen van ALK in kanker worden veroorzaakt door puntmutaties in het kinase domein, door gen amplificatie of door genfusie, c: signaaltransductiewegen van ALK, d: frequenties van F1174, F1245, en R1275 mutaties in NB, naar Trigg et al (158).

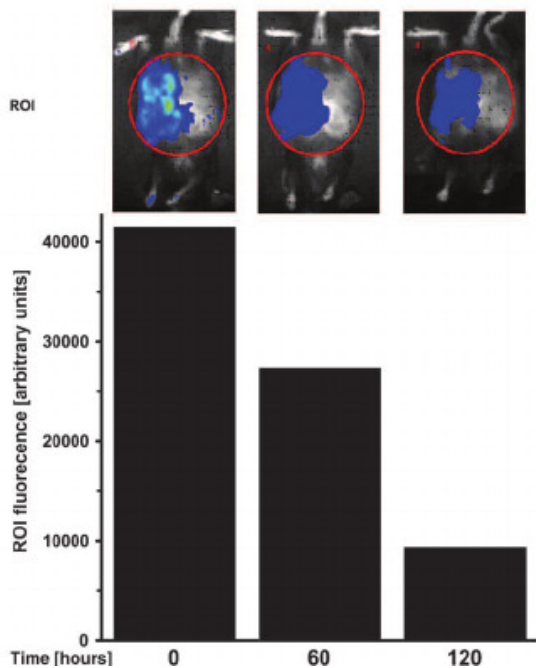
ALK afwijkingen komen voor 14 % voor in de hoog-risico groep, voor 6 % in de intermediair-risico groep en voor 8% in de laag-risico groep (155) (26) (24). Bresler et al. bestudeerden in 2014 1596 NB patiënten en concludeerden dat ALK mutaties geassocieerd zijn aan een verminderde EFS in hoog-risico en intermediair-risico. Echter in de laag-risico groep werden deze bevindingen niet weerhouden (155).

In 2-3 % van de NB gevallen komt *ALK* gen amplificatie voor, wat aanleiding geeft tot een constitutieve kinase activiteit (159). In deze situatie wordt bijna altijd ook een amplificatie van *MYCN* waargenomen, aangezien deze genen dichtbij elkaar liggen. Het *ALK* gen en het *MYCN* gen hebben een predispositielocus op chromosoombanden 2p23-2p24 (153).

Zoals reeds vermeld in de introductie, maakt de familiale vorm van NB 1-2 % uit van alle neuroblastomen. De overerving gebeurt op een autosomaal dominante manier. In ongeveer de helft van deze familiale vormen worden puntmutaties aangetroffen in het tyrosine kinase domein van ALK (153) (21).

5.2.2 Ontwikkelingsfasen

Om *small-molecule* ALK inhibitoren te identificeren, werd er gezocht naar celonderdelen die cytotoxisch zijn voor Ba/F3 NPM-ALK, maar niet cytotoxisch zijn voor niet-getransformeerde parentale Ba/F3 cellen (160). Dit resulteerde in de identificatie van TAE684. Behandeling van ALK gedreven NB tumoren bij transgene muizen met de ALK inhibitor TAE-684 induceerden tumor regressie en significante inhibitie van tumor groei (161) (zie figuur 24). Aan de hand van deze bevindingen werd ALK vooropgesteld als een interessante *tumor-targeted* therapie. Ook omwille van de beperkte verspreiding van ALK in normaal weefsel en een hoge expressie in NB, is ALK een ideaal doel voor deze vorm van therapie (162). De doeltreffendheid van ALK inhibitoren werd eerst nagegaan aan de hand van TAE684 in 602 kankercellijnen. Het werd reeds voordien aangetoond dat TAE684 het NPM-ALK fusieproteïne in ALCL inhibeert (163)(160). TAE 684 onderdrukt celgroei in cellen die ofwel ALK fusiegenen ofwel ALK puntmutaties bevatten (163). Tumoren met een R1275Q mutatie zijn sensitief voor crizotinib en TAE684, terwijl tumoren met een F1174L mutatie enkel gevoelig zijn voor deze producten in een hogere dosis (26) (155). In voorgaande studies werd ook een relatieve resistentie beschreven van ALK F1174L tegenover crizotinib (26) (155). Gezien de hoge frequentie van voorkomen van F1174L in primair NB, werd er naar mogelijke oplossingen gezocht om deze resistentie te minimaliseren zoals inhibitoren van de signaaltransductiewegen van ALK zoals mTOR en ERK5 of antilichamen tegen ALK (164) (165) (166) (167).



Figuur 24 In vivo bioluminescente beeldvorming van een tumor bij een muis, voor de behandeling, 60 uur na behandeling en 120 uur na behandeling met TAE-684(10 mg/kg, 2 maal per dag). ROI betekent *region of interest (ROI ; relative units)*. Deze beeldvorming vertoont een viervoudige daling in luciferase activiteit bij de behandeling van TAE-684, naar Heukamp et al (161).

5.2.2.1 Eerste generatie ALK inhibitoren

5.2.2.1.1 NSCLC

Bij EML4-ALK positieve NSCLC bevestigden twee fase III studies de superioriteit van crizotinib ten opzichte van standaard chemotherapie (168) (169). Gezien de gunstige resultaten van deze studies werd het product goedgekeurd door de FDA in 2011. Ondanks de initiële waargenomen responsen, vertoonde de meerderheid van de patiënten resistentie alsook ziekteprogressie, meestal reeds in de eerstvolgende 12 maanden (170)(171). De meest frequente plaats van ziekteprogressie is het centrale zenuwstelsel (172).

5.2.2.1.2 ALCL en NB

Crizotinib was de eerste ALK inhibitor die klinische studies onderging (zie figuur 25). Op basis van de gegevens van Mossë et al. (153) dat *ALK* een frequent voorkomende mutatie is in NB, werd de ADVL0912 fase I/II klinische studie omtrent crizotinib uitgevoerd door COG bij pediatrische patiënten met hervallen of refractaire solide tumoren of ALCL (173) (zie tabel 1). Deze studie werd ontworpen om de optimale dosis van crizotinib te bepalen. De waargenomen toxiciteit bleef beperkt en 7 ALCL patiënten verkregen een volledige respons. Echter, de resultaten omtrent NB patiënten stelden teleur; van de 11 NB patiënten (met *ALK* mutaties) verkreeg slechts 1 patiënt een volledige respons en 2 patiënten stabiele ziekte (173).

Verder werd in 2013 een fase I COG *trial* gestart waarbij de combinatie van chemotherapie en crizotinib bij hoog-risico NB en ALCL veelbelovende resultaten vertoonde (NCT01606878) (zie tabel 1). Op basis van deze resultaten werd vervolgens een COG fase III *trial* (NCT03126916) gestart om de toevoeging van crizotinib aan standaardtherapie na te gaan bij ALK+ hoog-risico NB (zie tabel 1).

Krytska et al. rapporteerden een synergetische cytotoxiciteit, sterkere apoptose en verbeterde EFS bij gebruik van de combinatie van crizotinib en chemotherapie (cyclofosfamide en topotecan) in muriene NB xenograften, die *ALK* mutaties bezitten (167).

5.2.2.2 Tweede generatie ALK inhibitoren

Enkele patiënten hadden tijdens crizotinib behandeling F1174L mutaties in het ALK kinase domein verworven, met als gevolg een secundaire resistentie ten opzichte van crizotinib (174). Gezien deze bevindingen, werden tweede generatie ALK inhibitoren ontwikkeld om deze resistentie te overwinnen.

Binnen de categorie van deze tweede generatie ALK inhibitoren, werd enkel ceritinib (Friboulet et al., 2014) reeds getest in klinische studies bij pediatrische patiënten (175). Ceritinib (LDK378) is een ATP competitieve tyrosine inhibitor van ALK en IGF-1 (172) (zie figuur 25). Ceritinib is een structurele derivaat van TAE684 en is gedeeltelijk actief tegenover de F1174L mutant (175). Er werd een antitumor activiteit door ceritinib beschreven bij crizotinib sensitieve en crizotinib resistente ALK positieve NSCLC in preklinische studies (175). In een fase I studie werd ceritinib als monotherapie bij hervallen of refractaire ALK positieve pediatrische kankers zoals NB bestudeerd (176) (zie tabel 1). Er werden reeds combinaties bestudeerd om de doeltreffendheid van ceritinib te verhogen en de resistentie tegenover de F1174L mutant te overwinnen. In 2014 werd ceritinib door de *Food and Drug Administration* (FDA) goedgekeurd voor de behandeling van ALK positieve NSCLC patiënten die hervallen na eerste lijntherapie (177). Deze goedkeuring is gebaseerd op de fase I studie van Kim et al. waarin 163 ALK positieve NSCLC patiënten ceritinib ontvingen (178).

In 2016 startte Next Generation Personalized Neuroblastoma Therapy (NEPENTHE) een klinische studie om hervallen of refractaire NB patiënten op basis van genetische wijzigingen, bepaald aan de hand van sequencing, een gepaste therapie toe te dienen (NCT02780128). Patiënten met *ALK* mutaties werden zo behandeld met de combinatie van ceritinib en ribociclib. In een studie, uitgevoerd door Wood et al. werd beschreven dat de combinatie van ceritinib en ribociclib (een CDK4,6 inhibitor) een hogere cytotoxiciteit teweeg bracht in NB cellen waarin *ALK* mutaties voorkomen in vergelijking met cellen die geen *ALK* mutaties

vertonen (179). De resistentie, waarvan hierboven sprake is, is geassocieerd met AXL activatie, een receptor tyrosine kinase dat mede verantwoordelijk is voor het metastatische potentieel van NB (180) (181). Er werd aangetoond dat *small-molecule* AXL inhibitoren de activiteit van ALK inhibitoren tegenover F1774L verhoogt (181).

Ook de combinatie van ceritinib en een MDM2 inhibitor werkten synergetisch in het afremmen van proliferatie in *in vitro* TP53 wild-type NB cellen met *ALK* amplificatie of mutatie (182).

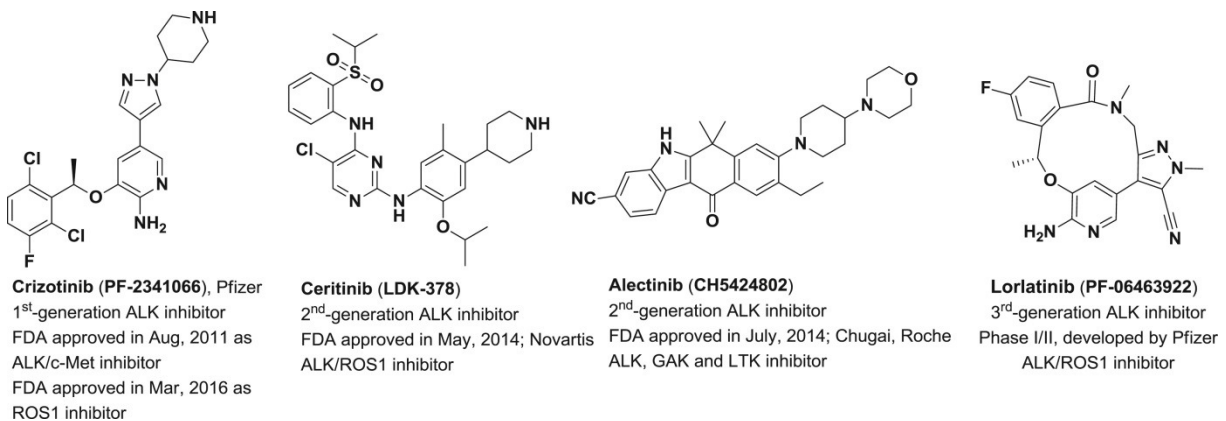
Andere tweede generatie ALK inhibitoren werden ook ontwikkeld, met name alectinib (Ignatius Ou et al., 2014) en brigatinib (Huang et al., 2016) (183) (184). Alectinib (CH5424802) (zie figuur 25) en brigatinib (AP26113) vertonen beiden doeltreffendheid in de ALK F1174L-mutant NB cellen en kunnen op die manier de novo resistentie ten opzichte van crizotinib overwinnen (185) (186) (187). In 2017 verkreeg brigatinib een versnelde goedkeuring van het FDA voor de therapie van ALK positieve NSCLC patiënten met metastasen. Een fase III onderzoek vergelijkt de doeltreffendheid en veiligheid tussen brigatinib en crizotinib bij ALK positieve NSCLC patiënten met metastasen (NCT02737501).

Twee nog steeds voortgaande fase II studies toonden de effectiviteit aan van alectinib en beschreven de tolerantie bij ALK positieve NSCLC patiënten, refractair aan crizotinib (NCT01871805) (NCT01801111). Peters et al. voerden een gerandomiseerde fase III studie uit waaruit bleek dat alectinib meer doeltreffend en minder toxisch is als de primaire behandeling van ALK positieve NSCLC patiënten (188). Preklinische studies beschreven de *in vitro* en *in vivo* inhibitie van ALK positieve NB celgroei door alectinib (27).

5.2.2.3 Derde generatie ALK inhibitoren

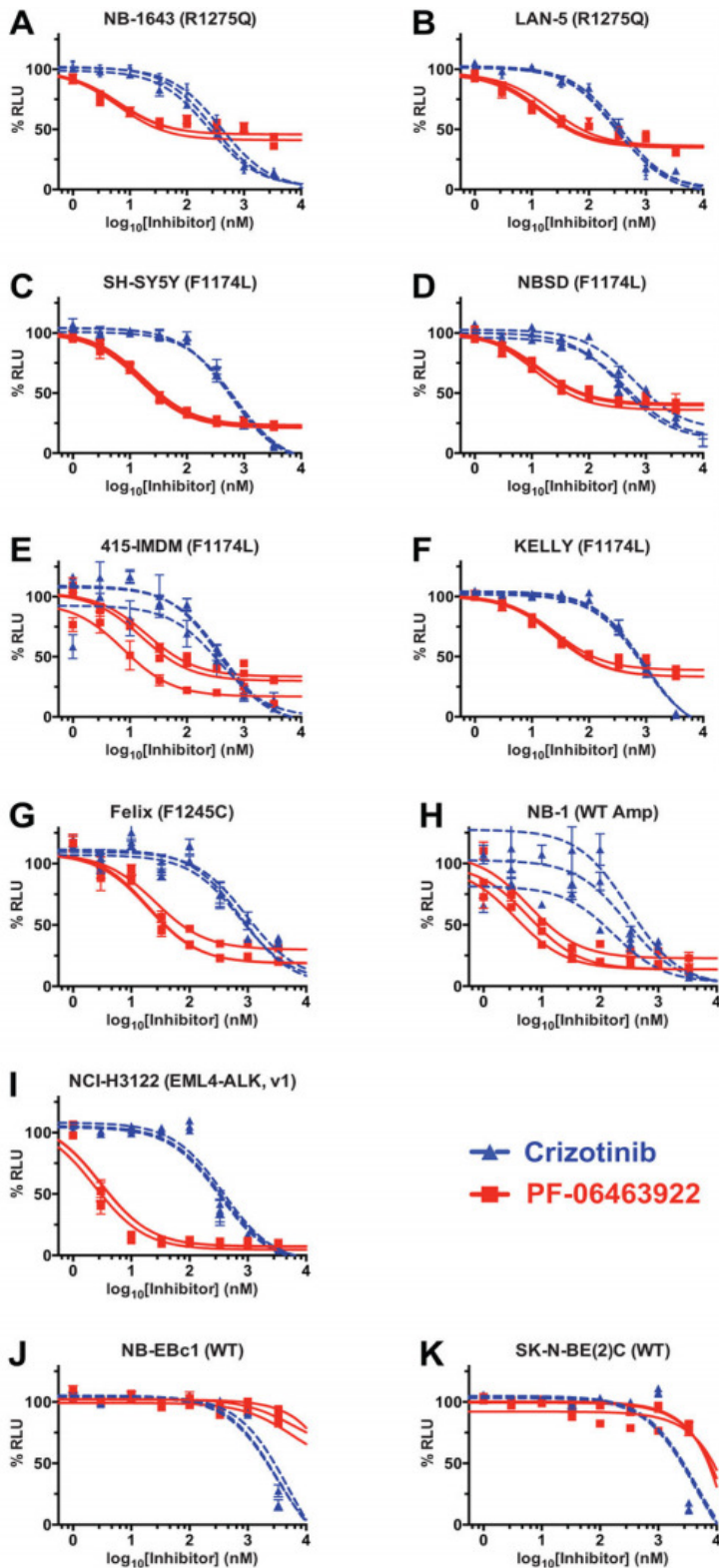
Een derde generatie ALK inhibitor Lorlatinib (PF-06463922) is een ATP competitieve *small molecule* inhibitor van ALK en ROS1 (189) (zie figuur 25). Een lage concentratie van lorlatinib leidde reeds tot apoptose van NSCLC cellen (190). Het zorgt eveneens voor een krachtigere inhibitie van ALK in vergelijking met crizotinib bij F1174L, F1245C en R1275Q NB mutaties *in vitro* (191) (zie figuur 26). Eveneens bleek lorlatinib een snelle en volledige regressie van de NB cellijn te induceren na de eerste 6 weken van de behandeling (191). Lorlatinib vertoonde een significante tumorregressie in crizotinib-resistente en crizotinib-sensitieve NB muis xenograften (191). Deze studie toonde aan dat lorlatinib het potentieel heeft om resistentie ten opzichte van crizotinib te overwinnen (191). Recent startte New Approaches to Neuroblastoma Therapy (NANT) een fase I *trial* omtrent lorlatinib in combinatie met chemotherapie bij hoog-risico NB patiënten (NCT03107988) (zie tabel 1).

Ensartinib (X-396) is een nieuw aminopyridazine gebaseerd *small molecule* ALK inhibitor, met een 10 keer zo krachtige inhibitie van de celgroei in ALK positieve NSCLC in vergelijking met crizotinib (192). Horn et al. voerden een fase I/II studie uit bij ALK positieve NSCLC met als doel de veiligheid en de aanbevolen dosis te bepalen van ensartinib (193). In de grote fase II studie van de National Cancer Institute (NCI)-COG Pediatric Molecular Analysis for Therapy Choice wordt ensartinib bij onder andere hervallen of refractaire NB patiënten onderzocht (NCT03213652) (194) (zie tabel 1). Gegevens omtrent de distributie van ensartinib in hersenweefsel suggereren eveneens dat ensartinib misschien ook activiteit tegenover hersenmetastasen bezit (193).



Figuur 25 Chemische structuren van ALK inhibitoren, naar Basit et al. (195).

Entrectinib (NCT02097810) is een Trk, ALK en Ros tyrosine kinase inhibitor (196). Er werden reeds gunstige cytotoxische effecten *in vitro* beschreven, in het bijzonder bij NB cellen met geamplificeerd *ALK* (197). Indien gecombineerd met chloroquine verbeterde de activiteit van entrectinib tegenover ALK positieve NB cellen (197).



Figuur 26 Lorlatinib (PF-06463922) inhibeert de viabiliteit van NB cellen. De figuur toont de dosis- respons curven aan voor crizotinib (blauwe curve) en lorlatinib (rode curve). De celviabiliteit wordt weergegeven voor R1275Q- ALK mutatie (A,B), F1174L-ALK mutatie (C-F), F1245C- ALK-mutatie (G), en geamplificeerd wild-type ALK (H), cellen met ALK translocatie (I) en twee ALK onafhankelijke cellijnen (J, K), naar Infarinato et al. (191).

Trial Identifier	Sponsor	Phase	Disease Eligibility	Study Drug(s)	Start Date
NCT00939770	COG	I/II	r/r solid tumours and ALCL	crizotinib	September 2009
NCT01121588	Pfizer	I	all ALK-positive tumours except NSCLC; ≥15 years	crizotinib	March 2011
NCT01606878	COG	I	r/r solid tumours and ALCL	crizotinib + chemotherapy	March 2013
NCT01742286	Novartis	I	all r/r ALK-positive tumours	ceritinib	August 2013
NCT02650401	Ignyta	I/Ib	r/r solid tumours	entrectinib	December 2015
NCT02780128	Y.P. Mossé	I	r/r NB	ceritinib + ribociclib	July 2016
NCT03213652	NCI	II	r/r ALK/ROS1-positive solid tumours, NHL, histiocytic disorders	ensartinib	July 2017
NCT03107988	NANT Consortium	I	high-risk NB	lorlatinib +/- chemotherapy	September 2017
NCT03126916	COG	III	high-risk NB and ganglioneuroblastoma	crizotinib + standard therapy	December 2017

ALCL: anaplastic large cell lymphoma; COG: Children's Oncology Group; NANT: New Approaches to Neuroblastoma Therapy; NB: neuroblastoma; NCI: National Cancer Institute; NHL: non-Hodgkin's lymphoma; r/r: relapsed or refractory.

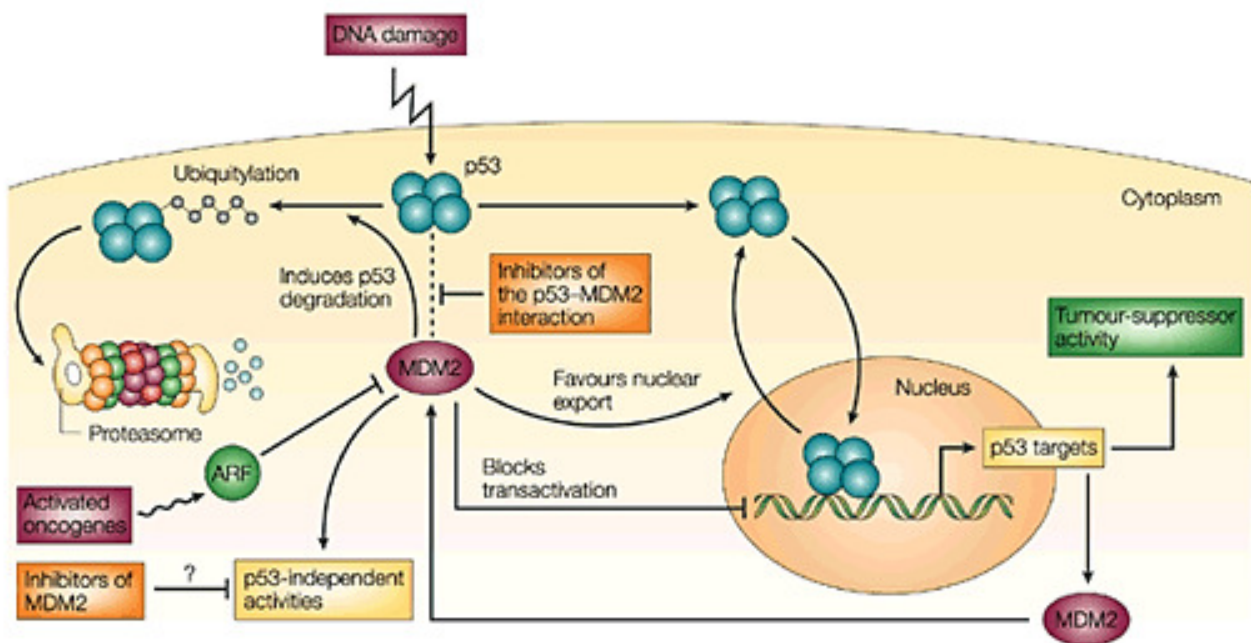
Tabel 1 Studies omtrent ALK inhibitoren bij verscheidene tumoren, onder andere NB, naar Trigg et al. (158).

5.3 MDM2 – inhibitoren

5.3.1 Algemeen

P53 is een reeds gekend tumorsuppressorgen en speelt een fundamentele rol bij de verdediging tegen maligne transformatie van de cellen door de inductie van apoptose. In het geval van cellulaire stress of extreme DNA schade activeert *p53* signaalwegen die leiden tot celdood (198). In het algemeen komt in ongeveer 50 % van de menselijke tumoren een *p53* gen deletie of mutatie voor (199). De mutaties in *P53* zijn hoofzakelijk *missense* mutaties waarbij een nucleotide wordt vervangen door een ander nucleotide (200). In de overige 50 % van de menselijke tumoren wordt de *p53* activiteit onderdrukt door invloed uit te oefenen op de normale functie van *p53*. Zo wordt *p53* op een indirecte wijze inactief gemaakt door MDM2 amplificatie (201). Deze *p53* afhankelijke apoptose wordt gestimuleerd door *MYCN* gen deregulatie. *MYCN* reguleert immers de expressie van MDM2, wat op zijn beurt *p53* remt (202). Niettemin worden er slechts in 2 % van de neuroblastoom gevallen, mutaties in *p53* waargenomen (203). In NB bevatten dus meer dan 98% van de nieuwe diagnoses een intact, wild-type *p53* gen met een functionele activiteit (204). Gezien de meerderheid van *de novo* NB wild-type *p53* bevatten, werd de hypothese naar voren geschoven dat MDM2 gereguleerde inhibtie van *p53* een belangrijke rol zou kunnen spelen in preventie van apoptose bij NB en dus ook bijdraagt aan ziekteprogressie.

De negatieve regulator van p53 is het *mouse double minute 2 homolog* (MDM2), een E3 ubiquitine ligase verantwoordelijk voor de ubiquinatie van p53. P53 activeert ook de expressie van zijn eigen negatieve regulator aan de hand van een negatieve feedbacklus (205) (zie figuur 27). Het p53 activeert de *MDM2* transcriptie en het zorgt voor een gedaalde p53 functie bij het einde van de stressreactie (206). MDM2 bindt en inactieveert p53 en komt tot overexpressie in NB en andere tumoren (207). Deze overexpressie van MDM2 leidt dus tot tumorigenese, zoals aangetoond in muismodellen en in tumoren (208) (209). MDM2 kan p53 activiteit op verschillende manieren afremmen: door binding op het *transactivation domain*, door ubiquinatie, door inhibitie van acetylatie en door nucleaire export naar het cytoplasma van p53 (198) (zie figuur 27). MDM2 wordt op zijn beurt geremd door het p14 ARF eiwit, een tumorsuppressor. Dit eiwit bindt MDM2, voorkomt de MDM2 gereguleerde ubiquinatie van p53 en blokkeert de export van p53 en MDM2 uit de nucleus (210).



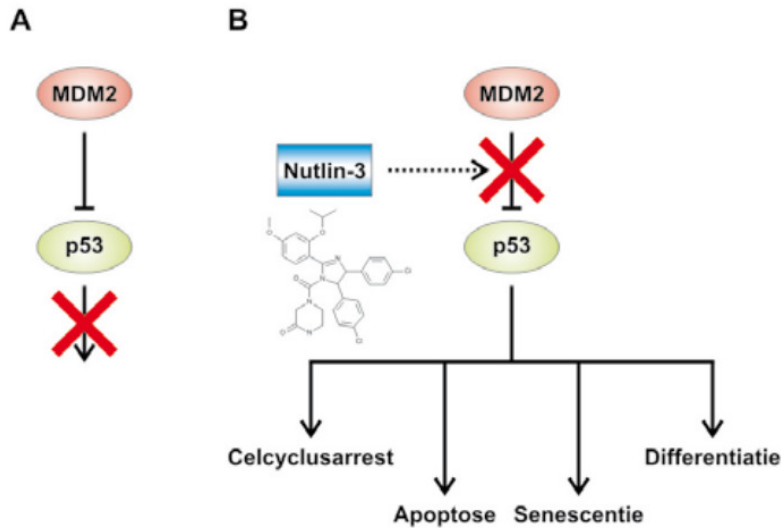
Nature Reviews | Cancer

Figuur 27 de autoregulatorische feedbacklus van p53 en MDM2. p53 stimuleert de MDM2 expressie, MDM2 inhibeert de p53 activiteit aangezien het de transcriptie blokkeert, de nucleaire export stimuleert en de degradatie van p53 stimuleert, naar Chène et al. (211).

5.3.2 Ontwikkeling van Nutlins

Inhibitie van de p53-MDM2 interactie lijkt omwille van verschillende redenen een goed therapeutisch doelwit. Ten eerste wordt in slechts 2 % van de NB patiënten mutaties in p53 waargenomen en zou de inhibitie van MDM2 leiden tot accumulatie van niet-functioneel en gevaarlijk p53 (203). Ten tweede is de expressie en activiteit van MDM2 in NB vaak gedereguleerd (212) (213). Ten derde resulteert de inhibitie van de expressie of werking van MDM2 in accumulatie van functioneel p53 in de kern (214). *Small molecule* MDM2 antagonisten, genaamd nutlins, werden door Vassilev et al. ontwikkeld in 2004 (215). Nutlins zijn cis-imidazoline derivaten die de interactie tussen P53 en MDM2 verbreken (215). Nutlins binden op de bindingsplaats van MDM2 voor P53 met als gevolg dat kankercellen geblokkeerd worden in de G1 fase en G2 fase van de celdelingscyclus en ook apoptose ondergaan bij blootstelling aan een lage concentratie van nutlins (215). Nutlin-3 is de best bestudeerde MDM2 inhibitor en vertoont goede resultaten bij verschillende wild-type p53 tumoren (216).

In 2006 voerden Van Maerken et al. een studie uit waarbij men in 9 neuroblastoomcellijnen de effecten van nutlin-3 bestudeerde (217) (zei figuur 28). Er werd een activatie van de p53 signaalweg, een G1 celcyclusarrest en apoptose waargenomen (217). Verder werd door Van Maerken et al. in 2009 nutlin-3 in een proefdiermodel van NB getest (216). Nutlin-3 werd hierbij onderzocht in een muismodel van chemoresistent NB, aangezien de meeste gevallen van falende therapie en mortaliteit gelinkt zijn aan NB cellen die resistent geworden zijn aan chemotherapie. Nutlin-3 werd in dit geval 3 weken oraal toegediend in een dosis van 200 mg/kg en dit twee maal per dag. Ook hier werden dezelfde resultaten waargenomen als reeds vermeld hierboven. Er werd een vermindering in tumorgroei en metastasering waargenomen bij muizen met chemoresistente neuroblastoomxenograften die wild-type p53 bevatten. In tegendeel tot de wild-type p53 NBcellen werden bij chemoresistente muizen met p53 mutante NB cellen geen effecten beschreven (216).

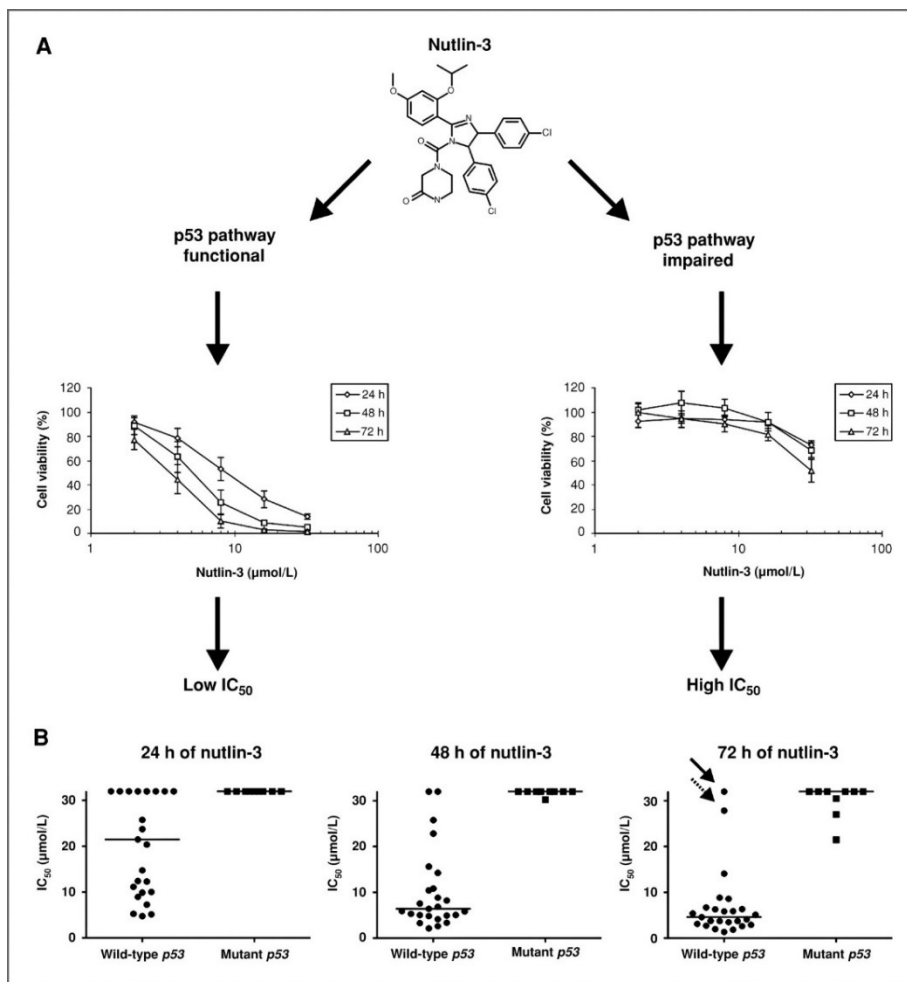


Figuur 28 Inhibitie van de p53–MDM2 interactie door nutlin-3.

A) In onbehandelde neuroblastoomcellen wordt het p53 eiwit geïnactiveerd door verhoogde activiteit van MDM2.

B) Reactivatie van p53 door nutlin-3 doordat de interactie tussen p53 en MDM2 verbroken wordt. Hierdoor kan p53 diverse antitumorale effecten uitlokken, naar van Maerken et al. (218).

In de meest recente studie door van Maerken et al. werd nutlin-3 gebruikt om de functionaliteit van de p53 signaaltransductieweg na te gaan (219). In totaal werden er 34 NB cellijnen (25 wild-type p53 NBcellijnen en 9 p53-mutante NBcellijnen) in dit onderzoek geïncorporeerd. De mediane IC_{50} waarde (dat is de concentratie van nutlin-3 waarbij 50 % van de tumorgroei inhibitie reeds behaald werd), was voor de 25 wild-type P53 NBcellijnen $4.6 \mu\text{M}$ en voor de 9 p53-mutante NBcellijnen was dit $>32 \mu\text{M}$. Deze IC_{50} waarde werd na 72 uur van de nutlin-3 therapie nagegaan. In 23 van de 25 wild-type p53 NBcellijnen werd een reductie in celviabiliteit waargenomen. In deze 23 gevallen werden dus cytotoxische effecten beschreven (zie figuur 29). De verschillende determinanten die de gevoeligheid of respons voor nutlin-3 therapie bepalen, werden eveneens onderzocht. De gevoeligheid voor nutlin-3 therapie werd niet voorspeld door een MDM2 amplificatie of door een MYCN amplificatie. Een deletie in het $p16^{INK4a} / p14^{ARF}$ gen was echter wel geassocieerd met een gedaalde gevoeligheid voor nutlin-3. In deze studie werd ook het p14ARF eiwit als een bepalende factor voor het antwoord op deze inhibitie van MDM2 (219).



Figuur 29 A, interactie tussen p53 signaalweg en de IC₅₀waarden na behandeling met nutlin-3.

B, IC₅₀waarden na behandeling met nutlin-3 in 34 NB cellijnen, naar Van Maerken et al. (219).

Volgens Tovar et al. toonden nutlins goede antitumorale activiteit, maar waren hun farmacologische eigenschappen onvoldoende (220). Vervolgens werd RG7112 (RO5045337, Roche/Genentech), een cis-imidazoline derivaat, gelijkaardig aan nutlin-3a ontwikkeld (221). RG7112 is minder gevoelig aan oxidatie, heeft een lager moleculair gewicht en vertoont een sterkere binding aan MDM2. Enkele fase I *trials* bepaalden de MTD en bijwerkingen van deze MDM2 *small molecule* antagonist in hematologische en solide tumoren alsook in liposarcoom (222) (223) (224). Gezien de noodzakelijke dosis om effect te verkrijgen, de complicaties en de gastrointestinale bijwerkingen, werd RG7388 (RO5503781) ontwikkeld (225). Dit product is ook gekend als idasanutlin. Men kan lagere concentraties gebruiken van idasanutlin dan diegene die nodig zijn bij RG7112 om effecten te verkrijgen. Een van de nadelen van het gebruik van nutlins is de overexpressie van MDMX, een analoog van MDM2 en een regulator van p53 activiteit. MDM2 bindt ook p53 en inhibeert de p53 transcriptionele activiteit. In tegendeel tot MDM2, kan MDMX de ubiquinatie en degradatie van p53 teweeg brengen (226). Nutlin-3 bindt zeer zwak aan MDMX en beïnvloedt de p53-MDMX interactie niet (227). De overexpressie van MDM2 op basis van nutlin therapie stimuleert de MDMX degradatie en dit draagt bij aan de apoptotische werking van nutlin (227). Kankercellijnen die MDMX tot overexpressie brengen, zijn resistent tegen

nutlintherapie. Een MDMX antagonist zou hierbij het effect van nutlin toch kunnen stimuleren bij deze tumoren (228).

Een ander nadeel aan het gebruik van nutlins, is de ontwikkeling van therapie-resistente tetraploïde cellen bij osteosarcoomcellen (229). Ook worden er in NB *de novo* p53 mutaties beschreven als gevolg van het gebruik van nutlin-3 (230) (231). Wat opvallend is, is dat de nutlin-3 resistente cellen niet alleen resistentie vertoonden ten opzichte van nutlin-3, maar ook ten opzichte van chemotherapie en radiotherapie (232). Deze observatie is in overeenstemming met andere studies, die wijzen op verworven p53 mutaties, aangezien bij herhaal een verhoogde frequentie van p53 mutaties worden gedetecteerd (15%) (233). Deze bevindingen zijn ook in overeenstemming met preklinische NB modellen waarbij verlies van p53 functie geassocieerd is met resistentie aan verschillende chemotherapieën en radiotherapie (233). Deze bevindingen wijzen er ook op dat deze resistentie dus gelinkt is aan p53 mutaties. De ontstaanswijze van deze verworven p53 mutaties bij MDM2 inhibitoren therapie blijft onduidelijk.

Naast nutlins, werden er ook andere *small molecule* MDM2 inhibitoren ontwikkeld zoals spiro-oxindolen (234), isoindolinones (235), chalcone derivaten (236), benzodiazepinones (237), chromenotriazolopyrimidines (238), imidazothiazole derivaten(239), piperidones (240) en morpholinones (241) .

5.3.3 Combinatie

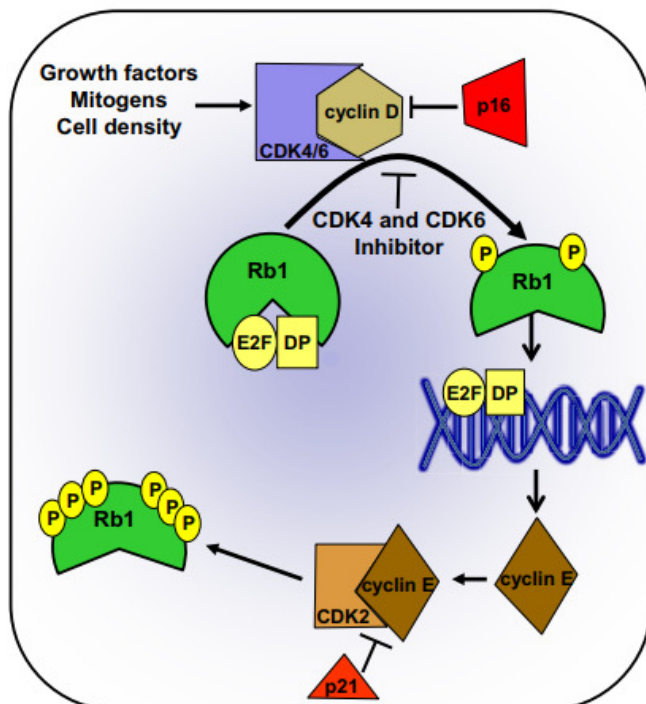
Het is van belang om ook de doeltreffendheid na te gaan van nutlin-3 in combinatie met andere mogelijke therapieën. Zo rapporteren enkele studies een synergetische werking bij de combinatie van nutlin-3 en chemotherapie of radiotherapie (242)(243)(244). Zo toonden Barbieri et al. aan dat de toevoeging van nutlin-3a aan chemotherapie (etoposide of cisplatinum) een daling in celproliferatie en een stijging in apoptose veroorzaakt (242). De stijging in apoptose kan verklaard worden doordat de nutlin geïnduceerde stabilisatie van p53 de gevoeligheid van NB aan de effecten van etoposide of cisplatinum verhoogt (242). De chemotherapie geïnduceerde apoptose wordt ook versterkt door nutlin-3a in p53 mutante cellen, op een E2F1 afhankelijke manier (245).

Eveneens werd er reeds een synergetische werking gerapporteerd bij het combineren van nutlin-3 en een door adenovirus gemedieerde p53 gentherapie (246) of moleculaire therapieën zoals recombinante TRAIL bij AML (247) of cycline-afhankelijke kinase(CDK) inhibitoren (248). De *in vivo* veiligheid en doeltreffendheid van deze combinatietechnieken moet echter nog bepaald worden.

5.4 CDK4/6 inhibitoren

5.4.1 Algemeen

Wanneer een cel DNA replicatie ondergaat, moet een cel in de celcyclus de overgang maken van de G1 fase naar de S fase, waarbij een controlepunt deze overgang reguleert (249). Deze regulatie gebeurt door de cycline D-CDK4/6-INK4-Rb signaalweg(zie figuur 30). Als deze overgang plaatsvindt, zullen de niveaus van type-D cyclines (D1,D2 en D3) stijgen. Na de binding van deze type-D cyclines aan CDK4 en CDK6, verplaatst dit complex zich naar de nucleus waar dit complex wordt gefosforyleerd door een CDK-activerend kinase (CAK) complex. Het geactiveerde CDK4/6 complex fosforyleert op zijn beurt het RB tumorsuppressor eiwit. Retinoblastoom (Rb) is een tumorsuppressor dat door binding met de E2F transcriptiefactoren de activatie van deze onderdrukt (250)(251)(252). Hierdoor wordt de expressie van de E2F-gereguleerde genen gestimuleerd, zoals onder meer deze voor de type-E cyclines (E1 en E2). Cycline E bindt dan CDK2, dat RB hyperfosforyleert met als gevolg een verder toegenomen expressie van de E2F-gereguleerde genen. Deze E2F-afhankelijke genen (DNA polymerase alfa, thymidylaat synthase, *proliferating cell nuclear antigen*, ribonucleotide reductase, etc.) zijn van belang voor de toegang tot de S fase van de celcyclus en voor de start van de DNA synthese (253) (254)(zie figuur 30).



Figuur 30 CDK2, CDK4 en CDK6 fosforyleren Rb, wat resulteert in de expressie van genen die noodzakelijk zijn voor de transitie naar de S fase en verdere DNA replicatie. Cycline kinase inhibitoren (CKIs), p16 INK4A en p21 cip1 zorgen voor de controle. Inhibitie van CDK4 en CDK6 leidt tot hypofosforylatie van Rb en G1 arrest, naar Sánchez-Martínez et al (255).

In kankercellen is de cycline D-CDK4/6-INK4-Rb signaalweg vaak verstoord. Echter de meerderheid van de tumoren behoudt het wild-type RB. In de meeste tumoren wordt een toegenomen cycline D-CDK4/6 activiteit waargenomen. Deze kan op verschillende manieren ontstaan, door overexpressie van de type-D cyclines, mutatie of amplificatie van CDK4/6 of door verlies van functie van een negatieve regulator van het complex zoals p16^{INK4A}. Deze mechanismen leiden elk tot de ongecontroleerde groei van kankercellen (249) (256) (257). In de meeste gevallen gaat het om de situatie waarin p16^{INK4A} geactiveerd is door gendeletie, puntmutatie of *silencing* (258) (259). p16^{INK4A} blokkeert de binding van type-D cyclines aan CDK4 en CDK6, terwijl p21^{cip1} deze binding juist stabiliseert (257).

Ook andere afwijkingen zijn gekend. Zo is het gen dat codeert voor cycline D1 (CCND1) geamplificeerd in kankers van de hoge gastrointestinale tractus, hoofd en hals, borst, long en blaas (260) (260). Amplificatie van *CCND2* en *CCND3* komt veel minder frequent voor dan voorgaande amplificatie. Een amplificatie van *CDK4* komt voor in liposaroom en glioblastoom, terwijl een amplificatie van *CDK6* voorkomt in prostaatkanker en kankers van de hoge gastrointestinale tractus (260). Ook gentranslocaties en genmutaties kunnen de cycline D niveaus laten stijgen in tumorcellen.

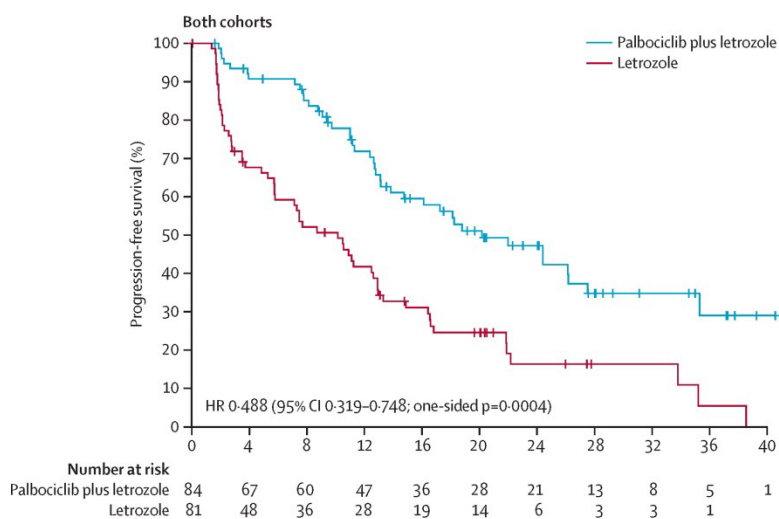
Eveneens kan een stijging in cycline D1 te wijten zijn aan afwijkingen die de RAS-RAF-MEK-ERK signaalweg activeren of door een hyperactieve fosfoinositide-3-kinase–AKT signaalweg (261) (262).

5.4.2 Ontwikkeling

In NB komt ALK activatie vaak voor, wat aanleiding geeft tot cycline D upregulatie en celproliferatie (263). Eveneens wordt overexpressie van cycline D1 vaak gezien in NB (264). Een hoge expressie van CDK4 en CDK6 en deleties van *CDKN2A* worden ook waargenomen bij NB (264) (265).

Eerst werden eerste generatie pan-CDK inhibitoren ontwikkeld, waarbij flavopiridol als eerste klinische *trials* onderging (zie figuur 32). Deze klinische studies toonden echter een ongunstige doeltreffendheid en belangrijke bijwerkingen zoals bijvoorbeeld myelosuppressie, secretoire diarree en tumor lysis syndroom (266).

Zo werd PD 0332991 (palbociclib) ontwikkeld, een lid van de pyridopyrimidine klasse (zie figuur 32 en figuur 33). Dit werd in een fase I klinische *trial* verder bestudeerd (267) (268). Deze CDK4/6 inhibitor induceerde in Rb positieve cellen een G1 arrest *in vitro*. Het vertoonde goede effecten in verschillende tumoren (met geamplificeerd *CDK4*) zoals liposaroom, mantelcellymfoom, myeloom, borstkanker, ovariumkanker en colonkanker. In februari 2015, werd palbociclib als eerste CDK4/6 inhibitor door de *US Food and Drug Administration* (FDA) goedgekeurd in combinatie met letrozole als behandeling voor ER+/HER2- borstkanker bij postmenopauzale vrouwen (269). Deze beslissing werd genomen ook op basis van resultaten van een fase II PALOMA-1 trial (270) (NCT00721409). Bij de patiënten die palbociclib en letrozole toegediend kregen, werden neutropenie, leucopenie en vermoeidheid als meest frequente bijwerkingen beschreven. Ondanks de toename van neutropenie en leucopenie werd er geen geval van neutropene koorts als bijwerking beschreven. Ook werd een toename gerapporteerd in anemie, nausea, alopecie en artralgie, maar de meeste van deze gevallen waren laaggradig. In deze *trial* werd een mediane OS van 37,5 maanden in de combinatiegroep (palbociclib en letrozole) beschreven ten opzichte van 33,3 maanden in de letrozole groep. De *progression-free survival* (PFS) vertoont echter wel grote verschillen. De mediane PFS was 10,2 maanden bij de letrozole groep en was 20,2 maanden bij de combinatiegroep (zie figuur 31).



Figuur 31 PFS combinatiegroep ten opzichte van letrozole, naar Finn et al. (270)

LY2835219 (abemaciclib) dat ontwikkeld werd in 2008, vertoont G1 arrest *in vitro* en *in vivo* aan de hand van Rb fosforylatie remming (271) (zie figuur 32 en figuur 33). In 2015 werd dit door de FDA goedgekeurd voor vergevorderde ER+ borstkanker. In tegenstelling tot palbociclib of ribociclib komt neutropenie bij abemaciclib minder frequent voor. Diarree en vermoeidheid komen dan wel meer frequent voor bij abemaciclib.

LEE-011 (ribociclib) werd in 2010 ontwikkeld (zie figuur 32 en figuur 33). Ribociclib induceert defosforylatie van Rb, G1 arrest en senescentie in kankercellen zoals melanoom (met *BRAF* of *NRAS* mutatie) (272), borstkanker (273), liposarcoom (274) en neuroblastoom (275). Uit de resultaten van de *Cancer cell line Encyclopedia study*, bleek dat NBcellijnen sensitief zijn voor ribociclib (276). In preklinische studies induceerde ribociclib cytostase in 12 van de 17 humane NBcellijnen (275). Een fase I onderzoek door Georger et al. beschreef een goede tolerantie van ribociclib bij 31 pediatrie patiënten (277). Hierbij werd stabiele ziekte verkregen bij 7 van de 15 NB patiënten. Als meest voorkomende bijwerkingen werden neutropenie, leucopenie, anemie, trombocytopenie, lymfopenie waargenomen. Ook braken, vermoeidheid, misselijkheid en QT verlenging werden beschreven, maar in mindere mate.

Recent werden PD-0332991 (palbociclib) (278), LY2835219 (abemaciclib) (271), en LEE-011 (ribociclib) (273) bestudeerd in fase III *trials* in borstkanker en longkanker. In 2014 werden twee nieuwe CDK4/6 inhibitoren voorgesteld, namelijk MM-D37K (279) en G1T28-1 (NCT02514447).

Drug Candidate	Company	Administration Mode	CDK Inhibition Profile: IC ₅₀	Clinical Trial Stage
Flavopiridol	Sanofi-Aventis	intravenous	CDK1: 30 nM, CDK2: 100 nM CDK4: 20 nM, CDK6: 60 nM CDK7: 10 nM, CDK9: 10 nM	II
Roscovitine	Cyclacel	oral	CDK1: 2.7 μM, CDK2: 0.1 μM CDK7: 0.5 μM, CDK9: 0.8 μM	II
Dinaciclib	Merck	intravenous	CDK1: 3 nM, CDK2: 1 nM CDK5: 1 nM, CDK9: 4 nM	III
SNS032	Sunesis	intravenous	CDK2: 38 nM, CDK7: 62 nM CDK9: 4 nM	I
AT7519	Astex/Novartis	intravenous	CDK1: 190 nM, CDK2: 44 nM CDK4: 67 nM, CDK5: 18 nM CDK9: <10 nM	I/II
PD0332991	Pfizer	oral	CDK4: 11 nM, CDK6: 16 nM	III
EM-1421	Erimos	intravenous	CDK1: N/A	I/II
RGB-286638	Agennix	intravenous	CDK1: 2 nM, CDK2: 3 nM CDK3: 5 nM, CDK4: 4 nM CDK9: 1 nM	I
P276-00	Nicholas Piramal	intravenous	CDK9: 20 nM, CDK1: 79 nM CDK2: 224 nM, CDK4: 63 nM	II
BAY-1000394	Bayer	oral	CDK1-4, 7, 9: 5-25 nM; CDK9: 3nM, CDK5: 4 nM,	I
TG02/SG1317	S*BIO/Tragara	oral	CDK2: 5 nM, CDK3: 8 nM, CDK1: 9nM	I
PHA-848125 AC	Nerviano	oral	CDK1: 2 nM, CDK2: 3 nM CDK4: 5 nM, CDK5: 4 nM	II
LEE-011	Novartis/Astex	oral	CDK4, 6: N/A	III
LY2835219	Eli Lilly	oral	CDK4, 6: N/A	I/(III)

Figuur 32 verschillende CDK inhibitoren, naar Mariaule et al. (280)

Compound	Structure	CDK inhibition (IC ₅₀ , nM)	Stage of Development*
PD0332991 (Pfizer) ⁹¹		CDK1/B > 10,000 CDK2/A > 10,000 CDK2/E2 > 10,000 CDK4/D1 = 11 CDK4/D3 = 9 CDK5/P25 > 10,000 CDK6/D2 = 15	<ul style="list-style-type: none"> • Approved in combination with letrozole (Ibrance[®]) for the first-line treatment of advanced breast cancer. • Phase II clinical trials in advanced or metastatic liposarcoma, advanced non-small cell lung cancer, ovarian epithelial carcinoma, advanced gastrointestinal stromal tumors refractory to imatinib and sunitinib, liver cancer, MLL-rearranged acute leukemias. • Phase I clinical trials in recurrent, progressive, or refractory central nervous system tumors (young patients). • Phases I, II and III clinical trials in combination with other agents against various cancers.
LEE011 (Novartis) ⁹⁰		CDK1/B > 10,000 CDK2/A > 10,000 CDK4/D1 = 10 CDK5/P25 > 10,000 CDK6/D3 = 39 CDK9/T1 = 1,500	<ul style="list-style-type: none"> • Phase III clinical trials in pre-menopausal women with advanced breast cancer. • Phase II clinical trials in relapsed/refractory teratoma with recent progression. • Phase I clinical trials in recurrent glioblastoma or anaplastic glioma, advanced solid tumors or lymphomas, malignant rhabdoid tumors and neuroblastoma (pediatric patients). • Phases I, II and III clinical trials in CDK4/6 pathway activated solid tumors and/or hematological malignancies in combination with other drugs.
LY2835219 (Eli Lilly) ⁹²		CDK1/B = 1,627 CDK2/E = 504 CDK4/D1 = 2 CDK6/D1 = 10 CDK7/H = 3,910 CDK9/T1 = 57	<ul style="list-style-type: none"> • Phase III clinical trials in previously treated lung cancer. • Phase II clinical trials in previously treated breast cancer that has spread, breast cancer that has spread to the brain.

Figuur 33 Klinische *trials* omtrent PD-0332991 (palbociclib), LEE-011 (ribociclib) en LY2835219 (abemaciclib) naar Tadesse et al. (281).

6 Discussie

Neuroblastoom is een embryonale tumor van het sympathische zenuwstelsel (1) en vormt ongeveer 6% van diagnoses van alle pediatrische kanker en is verantwoordelijk voor 15% van de kankersterfte in de kindertijd (4).

Hoewel er de afgelopen drie decennia vorderingen zijn gemaakt voor kinderen met een tumor in het lagere stadium, blijven kinderen met hoog-risico neuroblastoom vaak ongeneeslijk ziek met overlevingspercentages van minder dan 40% ondanks een verhoging in intensiteit van de cytotoxische chemoradiotherapie (6). Hoewel de resultaten voor hoog-risico NB patiënten de voorbije 20 jaar verbeterd zijn, blijven de huidige behandelingen suboptimaal. Dit is te wijten aan resistentie aan chemotherapie en radiotherapie. De toenemende kennis omtrent de biologie en genetische basis van NB biedt kansen voor een verdere verfijning van de risicostratificatie en het identificeren van nieuwe moleculaire doelwitten. Voor patiënten met laag-risico en intermediair-risico NB is het van belang om de blootstelling aan chemotherapie en operatie tot een minimum te beperken. Bij hoog-risico NB patiënten zal het van belang zijn om in te schatten welke patiënten een groot risico hebben voor falen na therapie of herval, ofwel bij de diagnose (op basis van genetische kenmerken) ofwel op basis van hun respons op de behandeling. Door op het moment van diagnose of gedurende specifieke tijdstippen in de loop van de behandeling het risico op herval verder te verfijnen kunnen we alternatieve therapie toedienen aan patiënten die niet kunnen genezen worden.

Het zal een uitdaging zijn om een gepersonaliseerde aanpak en *targeted* aanpak uit te werken in NB patiënten, aangezien sommige specifieke genetische mutaties zeldzaam voorkomen in NB (153) (16). Zo zal het succesvol gebruiken van bv. ALK-inhibitoren afhankelijk zijn van het identificeren van patiënten met gemuteerde of geamplificeerde ALK NB. Een uitzondering vormt het gebruik van anti-GD2 dat reeds succesvol werd geïntroduceerd in de therapie (87). De centrale gerandomiseerde COG fase III studie uitgevoerd door Yu et al. speelde hierbij een belangrijke rol (87). Er werd een significante verbetering in EFS beschreven bij toediening van ch14.18 in combinatie met IL2 en GM-CSF. Echter, ondanks het succes van Dinutuximab en de implementatie ervan in standaard combinatietherapieschema's voor hoog-risico NB, kent deze anti-GD2 therapie ook bijwerkingen zoals pijn, hypotensie, capillaire lek syndroom en allergische reacties. Om deze toxiciteit te verbeteren, werd bijvoorbeeld de *long-term infusion* als mogelijke oplossing voorgesteld (111). Een ander belangrijk werkpunt voor de behandeling met Dinutuximab is de optimalisatie van de dosis. Het is nog een belangrijke uitdaging om verder te bepalen op welke wijze Dinutuximab gecombineerd kan worden met cytotoxische therapie of andere therapieën. Alsook is het van belang om te bepalen wanneer Dinutuximab geïntroduceerd

wordt tijdens de behandeling: tijdens de neo-adjuvante setting, tijdens de consolidatie of om de MRD te behandelen.

Alhoewel heel wat andere behandelingsopties werden besproken, waaronder ALK inhibitoren (NCT01606878) (NCT03126916) (NCT03107988) (NCT03213652), nutlins (219) en CDK4/6 inhibitoren (268) (275) (277), zijn deze nog niet even uitvoerig getest zoals Dinutuximab en valt hun uiteindelijk klinisch nut nog steeds af te wachten.

Naast het moment van diagnose zal het ook belangrijk zijn om op het moment van herval targets te identificeren in deze chemoresistente patiëntengroep. Deze resistentie werd o.a. gelinkt aan *p53* mutaties wat werd beschreven in preklinische NB modellen. Het verlies van de *p53* functie werd geassocieerd aan resistentie aan chemotherapie en radiotherapie (233), geïllustreerd aan de hand van een verhoogde frequentie van *p53* mutaties bij herval (15%).

De chemotherapie behandeling van hoog-risico NB werd zodanig geïntensifieerd met het oog op verbetering van resultaten dat er echter ernstige bijwerkingen ontstonden, zowel op korte termijn als op lange termijn. Er dient dus aandacht te gaan naar de patiënten die de ziekte overleven om de individuele gevoeligheid voor langdurige bijwerkingen van de nieuwere behandelingen na te gaan. Tevens kan het belangrijk zijn om niet ziekte-specifiek te denken, maar eerder te kijken binnen een genetische subgroep waarin meerdere ziektes kunnen omvat zijn. Zo kunnen de zogenaamde `basket trials` worden uitgevoerd. In dit soort *trial* wordt het effect van een geneesmiddel op een mutatie nagegaan, maar voor verschillende tumortypes. Een voorbeeld is Vemurafenib, een BRAF V600 kinase inhibitor die getest werd in de behandeling van NSCLC, colorectale kanker, cholangiocarcinoom, multipel myeloom, borstkanker en ovariumkanker. Deze vorm van klinische studies zou dan eventueel sneller tot resultaten kunnen leiden en de tijd tot het op de markt brengen van een geneesmiddel drastisch kunnen verkleinen. Tenslotte is het ook zo dat een belangrijk deel van geneesmiddelenonderzoek zich nog steeds enkel richt tot de volwassen populatie waardoor de pediatrische patiënten, alhoewel soms kandidaat voor de therapie, niet kunnen geïnccludeerd worden in deze studies.

We besluiten dus dat er nog steeds nood is aan nieuwe therapeutische mogelijkheden voor deze heterogene ziekte. Het feit dat Dinutuximab geïmplementeerd is in therapieschema's, met een duidelijke winst op overleving, wijst erop dat nieuwe onderzoeken omtrent behandelingsopties een groot verschil kunnen maken voor deze NB patiënten. Deze implementatie geeft goede hoop om verder te investeren in de ontwikkeling van nieuwe therapieën en de verfijning van reeds bestaande therapieën. Ondanks het feit dat vele vragen nog onbeantwoord blijven, is het noodzakelijk om deze heterogene ziekte verder in onderzoek op te nemen gezien de lage overlevingskansen.

7 **Referentielijst**

1. Cheung N-K V, Dyer MA. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. England; 2013 Jun;13(6):397–411.
2. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. Taylor & Francis; 2017;17(4):369–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14737140.2017.1285230>
3. Bernstein ML, Leclerc JM, Bunin G, Brisson L, Robison L, Shuster J, et al. A population-based study of neuroblastoma incidence, survival, and mortality in North America. *J Clin Oncol*. United States; 1992 Feb;10(2):323–9.
4. Li J, Thompson TD, Miller JW, Pollack LA, Stewart SL. Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001-2003. *Pediatrics*. United States; 2008 Jun;121(6):e1470–7.
5. Esposito MR, Aveic S, Seydel A, Tonini GP. Neuroblastoma treatment in the post-genomic era. *J Biomed Sci* [Internet]. *Journal of Biomedical Science*; 2017;24(1):14. Available from: <http://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-017-0319-y>
6. Schmiedebergs N, Pharmacol A. *HHS Public Access*. 2017;122(1):1–23.
7. Sharma R, Mer J, Lion A, Vik TA. Clinical Presentation, Evaluation, and Management of Neuroblastoma. *Pediatr Rev* [Internet]. 2018 Apr 1;39(4):194 LP – 203. Available from: <http://pedsinreview.aappublications.org/content/39/4/194.abstract>
8. Hale G, Gula MJ, Blatt J. Impact of gender on the natural history of neuroblastoma. *Pediatr Hematol Oncol*. England; 1994;11(1):91–7.
9. Ward E, DeSantis C, Robbins A, Kohler B, Jemal A. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* [Internet]. American Cancer Society; 2014 Jan 31;64(2):83–103. Available from: <https://doi.org/10.3322/caac.21219>
10. Knudson AG. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1971 Apr;68(4):820–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC389051/>
11. Wong K, IB H, BC L. Familial neuroblastoma. *Am J Dis Child* [Internet]. 1971 May 1;121(5):415–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/archpedi.1971.02100160085010>
12. Bolande RP. Neurocristopathy: Its Growth and Development in 20 Years. *Pediatr Pathol Lab Med* [Internet]. Taylor & Francis; 1997 Jan 1;17(1):1–25. Available from: <https://doi.org/10.1080/15513819709168343>
13. Nagashimada M, Ohta H, Li C, Nakao K, Uesaka T, Brunet JF, et al. Autonomic neurocristopathy-associated mutations in PHOX2B dysregulate Sox10 expression. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3145–58.
14. Raabe EH, Laudenslager M, Winter C, Wasserman N, Cole K, Laquaglia M, et al. Prevalence and functional consequence of PHOX2B mutations in neuroblastoma. *Oncogene*. 2008;27(4):469–76.
15. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, Trang H, De Pontual L, Gener B, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(4):459–61.
16. Bourdeaut F, Trochet D, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Deville A, Coz C, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Cancer Lett*. 2005;228(1-2):51–8.
17. Serra A, Haberle B, König IR, Kappler R, Suttrop M, Schackert HK, et al. Rare occurrence of PHOX2b mutations in sporadic neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*. United States; 2008 Oct;30(10):728–32.

18. Bielle F, Freneaux P, Jeanne-Pasquier C, Maran-Gonzalez A, Rousseau A, Lamant L, et al. PHOX2B immunolabeling: a novel tool for the diagnosis of undifferentiated neuroblastomas among childhood small round blue-cell tumors. *Am J Surg Pathol*. United States; 2012 Aug;36(8):1141–9.
19. Bachetti T, Di Paolo D, Di Lascio S, Mirisola V, Brignole C, Bellotti M, et al. PHOX2B-mediated regulation of ALK expression: in vitro identification of a functional relationship between two genes involved in neuroblastoma. *PLoS One*. United States; 2010 Oct;5(10).
20. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole K a, Wood A, Attiyeh EF, et al. NIH Public Access. October. 2009;455(7215):930–5.
21. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugières L, Ribeiro A, De Pontual L, Combaret V, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):967–70.
22. Herington JL, Crispens MA, Carvalho-macedo AC, Camargos AF, Lebovic DI, Bruner- KL, et al. NIH Public Access. 2012;95(4):1295–301.
23. De Pontual L, Kettaneh D, Gordon CT, Oufadem M, Boddaert N, Lees M, et al. Germline gain-of-function mutations of ALK disrupt central nervous system development. *Hum Mutat*. 2011;32(3):272–6.
24. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. England; 2008 Oct;455(7215):971–4.
25. Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *Biochem J*. England; 2008 Dec;416(2):153–9.
26. George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W 2nd, Zhang J, et al. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*. England; 2008 Oct;455(7215):975–8.
27. Azarova AM, Gautam G, George RE. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Semin Cancer Biol*. England; 2011 Oct;21(4):267–75.
28. Devoto M, Specchia C, Laudenslager M, Longo L, Hakonarson H, Maris J, et al. Genome-wide linkage analysis to identify genetic modifiers of ALK mutation penetrance in familial neuroblastoma. *Hum Hered*. Switzerland; 2011;71(2):135–9.
29. Capasso M, Devoto M, Hou C, Asgharzadeh S, Glessner JT, Attiyeh EF, et al. Common variations in BARD1 influence susceptibility to high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*. United States; 2009 Jun;41(6):718–23.
30. Wang K, Diskin SJ, Zhang H, Attiyeh EF, Winter C, Hou C, et al. Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature*. England; 2011 Jan;469(7329):216–20.
31. Diskin SJ, Hou C, Glessner JT, Attiyeh EF, Laudenslager M, Bosse K, et al. Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. *Nature* [Internet]. 2009 Jun 18;459(7249):987–91. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19536264>
32. Nguyen LB, Diskin SJ, Capasso M, Wang K, Diamond MA, Glessner J, et al. Phenotype restricted genome-wide association study using a gene-centric approach identifies three low-risk neuroblastoma susceptibility Loci. *PLoS Genet*. United States; 2011 Mar;7(3):e1002026.
33. Maris JM. Recent Advances in Neuroblastoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Jun 10;362(23):2202–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3306838/>
34. De Bernardi B, Balwierz W, Bejent J, Cohn SL, Garre ML, Iehara T, et al. Epidural compression in neuroblastoma: Diagnostic and therapeutic aspects. *Cancer Lett*. Ireland; 2005 Oct;228(1-2):283–99.
35. Musarella MA, Chan HS, DeBoer G, Gallie BL. Ocular involvement in neuroblastoma:

- prognostic implications. *Ophthalmology*. United States; 1984 Aug;91(8):936–40.
36. Woodruff G, Buncic JR, Morin JD. Horner's syndrome in children. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. United States; 1988;25(1):40–4.
 37. Ogita S, Tokiwa K, Takahashi T, Imashuku S, Sawada T. Congenital cervical neuroblastoma associated with Horner syndrome. *J Pediatr Surg*. United States; 1988 Nov;23(11):991–2.
 38. Mahoney NR, Liu GT, Menacker SJ, Wilson MC, Hogarty MD, Maris JM. Pediatric horner syndrome: etiologies and roles of imaging and urine studies to detect neuroblastoma and other responsible mass lesions. *Am J Ophthalmol*. United States; 2006 Oct;142(4):651–9.
 39. Scheibel E, Rechnitzer C, Fahrenkrug J, Hertz H. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in children with neural crest tumours. *Acta Paediatr Scand*. Sweden; 1982 Sep;71(5):721–5.
 40. Mitchell WG, Davalos-Gonzalez Y, Brumm VL, Aller SK, Burger E, Turkel SB, et al. Opsoclonus-ataxia caused by childhood neuroblastoma: developmental and neurologic sequelae. *Pediatrics*. United States; 2002 Jan;109(1):86–98.
 41. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol*. United States; 1993 Aug;11(8):1466–77.
 42. Newman EA, Nuchtern JG. Recent biologic and genetic advances in neuroblastoma: Implications for diagnostic, risk stratification, and treatment strategies. *Semin Pediatr Surg* [Internet]. Elsevier; 2016;25(5):257–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2016.09.007>
 43. Sharp SE, Trout AT, Weiss BD, Gelfand MJ. MIBG in Neuroblastoma Diagnostic Imaging and Therapy. *Radiographics*. United States; 2016;36(1):258–78.
 44. Kembhavi SA, Shah S, Rangarajan V, Qureshi S, Popat P, Kurkure P. Imaging in neuroblastoma: An update. *Indian J Radiol Imaging* [Internet]. Medknow Publications & Media Pvt Ltd; 2015;25(2):129–36. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25969636>
 45. Sharp SE, Shulkin BL, Gelfand MJ, Salisbury S, Furman WL. 123I-MIBG scintigraphy and 18F-FDG PET in neuroblastoma. *J Nucl Med*. United States; 2009 Aug;50(8):1237–43.
 46. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi V V, Roald B, et al. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. United States; 1999 Jul;86(2):364–72.
 47. Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. England; 2013 May;497(7447):108–12.
 48. Montagut C, Siravegna G, Bardelli A. Liquid biopsies to evaluate early therapeutic response in colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015.
 49. Combaret V, Iacono I, Bellini A, Brejon S, Bernard V, Marabelle A, et al. Detection of tumor ALK status in neuroblastoma patients using peripheral blood. *Cancer Med*. United States; 2015 Apr;4(4):540–50.
 50. Combaret V, Audouy C, Iacono I, Favrot M-C, Schell M, Bergeron C, et al. Circulating MYCN DNA as a tumor-specific marker in neuroblastoma patients. *Cancer Res*. United States; 2002 Jul;62(13):3646–8.
 51. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* (London, England). England; 2007 Jun;369(9579):2106–20.
 52. Park JR, Bagatell R, London WB, Maris JM, Cohn SL, Mattay KK, et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. United States; 2013 Jun;60(6):985–93.

53. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. United States; 2009 Jan;27(2):298–303.
54. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. United States; 2009 Jan;27(2):289–97.
55. Baker DL, Schmidt ML, Cohn SL, Maris JM, London WB, Buxton A, et al. Outcome after Reduced Chemotherapy for Intermediate-Risk Neuroblastoma. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society; 2010 Sep 29;363(14):1313–23. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001527>
56. Strother DR, London WB, Schmidt M Lou, Brodeur GM, Shimada H, Thorner P, et al. Outcome after surgery alone or with restricted use of chemotherapy for patients with low-risk neuroblastoma: results of Children’s Oncology Group study P9641. *J Clin Oncol*. United States; 2012 May;30(15):1842–8.
57. Alvarado CS, London WB, Look AT, Brodeur GM, Altmiller DH, Thorner PS, et al. Natural history and biology of stage A neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group Study. *J Pediatr Hematol Oncol*. United States; 2000;22(3):197–205.
58. De Bernardi B, Mosseri V, Rubie H, Castel V, Foot A, Ladenstein R, et al. Treatment of localised resectable neuroblastoma. Results of the LNESG1 study by the SIOPEurope Neuroblastoma Group. *Br J Cancer* [Internet]. 2008/09/02 ed. Nature Publishing Group; 2008 Oct 7;99(7):1027–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18766186>
59. Nuchtern JG, London WB, Barnewolt CE, Naranjo A, McGrady PW, Geiger JD, et al. A prospective study of expectant observation as primary therapy for neuroblastoma in young infants: a Children’s Oncology Group study. *Ann Surg*. United States; 2012 Oct;256(4):573–80.
60. Twist C, London WB, Naranjo A, Schmidt M Lou, Adkins ES, Mattei P, et al. Maintaining outstanding outcomes using response- and biology-based therapy for intermediate-risk neuroblastoma: A report from the Children’s Oncology Group study ANBL0531. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2014 May 20;32(15_suppl):10006. Available from: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.10006
61. Kohler JA, Rubie H, Castel V, Beiske K, Holmes K, Gambini C, et al. Treatment of children over the age of one year with unresectable localised neuroblastoma without MYCN amplification: Results of the SIOPEurope study. *Eur J Cancer* [Internet]. 2013;49(17):3671–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804913005467>
62. Hobbie WL, Moshang T, Carlson CA, Goldmuntz E, Sacks N, Goldfarb SB, et al. Late effects in survivors of tandem peripheral blood stem cell transplant for high-risk neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. United States; 2008 Nov;51(5):679–83.
63. Tonini GP, Nakagawara A, Berthold F. Towards a turning point of neuroblastoma therapy. *Cancer Lett* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012;326(2):128–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.017>
64. Friedman DN, Henderson TO. Late Effects and Survivorship Issues in Patients with Neuroblastoma. *Child (Basel, Switzerland)* [Internet]. MDPI; 2018 Aug 6;5(8):107. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30082653>
65. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboum SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, et al. Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2015;33(27):3008–17.
66. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Prim*. England; 2016 Nov;2:16078.
67. Irwin MS, Park JR. Neuroblastoma: paradigm for precision medicine. *Pediatr Clin North Am*. United States; 2015 Feb;62(1):225–56.

68. Pearson ADJ, Pinkerton CR, Lewis IJ, Imeson J, Ellershaw C, Machin D. High-dose rapid and standard induction chemotherapy for patients aged over 1 year with stage 4 neuroblastoma: a randomised trial. *Lancet Oncol.* England; 2008 Mar;9(3):247–56.
69. Yalcin B, Kremer LC, Caron HN, van Dalen EC. High-dose chemotherapy and autologous haematopoietic stem cell rescue for children with high-risk neuroblastoma. *Cochrane database Syst Rev.* England; 2013 Aug;(8):CD006301.
70. Schulz G, Cheresh DA, Varki NM, Yu A, Staffileno LK, Reisfeld RA. Detection of ganglioside GD2 in tumor tissues and sera of neuroblastoma patients. *Cancer Res.* United States; 1984 Dec;44(12 Pt 1):5914–20.
71. Mujoo K, Cheresh DA, Yang HM, Reisfeld RA. Disialoganglioside GD2 on human neuroblastoma cells: target antigen for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity and suppression of tumor growth. *Cancer Res.* United States; 1987 Feb;47(4):1098–104.
72. Chen S, Caragine T, Cheung N-K V, Tomlinson S. Surface Antigen Expression and Complement Susceptibility of Differentiated Neuroblastoma Clones. *Am J Pathol* [Internet]. American Society for Investigative Pathology; 2000 Mar 2;156(3):1085–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1876851/>
73. Emil B. A metastatic neuroblastoma model in SCID mice. *Int J Cancer* [Internet]. Wiley-Blackwell; 1998 Dec 6;67(3):379–85. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960729\)67:3<379::AID-IJC12>3.0.CO](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960729)67:3<379::AID-IJC12>3.0.CO)
74. Tschakowsky K, Brain JD. Effects of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate on macrophage function and endotoxin-induced mortality. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 1994;1222(3):323–30. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016748899490037X>
75. Matthay KK, George RE, Yu AL. Promising therapeutic targets in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 May 15;18(10):2740–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3382042/>
76. Jonsson AH, Yokoyama WMBT-A in I. Chapter 2 Natural Killer Cell Tolerance: Licensing and Other Mechanisms. Academic Press; 2009. p. 27–79. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006527760801002X>
77. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* Switzerland; 2015;6:368.
78. Tarek N, Le Luduec J-B, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, Chamberlain E, et al. Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest.* United States; 2012 Sep;122(9):3260–70.
79. Venstrom JM, Zheng J, Noor N, Danis KE, Yeh AW, Cheung IY, et al. KIR and HLA genotypes are associated with disease progression and survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for high-risk neuroblastoma. *Clin Cancer Res.* United States; 2009 Dec;15(23):7330–4.
80. Cheung N-K V, Cheung IY, Kushner BH, Ostrovskaya I, Chamberlain E, Kramer K, et al. Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol.* United States; 2012 Sep;30(26):3264–70.
81. Delgado DC, Hank JA, Kolesar J, Lorentzen D, Gan J, Seo S, et al. Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer Res.* United States; 2010 Dec;70(23):9554–61.
82. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* England; 2005 Aug;436(7051):709–13.
83. Jonsson AH, Yokoyama WM. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv*

- Immunol. United States; 2009;101:27–79.
84. Yokoyama WM, Kim S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev. England*; 2006 Dec;214:143–54.
 85. Erbe AK, Wang W, Carmichael L, Kim K, Mendonca EA, Song Y, et al. Neuroblastoma Patients' KIR and KIR-Ligand Genotypes Influence Clinical Outcome for Dinutuximab-based Immunotherapy: A Report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res. United States*; 2018 Jan;24(1):189–96.
 86. Ding Y-Y, Panzer J, Maris JM, Castaneda A, Gomez-Chiari M, Mora J. Transverse myelitis as an unexpected complication following treatment with dinutuximab in pediatric patients with high-risk neuroblastoma: A case series. *Pediatr Blood Cancer. United States*; 2018 Jan;65(1).
 87. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med. United States*; 2010 Sep;363(14):1324–34.
 88. Sorkin LS, Otto M, Baldwin WM 3rd, Vail E, Gillies SD, Handgretinger R, et al. Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain. United States*; 2010 Apr;149(1):135–42.
 89. Vriesendorp FJ, Quadri SM, Flynn RE, Malone MR, Cromeens DM, Stephens LC, et al. Preclinical analysis of radiolabeled anti-GD2 immunoglobulin G. *Cancer. United States*; 1997 Dec;80(12 Suppl):2642–9.
 90. Kushner BH, Modak S, Basu EM, Roberts SS, Kramer K, Cheung N-K V. Posterior reversible encephalopathy syndrome in neuroblastoma patients receiving anti-GD2 3F8 monoclonal antibody. *Cancer. United States*; 2013 Aug;119(15):2789–95.
 91. Modak S, Cheung N-K V. Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Invest. England*; 2007 Feb;25(1):67–77.
 92. Simon T, Hero B, Faldum A, Handgretinger R, Schrappe M, Klingebiel T, et al. Long term outcome of high-risk neuroblastoma patients after immunotherapy with antibody ch14.18 or oral metronomic chemotherapy. *BMC Cancer. England*; 2011 Jan;11:21.
 93. Cheung N-K V, Sowers R, Vickers AJ, Cheung IY, Kushner BH, Gorlick R. FCGR2A polymorphism is correlated with clinical outcome after immunotherapy of neuroblastoma with anti-GD2 antibody and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol. United States*; 2006 Jun;24(18):2885–90.
 94. Murray JL, Cunningham JE, Brewer H, Mujoo K, Zukiwski AA, Podoloff DA, et al. Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J Clin Oncol. United States*; 1994 Jan;12(1):184–93.
 95. Yu AL, Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, Tsui CC, Gillies SD, Reisfeld RA, et al. Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma. *J Clin Oncol. United States*; 1998 Jun;16(6):2169–80.
 96. Raffaghello L, Marimpietri D, Pagnan G, Pastorino F, Cosimo E, Brignole C, et al. Anti-GD2 monoclonal antibody immunotherapy: a promising strategy in the prevention of neuroblastoma relapse. *Cancer Lett [Internet]*. 2003;197(1):205–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383503001009>
 97. Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Jungbjer B, Lekman A, Mansson JE, et al. Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochim Biophys Acta. Netherlands*; 1994 Sep;1214(2):115–23.
 98. Frost JD, Hank JA, Reaman GH, Frierdich S, Seeger RC, Gan J, et al. A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer. United States*; 1997 Jul;80(2):317–33.

99. Shusterman S, London WB, Gillies SD, Hank JA, Voss SD, Seeger RC, et al. Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol*. United States; 2010 Nov;28(33):4969–75.
100. Cheung N-K V, Modak S. Oral (1→3),(1→4)-β-D-Glucan Synergizes with Antiganglioside GD2 Monoclonal Antibody 3F8 in the Therapy of Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2002 May 1;8(5):1217 LP – 1223. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/8/5/1217.abstract>
101. Shibina A, Seidel D, Somanchi SS, Lee DA, Stermann A, Maurer BJ, et al. Fenretinide sensitizes multidrug-resistant human neuroblastoma cells to antibody-independent and ch14.18-mediated NK cell cytotoxicity. *J Mol Med (Berl)*. Germany; 2013 Apr;91(4):459–72.
102. Cheung NK, Kushner BH, Cheung IY, Kramer K, Canete A, Gerald W, et al. Anti-G(D2) antibody treatment of minimal residual stage 4 neuroblastoma diagnosed at more than 1 year of age. *J Clin Oncol*. United States; 1998 Sep;16(9):3053–60.
103. Handgretinger R, Anderson K, Lang P, Dopfer R, Klingebiel T, Schrappe M, et al. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer* [Internet]. Elsevier; 2018 Mar 27;31(2):261–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049\(94\)00413-Y](http://dx.doi.org/10.1016/0959-8049(94)00413-Y)
104. Barker E, Mueller BM, Handgretinger R, Herter M, Yu AL, Reisfeld RA. Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res*. United States; 1991 Jan;51(1):144–9.
105. Cheung NK, Lazarus H, Miraldi FD, Abramowsky CR, Kallick S, Saarinen UM, et al. Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol*. United States; 1987 Sep;5(9):1430–40.
106. Klee GG. Human anti-mouse antibodies. *Arch Pathol Lab Med*. United States; 2000 Jun;124(6):921–3.
107. Handgretinger R, Baader P, Dopfer R, Klingebiel T, Reuland P, Treuner J, et al. A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a. *Cancer Immunol Immunother*. Germany; 1992;35(3):199–204.
108. Yu AL, Batova A, Alvarado C, Rao VJ CR. Usefulness of a chimeric anti-GD2 (ch14.18) and GM-CSF for refractory neuroblastoma. 1997;
109. Gilman AL, Ozkaynak MF, Matthay KK, Krailo M, Yu AL, Gan J, et al. Phase I study of ch14.18 with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 in children with neuroblastoma after autologous bone marrow transplantation or stem-cell rescue: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. United States; 2009 Jan;27(1):85–91.
110. Ozkaynak MF, Sondel PM, Krailo MD, Gan J, Javorsky B, Reisfeld RA, et al. Phase I study of chimeric human/murine anti-ganglioside G(D2) monoclonal antibody (ch14.18) with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in children with neuroblastoma immediately after hematopoietic stem-cell transplantation: a Children's Cancer. *J Clin Oncol*. United States; 2000 Dec;18(24):4077–85.
111. Lode HN, Valteau-Couanet D, Garaventa A, Gray J, Castel V, Yaniv I, et al. Long-term infusion of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO in combination with interleukin-2 (IL2) activity and efficacy in high-risk relapsed/refractory neuroblastoma patients. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2015 May 20;33(15_suppl):TPS10080–TPS10080. Available from: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.tps10080
112. Handgretinger R, Anderson K, Lang P, Dopfer R, Klingebiel T, Schrappe M, et al. A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma. *Eur J Cancer*. England; 1995;31A(2):261–7.
113. Uttenreuther-Fischer MM, Huang CS, Yu AL. Pharmacokinetics of human-mouse chimeric anti-GD2 mAb ch14.18 in a phase I trial in neuroblastoma patients. *Cancer Immunol Immunother*.

- Germany; 1995 Dec;41(6):331–8.
114. Zeng Y, Fest S, Kunert R, Katinger H, Pistoia V, Michon J, et al. Anti-neuroblastoma effect of ch14.18 antibody produced in CHO cells is mediated by NK-cells in mice. *Mol Immunol*. England; 2005 Jul;42(11):1311–9.
 115. Ladenstein R, Weixler S, Baykan B, Bleeke M, Kunert R, Katinger D, et al. Ch14.18 antibody produced in CHO cells in relapsed or refractory Stage 4 neuroblastoma patients: A SIOPEN Phase 1 study. *MAbs* [Internet]. Landes Bioscience; 2013 Sep 1;5(5):801–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3851232/>
 116. Osenga KL, Hank JA, Albertini MR, Gan J, Sternberg AG, Eickhoff J, et al. A phase I clinical trial of the hu14.18-IL2 (EMD 273063) as a treatment for children with refractory or recurrent neuroblastoma and melanoma: a study of the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res*. United States; 2006 Mar;12(6):1750–9.
 117. A Grupp S, Verneris M, M Sondel P, Cooper L. Immunotherapy for Pediatric Cancer. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2008. 33-43 p.
 118. Sorkin LS, Yu AL, Junger H, Doom CM. Antibody directed against GD(2) produces mechanical allodynia, but not thermal hyperalgesia when administered systemically or intrathecally despite its dependence on capsaicin sensitive afferents. *Brain Res*. Netherlands; 2002 Mar;930(1-2):67–74.
 119. Navid FB, Handgretinger RC, Sondel R, Shulkin PM, Kaufman BL, Billups R, Wu C FJ, McGregor WL, OttoM LM, Gillies S SV. A novel anti-GD2 monoclonal antibody (mAb), hu14.18K322A, in children with refractory or recurrent neuroblastoma: Early-phase evaluation. *J Clin Oncol*. 2011;
 120. Yu AL, Eskenazi A, Strother D CR. A pilot study of anti-idiotypic monoclonal antibody as tumor vaccine in patients with high risk neuroblastoma. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2001;
 121. Batova A, Yu AL, Strother D, Angelini P EA. Promising results of a pilot trial of a GD(2) directed anti-idiotypic antibody as a vaccine for high risk neuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2004;
 122. Hiddemann W, Kneba M, Dreyling M, Schmitz N, Lengfelder E, Schmits R, et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: r. *Blood*. United States; 2005 Dec;106(12):3725–32.
 123. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. United States; 2001 Mar;344(11):783–92.
 124. Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell H V, Dotti G, et al. Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med*. United States; 2008 Nov;14(11):1264–70.
 125. Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood*. United States; 2011 Dec;118(23):6050–6.
 126. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society; 2014 Oct 15;371(16):1507–17. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407222>
 127. Titov A, Petukhov A, Staliarova A, Motorin D, Bulatov E, Shuvalov O, et al. The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy-associated toxicities. *Cell Death Dis* [Internet]. Nature Publishing Group UK; 2018 Sep 4;9(9):897. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6123453/>

128. Uttenreuther-Fischer MM, Krüger JA, Fischer P. Molecular characterization of the anti-idiotypic immune response of a relapse-free neuroblastoma patient following antibody therapy: a possible vaccine against tumors of neuroectodermal origin? *J Immunol* [Internet]. 2006 Aug 15;177(4):2728 LP – 2729. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/177/4/2728.2.abstract>
129. Merchant MS, Wright M, Baird K, Wexler LH, Rodriguez-Galindo C, Bernstein D, et al. Phase I Clinical Trial of Ipilimumab in Pediatric Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res. United States*; 2016 Mar;22(6):1364–70.
130. Krishnadas DK, Shapiro T, Lucas K. Complete remission following decitabine/dendritic cell vaccine for relapsed neuroblastoma. *Pediatrics. United States*; 2013 Jan;131(1):e336–41.
131. Kanold J, Paillard C, Tchirkov A, Lang P, Kelly A, Halle P, et al. NK cell immunotherapy for high-risk neuroblastoma relapse after haploidentical HSCT. *Pediatr Blood Cancer. United States*; 2012 Oct;59(4):739–42.
132. Hale GA, Arora M, Ahn KW, He W, Camitta B, Bishop MR, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for neuroblastoma: the CIBMTR experience. *Bone Marrow Transplant. England*; 2013 Aug;48(8):1056–64.
133. Khan O, La Thangue NB. HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol. England*; 2012 Jan;90(1):85–94.
134. Bolden JE, Shi W, Jankowski K, Kan C-Y, Cluse L, Martin BP, et al. HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses. *Cell Death Dis. England*; 2013 Feb;4:e519.
135. Nalabothula N, Carrier F. Cancer cells' epigenetic composition and predisposition to histone deacetylase inhibitor sensitization. *Epigenomics. England*; 2011 Apr;3(2):145–55.
136. Mühlethaler-Mottet A, Meier R, Flahaut M, Bourlout KB, Nardou K, Joseph J-M, et al. Complex molecular mechanisms cooperate to mediate histone deacetylase inhibitors anti-tumour activity in neuroblastoma cells. *Mol Cancer* [Internet]. *BioMed Central*; 2008 Jun 12;7:55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2442609/>
137. Condorelli F, Gnemmi I, Vallario A, Genazzani AA, Canonico PL. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol. England*; 2008 Feb;153(4):657–68.
138. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature. England*; 1999 Sep;401(6749):188–93.
139. Bose P, Dai Y, Grant S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014 Sep 24;143(3):323–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4117710/>
140. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med. United States*; 1985 Oct;313(18):1111–6.
141. Jacobs JFM, van Bokhoven H, van Leeuwen FN, Hulsbergen-van de Kaa CA, de Vries IJM, Adema GJ, et al. Regulation of MYCN expression in human neuroblastoma cells. *BMC Cancer. England*; 2009 Jul;9:239.
142. Teitz T, Stanke JJ, Federico S, Bradley CL, Brennan R, Zhang J, et al. Preclinical models for neuroblastoma: establishing a baseline for treatment. *PLoS One. United States*; 2011 Apr;6(4):e19133.
143. Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* [Internet]. 1997 Jun 2;16(11):2985–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169917/>

144. Kroesen M, Nierkens S, Ansems M, Wassink M, Orentas RJ, Boon L, et al. A transplantable TH-MYCN transgenic tumor model in C57Bl/6 mice for preclinical immunological studies in neuroblastoma. *Int J cancer*. United States; 2014 Mar;134(6):1335–45.
145. Lodrini M, Oehme I, Schroeder C, Milde T, Schier MC, Kopp-Schneider A, et al. MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* [Internet]. Oxford University Press; 2013 Jul 26;41(12):6018–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3695529/>
146. Liu T, Tee AEL, Porro A, Smith SA, Dwarde T, Liu PY, et al. Activation of tissue transglutaminase transcription by histone deacetylase inhibition as a therapeutic approach for Myc oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2007 Nov;104(47):18682–7.
147. Kroesen M, Bull C, Gielen PR, Brok IC, Armandari I, Wassink M, et al. Anti-GD2 mAb and Vorinostat synergize in the treatment of neuroblastoma. *Oncoimmunology*. United States; 2016 Jun;5(6):e1164919.
148. Hahn CK, Ross KN, Warrington IM, Mazitschek R, Kanegai CM, Wright RD, et al. Expression-based screening identifies the combination of histone deacetylase inhibitors and retinoids for neuroblastoma differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2008 Jul;105(28):9751–6.
149. Fouladi M, Park JR, Stewart CF, Gilbertson RJ, Schaiquevich P, Sun J, et al. Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of vorinostat: a Children's Oncology Group phase I consortium report. *J Clin Oncol*. United States; 2010 Aug;28(22):3623–9.
150. Bridle BW, Chen L, Lemay CG, Diallo J-S, Pol J, Nguyen A, et al. HDAC inhibition suppresses primary immune responses, enhances secondary immune responses, and abrogates autoimmunity during tumor immunotherapy. *Mol Ther*. United States; 2013 Apr;21(4):887–94.
151. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. United States; 1994 Mar;263(5151):1281–4.
152. Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, et al. Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system. *Oncogene* [Internet]. Macmillan Publishers Limited; 1997 Jan 27;14:439. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1200849>
153. Mossè YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as the Major Familial Neuroblastoma Predisposition Gene. *Nature* [Internet]. 2008 Oct 16;455(7215):930–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672043/>
154. Lee CC, Jia Y, Li N, Sun X, Ng K, Ambing E, et al. Crystal structure of the ALK (anaplastic lymphoma kinase) catalytic domain. *Biochem J*. England; 2010 Sep;430(3):425–37.
155. Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell*. United States; 2014 Nov;26(5):682–94.
156. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. England; 2008 Oct;455(7215):930–5.
157. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, et al. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clin Cancer Res*. United States; 2010 Sep;16(17):4353–62.
158. Trigg RM, Turner SD. ALK in Neuroblastoma: Biological and Therapeutic Implications. *Cancers* (Basel). Switzerland; 2018 Apr;10(4).
159. Miyake I, Hakomori Y, Shinohara A, Gamou T, Saito M, Iwamatsu A, et al. Activation of anaplastic lymphoma kinase is responsible for hyperphosphorylation of ShcC in neuroblastoma cell lines. *Oncogene*. England; 2002 Aug;21(38):5823–34.

160. Galkin A V, Melnick JS, Kim S, Hood TL, Li N, Li L, et al. Identification of NVP-TAE684, a potent, selective, and efficacious inhibitor of NPM-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 2007 Jan;104(1):270–5.
161. Heukamp LC, Thor T, Schramm A, De Preter K, Kumps C, De Wilde B, et al. Targeted Expression of Mutated ALK Induces Neuroblastoma in Transgenic Mice. *Sci Transl Med [Internet]*. 2012 Jul 4;4(141):141ra91 LP – 141ra91. Available from: <http://stm.sciencemag.org/content/4/141/141ra91.abstract>
162. Lamant L, Pulford K, Bischof D, Morris SW, Mason DY, Delsol G, et al. Expression of the ALK Tyrosine Kinase Gene in Neuroblastoma. *Am J Pathol [Internet]*. 2000;156(5):1711–21. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010650420>
163. McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, Shioda T, Classon M, Maheswaran S, et al. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer Res. United States*; 2008 May;68(9):3389–95.
164. Moore NF, Azarova AM, Bhatnagar N, Ross KN, Drake LE, Frumm S, et al. Molecular rationale for the use of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors in combination with crizotinib in ALK-mutated neuroblastoma. *Oncotarget. United States*; 2014 Sep;5(18):8737–49.
165. Umapathy G, El Wakil 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. United States*; 2014 Oct;7(349):ra102.
166. Carpenter EL, Haglund EA, Mace EM, Deng D, Martinez D, Wood AC, et al. Antibody targeting of anaplastic lymphoma kinase induces cytotoxicity of human neuroblastoma. *Oncogene. England*; 2012 Nov;31(46):4859–67.
167. Krytska K, Ryles HT, Sano R, Raman P, Infarinato NR, Hansel TD, et al. Crizotinib Synergizes with Chemotherapy in Preclinical Models of Neuroblastoma. *Clin Cancer Res. United States*; 2016 Feb;22(4):948–60.
168. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med. United States*; 2014 Dec;371(23):2167–77.
169. Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn M-J, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med. United States*; 2013 Jun;368(25):2385–94.
170. Lovly CM, McDonald NT, Chen H, Ortiz-Cuaran S, Heukamp LC, Yan Y, et al. Rationale for co-targeting IGF-1R and ALK in ALK fusion-positive lung cancer. *Nat Med. United States*; 2014 Sep;20(9):1027–34.
171. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov. United States*; 2016 Oct;6(10):1118–33.
172. Shaw AT, Kim D-W, Mehra R, Tan DSW, Felip E, Chow LQM, et al. Ceritinib in ALK-Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med [Internet]*. Massachusetts Medical Society; 2014 Mar 26;370(13):1189–97. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311107>
173. 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 [Internet]*. 2013;14(6):472–80. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204513700950>
174. Sasaki T, Okuda K, Zheng W, Butrynski J, Capelletti M, Wang L, et al. The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res. United States*; 2010 Dec;70(24):10038–43.

175. Friboulet L, Li N, Katayama R, Lee CC, Gainor JF, Crystal AS, et al. The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov*. United States; 2014 Jun;4(6):662–73.
176. Georger B, Schulte J, Zwaan CM, Casanova M, Fischer M, Moreno L, et al. Phase I study of ceritinib in pediatric patients (Pts) with malignancies harboring a genetic alteration in ALK (ALK+): Safety, pharmacokinetic (PK), and efficacy results. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2015 May 20;33(15_suppl):10005. Available from: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2015.33.15_suppl.10005
177. Ceritinib Gains FDA Approval for Lung Cancer. *Cancer Discov* [Internet]. 2014 Jul 1;4(7):753 LP – 754. Available from: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/content/4/7/753.2.abstract>
178. Kim D-W, Mehra R, Tan DSW, Felip E, Chow LQM, Camidge DR, et al. Activity and safety of ceritinib in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol*. England; 2016 Apr;17(4):452–63.
179. Wood AC, Krytska K, Ryles HT, Infarinato NR, Sano R, Hansel TD, et al. Dual ALK and CDK4/6 Inhibition Demonstrates Synergy against Neuroblastoma. *Clin Cancer Res*. United States; 2017 Jun;23(11):2856–68.
180. Debruyne DN, Bhatnagar N, Sharma B, Luther W, Moore NF, Cheung N-K, et al. ALK inhibitor resistance in ALK(F1174L)-driven neuroblastoma is associated with AXL activation and induction of EMT. *Oncogene*. England; 2016 Jul;35(28):3681–91.
181. Xu F, Li H, Sun Y. Inhibition of Axl improves the targeted therapy against ALK-mutated neuroblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*. United States; 2014 Nov;454(4):566–71.
182. Wang HQ, Halilovic E, Li X, Liang J, Cao Y, Rakiec DP, et al. Combined ALK and MDM2 inhibition increases antitumor activity and overcomes resistance in human ALK mutant neuroblastoma cell lines and xenograft models. *Elife*. England; 2017 Apr;6.
183. Ignatius Ou S-H, Azada M, Hsiang DJ, Herman JM, Kain TS, Siwak-Tapp C, et al. Next-generation sequencing reveals a Novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. *J Thorac Oncol*. United States; 2014 Apr;9(4):549–53.
184. Huang W-S, Liu S, Zou D, Thomas M, Wang Y, Zhou T, et al. Discovery of Brigatinib (AP26113), a Phosphine Oxide-Containing, Potent, Orally Active Inhibitor of Anaplastic Lymphoma Kinase. *J Med Chem*. United States; 2016 May;59(10):4948–64.
185. Lu J, Guan S, Zhao Y, Yu Y, Woodfield SE, Zhang H, et al. The second-generation ALK inhibitor alectinib effectively induces apoptosis in human neuroblastoma cells and inhibits tumor growth in a TH-MYCN transgenic neuroblastoma mouse model. *Cancer Lett*. Ireland; 2017 Aug;400:61–8.
186. Sakamoto H, Tsukaguchi T, Hiroshima S, Kodama T, Kobayashi T, Fukami TA, et al. CH5424802, a selective ALK inhibitor capable of blocking the resistant gatekeeper mutant. *Cancer Cell*. United States; 2011 May;19(5):679–90.
187. Siaw JT, Wan H, Pfeifer K, Rivera VM, Guan J, Palmer RH, et al. Brigatinib, an anaplastic lymphoma kinase inhibitor, abrogates activity and growth in ALK-positive neuroblastoma cells, *Drosophila* and mice. *Oncotarget*. United States; 2016 May;7(20):29011–22.
188. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society; 2017 Jun 6;377(9):829–38. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704795>
189. Johnson TW, Richardson PF, Bailey S, Brooun A, Burke BJ, Collins MR, et al. Discovery of (10R)-7-amino-12-fluoro-2,10,16-trimethyl-15-oxo-10,15,16,17-tetrahydro-2H-8,4-(m etheno)pyrazolo[4,3-h][2,5,11]-benzoxadiazacyclotetradecine-3-carbonitrile (PF-06463922), a

- macrocyclic inhibitor of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and c-ros . *J Med Chem. United States*; 2014 Jun;57(11):4720–44.
190. Zou HY, Friboulet L, Kodack DP, Engstrom LD, Li Q, West M, et al. PF-06463922, an ALK/ROS1 Inhibitor, Overcomes Resistance to First and Second Generation ALK Inhibitors in Preclinical Models. *Cancer Cell. United States*; 2015 Jul;28(1):70–81.
 191. Infarinato NR, Park JH, Krytska K, Ryles HT, Sano R, Szigety KM, et al. The ALK/ROS1 Inhibitor PF-06463922 Overcomes Primary Resistance to Crizotinib in ALK-Driven Neuroblastoma. *Cancer Discov. United States*; 2016 Jan;6(1):96–107.
 192. Lovly CM, Heuckmann JM, de Stanchina E, Chen H, Thomas RK, Liang C, et al. Insights into ALK-driven cancers revealed through development of novel ALK tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Res. United States*; 2011 Jul;71(14):4920–31.
 193. Horn L, Infante JR, Reckamp KL, Blumenschein GR, Leal TA, Waqar SN, et al. Ensartinib (X-396) in ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer: Results from a First-in-Human Phase I/II, Multicenter Study. *Clin Cancer Res. United States*; 2018 Jun;24(12):2771–9.
 194. Allen CE, Laetsch TW, Mody R, Irwin MS, Lim MS, Adamson PC, et al. Target and Agent Prioritization for the Children’s Oncology Group-National Cancer Institute Pediatric MATCH Trial. *J Natl Cancer Inst. United States*; 2017 May;109(5).
 195. Basit S, Ashraf Z, Lee K, Latif M. First macrocyclic 3rd-generation ALK inhibitor for treatment of ALK/ROS1 cancer: Clinical and designing strategy update of lorlatinib. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2017;134:348–56. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523417302878>
 196. Lee J, Kim HC, Hong JY, Wang K, Kim SY, Jang J, et al. Detection of novel and potentially actionable anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in colorectal adenocarcinoma by immunohistochemistry screening. *Oncotarget. United States*; 2015 Sep;6(27):24320–32.
 197. Aveic S, Pantile M, Seydel A, Esposito MR, Zanon C, Li G, et al. Combating autophagy is a strategy to increase cytotoxic effects of novel ALK inhibitor entrectinib in neuroblastoma cells. *Oncotarget. United States*; 2016 Feb;7(5):5646–63.
 198. Balint E E, Vousden KH. Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer. England*; 2001 Dec;85(12):1813–23.
 199. Soussi T, Asselain B, Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, et al. Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection. *Clin Cancer Res. United States*; 2006 Jan;12(1):62–9.
 200. Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer [Internet]*. Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.; 2014 Apr 17;14:359. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3711>
 201. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res. England*; 1998 Aug;26(15):3453–9.
 202. Slack A, Chen Z, Tonelli R, Pule M, Hunt L, Pession A, et al. The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A. United States*; 2005 Jan;102(3):731–6.
 203. Tweddle DA, Malcolm AJ, Cole M, Pearson AD, Lunec J. p53 cellular localization and function in neuroblastoma: evidence for defective G(1) arrest despite WAF1 induction in MYCN-amplified cells. *Am J Pathol. United States*; 2001 Jun;158(6):2067–77.
 204. Vogan K, Bernstein M, Leclerc JM, Brisson L, Brossard J, Brodeur GM, et al. Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res. United States*; 1993 Nov;53(21):5269–73.
 205. Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes*

- Dev. United States; 1993 Jul;7(7A):1126–32.
206. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. England; 2005 Apr;24(17):2899–908.
 207. Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med [Internet]*. 2007;13(1):23–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491406002590>
 208. Alkhalaf M, Ganguli G, Messaddeq N, Le Meur M, Wasyluk B. MDM2 overexpression generates a skin phenotype in both wild type and p53 null mice. *Oncogene*. England; 1999 Feb;18(7):1419–34.
 209. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*. United States; 2000;77:81–137.
 210. Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer*. England; 2006 Sep;6(9):663–73.
 211. Chène P. Inhibiting the p53–MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer [Internet]*. Nature Publishing Group; 2003 Feb 1;3:102. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc991>
 212. Corvi R, Savelyeva L, Breit S, Wenzel A, Handgretinger R, Barak J, et al. Non-syntenic amplification of MDM2 and MYCN in human neuroblastoma. *Oncogene*. England; 1995 Mar;10(6):1081–6.
 213. Corvi R, Savelyeva L, Amler L, Handgretinger R, Schwab M. Cytogenetic evolution of MYCN and MDM2 amplification in the neuroblastoma LS tumour and its cell line. *Eur J Cancer*. England; 1995;31A(4):520–3.
 214. Lu W, Pochampally R, Chen L, Traidej M, Wang Y, Chen J. Nuclear exclusion of p53 in a subset of tumors requires MDM2 function. *Oncogene*. England; 2000 Jan;19(2):232–40.
 215. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. United States; 2004 Feb;303(5659):844–8.
 216. Van Maerken T, Ferdinande L, Taildeman J, Lambertz I, Yigit N, Vercruysse L, et al. Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *J Natl Cancer Inst*. United States; 2009 Nov;101(22):1562–74.
 217. Van Maerken T, Speleman F, Vermeulen J, Lambertz I, De Clercq S, De Smet E, et al. Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma. *Cancer Res*. United States; 2006 Oct;66(19):9646–55.
 218. Van Maerken T. Selective inhibition of the p53–MDM2 interaction by nutlin drugs: a new therapeutic perspective for neuroblastoma. *P Belg Roy Acad Med*. 2013;Vol. 2:198.
 219. Van Maerken T, Rihani A, Dreidax D, De Clercq S, Yigit N, Marine J-C, et al. Functional analysis of the p53 pathway in neuroblastoma cells using the small-molecule MDM2 antagonist nutlin-3. *Mol Cancer Ther*. United States; 2011 Jun;10(6):983–93.
 220. Tovar C, Graves B, Packman K, Filipovic Z, Higgins B, Xia M, et al. MDM2 small-molecule antagonist RG7112 activates p53 signaling and regresses human tumors in preclinical cancer models. *Cancer Res*. United States; 2013 Apr;73(8):2587–97.
 221. Vu B, Wovkulich P, Pizzolato G, Lovey A, Ding Q, Jiang N, et al. Discovery of RG7112: A Small-Molecule MDM2 Inhibitor in Clinical Development. *ACS Med Chem Lett*. United States; 2013 May;4(5):466–9.
 222. Andreeff M, Kelly KR, Yee K, Assouline S, Strair R, Popplewell L, et al. Results of the Phase 1 Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist, in Acute Leukemia. *Blood [Internet]*. 2012 Nov 16;120(21):675 LP – 675. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/120/21/675.abstract>

223. Kurzrock R, Blay J-Y, Bui Nguyen B, Wagner AJ, Maki RG, Schwartz GK, et al. A phase I study of MDM2 antagonist RG7112 in patients (pts) with relapsed/refractory solid tumors. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2012 May 20;30(15_suppl):e13600–e13600. Available from: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2012.30.15_suppl.e13600
224. Beryozkina A, Nichols GL, Reckner M, Vassilev LT, Rueger R, Jukofsky L, et al. Pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) of RG7112, an oral murine double minute 2 (MDM2) antagonist, in patients with leukemias and solid tumors. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2011 May 20;29(15_suppl):3039. Available from: https://doi.org/10.1200/jco.2011.29.15_suppl.3039
225. Ding Q, Zhang Z, Liu J-J, Jiang N, Zhang J, Ross TM, et al. Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem*. United States; 2013 Jul;56(14):5979–83.
226. Marine J-C, Jochemsen AG. Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun*. United States; 2005 Jun;331(3):750–60.
227. Xia M, Knezevic D, Tovar C, Huang B, Heimbrook DC, Vassilev LT. Elevated MDM2 boosts the apoptotic activity of p53-MDM2 binding inhibitors by facilitating MDMX degradation. *Cell Cycle* [Internet]. Taylor & Francis; 2008 Jun 1;7(11):1604–12. Available from: <https://doi.org/10.4161/cc.7.11.5929>
228. Wade M, Wang Y V, Wahl GM. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol*. England; 2010 May;20(5):299–309.
229. Shen H, Moran DM, Maki CG. Transient nutlin-3a treatment promotes endoreduplication and the generation of therapy-resistant tetraploid cells. *Cancer Res*. United States; 2008 Oct;68(20):8260–8.
230. Michaelis M, Rothweiler F, Barth S, Cinatl J, van Rikxoort M, Loschmann N, et al. Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells. *Cell Death Dis*. England; 2011 Dec;2:e243.
231. Jones RJ, Bjorklund CC, Baladandayuthapani V, Kuhn DJ, Orlowski RZ. Drug resistance to inhibitors of the human double minute-2 E3 ligase is mediated by point mutations of p53, but can be overcome with the p53 targeting agent RITA. *Mol Cancer Ther*. United States; 2012 Oct;11(10):2243–53.
232. Michaelis M, Rothweiler F, Agha B, Barth S, Voges Y, Loschmann N, et al. Human neuroblastoma cells with acquired resistance to the p53 activator RITA retain functional p53 and sensitivity to other p53 activating agents. *Cell Death Dis*. England; 2012 Apr;3:e294.
233. Chen L, Tweddle DA. p53, SKP2, and DKK3 as MYCN Target Genes and Their Potential Therapeutic Significance. *Front Oncol*. Switzerland; 2012;2:173.
234. Shangary S, Qin D, McEachern D, Liu M, Miller RS, Qiu S, et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. United States; 2008 Mar;105(10):3933–8.
235. Buolamwini JK, Addo J, Kamath S, Patil S, Mason D, Ores M. Small molecule antagonists of the MDM2 oncoprotein as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets*. Netherlands; 2005 Feb;5(1):57–68.
236. Issaenko OA, Amerik AY. Chalcone-based small-molecule inhibitors attenuate malignant phenotype via targeting deubiquitinating enzymes. *Cell Cycle*. United States; 2012 May;11(9):1804–17.
237. Grasberger BL, Lu T, Schubert C, Parks DJ, Carver TE, Koblisch HK, et al. Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione MDM2 antagonists that activate p53 in cells. *J Med Chem*. United States; 2005 Feb;48(4):909–12.
238. Allen JG, Bourbeau MP, Wohlhieter GE, Bartberger MD, Michelsen K, Hungate R, et al. Discovery and optimization of chromenotriazolopyrimidines as potent inhibitors of the mouse

- double minute 2-tumor protein 53 protein-protein interaction. *J Med Chem. United States*; 2009 Nov;52(22):7044–53.
239. Miyazaki M, Kawato H, Naito H, Ikeda M, Miyazaki M, Kitagawa M, et al. Discovery of novel dihydroimidazothiazole derivatives as p53–MDM2 protein–protein interaction inhibitors: Synthesis, biological evaluation and structure–activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett [Internet]*. 2012;22(20):6338–42. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X12010979>
240. Michelsen K, Jordan JB, Lewis J, Long AM, Yang E, Rew Y, et al. Ordering of the N-terminus of human MDM2 by small molecule inhibitors. *J Am Chem Soc. United States*; 2012 Oct;134(41):17059–67.
241. Gonzalez-Lopez de Turiso F, Sun D, Rew Y, Bartberger MD, Beck HP, Canon J, et al. Rational Design and Binding Mode Duality of MDM2–p53 Inhibitors. *J Med Chem [Internet]*. American Chemical Society; 2013 May 23;56(10):4053–70. Available from: <https://doi.org/10.1021/jm400293z>
242. Barbieri E, Mehta P, Chen Z, Zhang L, Slack A, Berg S, et al. MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol Cancer Ther. United States*; 2006 Sep;5(9):2358–65.
243. Cao C, Shinohara ET, Subhawong TK, Geng L, Kim KW, Albert JM, et al. Radiosensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. *Mol Cancer Ther. United States*; 2006 Feb;5(2):411–7.
244. Kojima K, Konopleva M, McQueen T, O'Brien S, Plunkett W, Andreeff M. Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood. United States*; 2006 Aug;108(3):993–1000.
245. Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, Schwartz GK. Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene. England*; 2007 May;26(24):3473–81.
246. Graat HCA, Carette JE, Schagen FHE, Vassilev LT, Gerritsen WR, Kaspers GJL, et al. Enhanced tumor cell kill by combined treatment with a small-molecule antagonist of mouse double minute 2 and adenoviruses encoding p53. *Mol Cancer Ther. United States*; 2007 May;6(5):1552–61.
247. Secchiero P, Zerbinati C, di lasio MG, Melloni E, Tiribelli M, Grill V, et al. Synergistic cytotoxic activity of recombinant TRAIL plus the non-genotoxic activator of the p53 pathway nutlin-3 in acute myeloid leukemia cells. *Curr Drug Metab. Netherlands*; 2007 May;8(4):395–403.
248. Cheok CF, Dey A, Lane DP. Cyclin-dependent kinase inhibitors sensitize tumor cells to nutlin-induced apoptosis: a potent drug combination. *Mol Cancer Res. United States*; 2007 Nov;5(11):1133–45.
249. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer. England*; 2009 Mar;9(3):153–66.
250. Weintraub SJ, Chow KNB, Luo RX, Zhang SH, He S, Dean DC. Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature [Internet]*. Nature Publishing Group; 1995 Jun 29;375:812. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/375812a0>
251. Kato J, Matsushima H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev. United States*; 1993 Mar;7(3):331–42.
252. Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev. United States*; 1998 Aug;12(15):2245–62.
253. Hiebert SW, Chellappan SP, Horowitz JM, Nevins JR. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev. United States*; 1992

- Feb;6(2):177–85.
254. DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol.* United States; 1995 Aug;15(8):4215–24.
 255. Sánchez-Martínez C, Gelbert LM, Lallena MJ, de Dios A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2015;25(17):3420–35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X15005843>
 256. Shapiro GI. Cyclin-Dependent Kinase Pathways As Targets for Cancer Treatment. *J Clin Oncol* [Internet]. American Society of Clinical Oncology; 2006 Apr 20;24(11):1770–83. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.7689>
 257. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2002;1602(1):73–87. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304419X02000379>
 258. Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, et al. Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res.* United States; 1995 Dec;55(24):6200–9.
 259. Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* Netherlands; 1998 Oct;1378(2):F115–77.
 260. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* United States; 2012 May;2(5):401–4.
 261. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* United States; 1998 Nov;12(22):3499–511.
 262. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* [Internet]. Nature Publishing Group; 2007 May 14;26:3291. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>
 263. Wellmann A, Doseeva V, Butscher W, Raffeld M, Fukushima P, Stetler-Stevenson M, et al. The activated anaplastic lymphoma kinase increases cellular proliferation and oncogene up-regulation in rat 1a fibroblasts. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* United States; 1997 Oct;11(12):965–72.
 264. Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJM, Versteeg R, et al. Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res.* United States; 2008 Apr;68(8):2599–609.
 265. Molenaar JJ, Koster J, Ebus ME, van Sluis P, Westerhout EM, de Preter K, et al. Copy number defects of G1-cell cycle genes in neuroblastoma are frequent and correlate with high expression of E2F target genes and a poor prognosis. *Genes Chromosomes Cancer.* United States; 2012 Jan;51(1):10–9.
 266. Dickson MA, Schwartz GK. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol.* Canada; 2009 Mar;16(2):36–43.
 267. VanderWel SN, Harvey PJ, McNamara DJ, Repine JT, Keller PR, Quin J 3rd, et al. Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *J Med Chem.* United States; 2005 Apr;48(7):2371–87.
 268. Toogood PL, Harvey PJ, Repine JT, Sheehan DJ, VanderWel SN, Zhou H, et al. Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J Med Chem.* United States; 2005 Apr;48(7):2388–406.
 269. Beaver JA, Amiri-Kordestani L, Charlab R, Chen W, Palmby T, Tilley A, et al. FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive,

- HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res. United States*; 2015 Nov;21(21):4760–6.
270. Finn RS, Crown JP, Lang I, Boer K, Bondarenko IM, Kulyk SO, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol. England*; 2015 Jan;16(1):25–35.
 271. Gelbert LM, Cai S, Lin X, Sanchez-Martinez C, del Prado M, Lallena MJ, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs [Internet]*. 2014;32(5):825–37. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10637-014-0120-7>
 272. Sosman JA, Kittaneh M, Lolkema MPJK, Postow MA, Schwartz G, Franklin C, et al. A phase 1b/2 study of LEE011 in combination with binimetinib (MEK162) in patients with NRAS-mutant melanoma: Early encouraging clinical activity. *J Clin Oncol [Internet]*. American Society of Clinical Oncology; 2014 May 20;32(15_suppl):9009. Available from: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.9009
 273. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap Y-S, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med [Internet]*. Massachusetts Medical Society; 2016 Oct 7;375(18):1738–48. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609709>
 274. Zhang Y-X, Sicinska E, Czaplinski JT, Remillard SP, Moss S, Wang Y, et al. Antiproliferative effects of CDK4/6 inhibition in CDK4-amplified human liposarcoma in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther. United States*; 2014 Sep;13(9):2184–93.
 275. Rader J, Russell MR, Hart LS, Nakazawa MS, Belcastro LT, Martinez D, et al. Dual CDK4/CDK6 inhibition induces cell-cycle arrest and senescence in neuroblastoma. *Clin Cancer Res. United States*; 2013 Nov;19(22):6173–82.
 276. Kim S, Loo A, Chopra R, Caponigro G, Huang A, Vora S, et al. Abstract PR02: LEE011: An orally bioavailable, selective small molecule inhibitor of CDK4/6– Reactivating Rb in cancer. *Mol Cancer Ther [Internet]*. 2013 Nov 1;12(11 Supplement):PR02 LP – PR02. Available from: http://mct.aacrjournals.org/content/12/11_Supplement/PR02.abstract
 277. Georger B, Bourdeaut F, DuBois SG, Fischer M, Geller JI, Gottardo NG, et al. A Phase I Study of the CDK4/6 Inhibitor Ribociclib (LEE011) in Pediatric Patients with Malignant Rhabdoid Tumors, Neuroblastoma, and Other Solid Tumors. *Clin Cancer Res. United States*; 2017 May;23(10):2433–41.
 278. Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade MA, Trachet E, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther [Internet]*. 2004;3(11):1427–37. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-9444228344&partnerID=40&md5=e9a445a51a4f899b8559b3596364a89a>
 279. Bozhenko VK, Kulinich TM, Kudinova EA, Boldyrev A, Solodkij VA. New targeted anti CDK4/6 peptide MM-D37K. *J Clin Oncol [Internet]*. American Society of Clinical Oncology; 2013 May 20;31(15_suppl):e13545–e13545. Available from: http://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/jco.2013.31.15_suppl.e13545
 280. Mariaule G, Belmont P. Cyclin-dependent kinase inhibitors as marketed anticancer drugs: where are we now? A short survey. *Molecules. Switzerland*; 2014 Sep;19(9):14366–82.
 281. Tadesse S, Yu M, Kumarasiri M, Le BT, Wang S. Targeting CDK6 in Cancer: State of the Art and New Insights. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 2015.