

Hanna Kosela, Tomasz Świtaj, Piotr Rutkowski

Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

# Zastosowanie inhibitorów BRAF i MEK w terapii zaawansowanego czerniaka

BRAF and MEK inhibitors in therapy of advanced melanoma

## Adres do korespondencji:

Lek. Hanna Kosela  
 Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich,  
 Kości i Czerniaków  
 Centrum Onkologii — Instytut  
 im. Marii Skłodowskiej-Curie  
 ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa  
 Tel.: +48 (22) 643 93 75  
 Faks: +48 (22) 643 97 91  
 e-mail: hanna.kosela@gmail.com

## STRESZCZENIE

Czerniak w 4. stopniu zaawansowania jest nowotworem o bardzo złym rokowaniu. Dotychczasowe leczenie za pomocą klasycznej chemioterapii nie wykazało wpływu na całkowite przeżycie. Ostatnie lata badań i coraz lepsze poznanie szlaków odpowiedzialnych za rozwój choroby zaowocowały odkryciami nowych leków z dziedziny terapii ukierunkowanej molekularnie i immunoterapii dających nadzieje na poprawę wyników leczenia. Podstawą badań molekularnych było odkrycie u ponad połowy chorych na czerniaka obecności mutacji *BRAF*, będącej składową szlaku sygnałowego kinaz MAPK — kontrolującego rozwój komórek nowotworu. Mutacja ta wiąże się z charakterystycznym obrazem kliniczno-patologicznym oraz z bardziej agresywnym przebiegiem choroby na etapie rozsiewu. Początkowo białko BRAF próbowano blokować za pomocą wielokinazowego inhibitora sorafenibu, nie uzyskano jednak spodziewanych efektów. Badania nad bardziej selektywnymi inhibitorami BRAF wykazały dużą skuteczność terapii przy możliwych do przyjęcia działaniach niepożądanych w grupie chorych na czerniaki z potwierdzoną mutacją i były podstawą do zarejestrowania jednego z inhibitorów kinaz na rynku farmaceutycznym w Stanach Zjednoczonych. Wyzwaniem w terapii inhibitorami BRAF stanowi stosunkowo szybko występująca oporność na leczenie, odpowiedzialna za krótki czas trwania odpowiedzi. Rozwiązaniem może okazać się zastosowanie kombinacji lekowych, między innymi z inhibitorami MEK, blokujących kolejne ogniwo szlaku MAPK. W badaniach nie wykazano ich dużej skuteczności w terapii czerniaka, ale ich zastosowanie może okazać się bardzo pomocne przy przełamywaniu oporności na leczenie inhibitorami BRAF.

**Słowa kluczowe:** czerniak leczenie ukierunkowane molekularnie, inhibitory, BRAF, MEK

## ABSTRACT

Metastatic melanoma is a highly lethal malignancy. Standard treatment modalities didn't have any impact on overall survival. Recent studies and improvement in recognition of mechanisms responsible for tumor progression resulted in introduction of new therapeutic modalities such as immunotherapy or drugs molecularly targeted. Support for the molecular studies was the discovery that more than a half of melanoma patients carry a mutation in gene encoding *BRAF*, which is a component of MAPK pathway responsible for cancer development. This mutation is associated with a specific clinic-pathological features and a more aggressive behavior in stage 4 disease. First attempts to block BRAF, with the use of multi-kinase inhibitor sorafenib, was a failure. Studies on more specific BRAF inhibitors showed high effectiveness with acceptable side effects in patients with confirmed BRAF mutation. They were the basis for registration of one of the drugs in USA. Challenging in BRAF therapy is quite rapidly occurring resistance to treatment, that is responsible for the short time to progression in patients that initially have benefit from the treatment. One of the solutions to the problem can be using MEK inhibitors, that block another step in the MAPK pathway. They didn't show high efficiency in melanoma therapy, but possibly they will be very helpful in overcoming resistance to BRAF inhibitors.

**Key words:** melanoma, targeted therapy, inhibitors. BRAF, MEK

Onkol. Prak. Klin. 2011; 7, 5: 246–253

## Wstęp

Czerniak jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z melanocytów. Częstość zachorowania na czerniaka w populacji światowej i polskiej stale rośnie, a śmiertelność w grupie chorych na zaawansowaną postać choroby jest nadal bardzo wysoka [1, 2]. Choć czerniak stanowi tylko 4% wszystkich nowotworów złośliwych skóry, to jest odpowiedzialny za 80% zgonów z powodu złośliwych nowotworów dermatologicznych [3]. Wiele lat badań nad procesem przekształcania się melanocytów w inwazyjne komórki czerniaka pozwoliły na odkrycie licznych mechanizmów odpowiedzialnych za wzrost i szerzenie się komórek tego nowotworu. W ciągu ostatnich lat pojawiły się nowe możliwości zarówno immunoterapii, jak i terapii celowanej u chorych na czerniaka w 4. stadium zaawansowania, gdzie dotychczasowe standardowe metody leczenia, takie jak chirurgia, radioterapia i chemioterapia, wykazywały ograniczoną skuteczność. Wskaźniki 5-letnich przeżyć wynoszą we wczesnych postaciach czerniaka 60–90% oraz 20–70% i 5–10% w stadium regionalnego zaawansowania i uogólnienia [4].

Średni czas przeżycia chorych w stadium rozsiewu do narządów odległych wynosi 6–10 miesięcy [5]. Chemioterapia wykazuje skuteczność zaledwie u 15–20% chorych — najczęściej stosowanym chemioterapeutycznym jest dakarbazyna — stosowana w monoterapii lub w kombinacjach z innymi lekami. Terapie wielolekowe nie wykazały jednak istotnego wydłużenia całkowitego przeżycia [6–8]. W ostatnich latach nadzieją na przełamanie dotychczasowego impasu okazały się wyniki badań nad ipilimumabem — przeciwciałem monoklonalnym blokującym antygen 4 związany z limfocytami T cytotoksycznymi (CTLA-4) w celu wzmocnienia odpowiedzi przeciwnowotworowej. W sierpniu zeszłego roku opublikowano wyniki badania obejmującego grupę chorych na czerniaka w stadium uogólnienia po progresji na wcześniejszych liniach leczenia. W badaniu tym wykazano wydłużenie mediany czasu przeżycia w grupie chorych otrzymujących lek z 6,4 do 10 miesięcy [9], co w Stanach Zjednoczonych stanowiło podstawę do zarejestrowania leku przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) do terapii zaawansowanego czerniaka w marcu 2011 roku, a w Europie nastąpiło to w lipcu 2011 roku. Długotrwała korzyść z leczenia ipilimumabem jest jednak ograniczona do około 20–25% chorych, zaś kinetyka odpowiedzi na terapię wiąże się z długim okresem czasu, co ogranicza jego zastosowanie do chorych na zaawansowanego czerniaka z minimalnymi objawami i powolnym przebiegiem choroby.

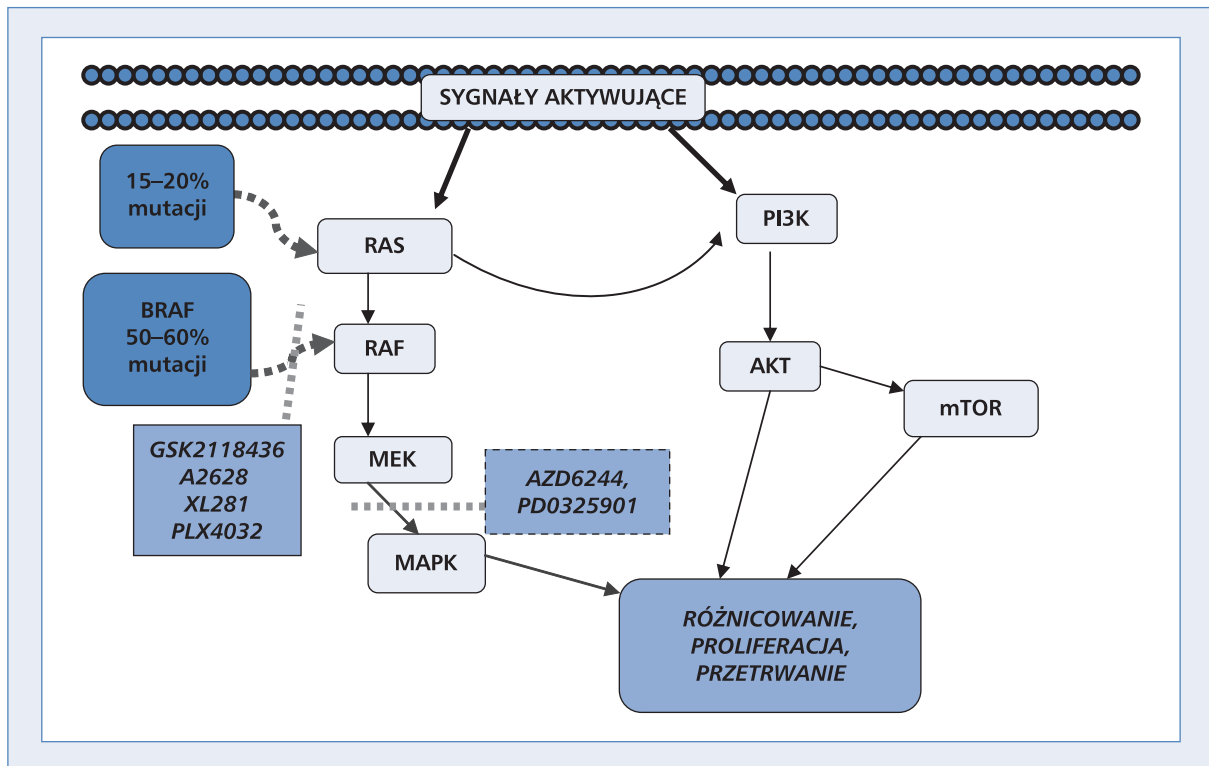
Oprócz immunoterapii uwagę badaczy przykuwa obecnie możliwość zastosowania w leczeniu choroby terapii ukierunkowanej molekularnie. Podstawą do pogłębionych badań w tej dziedzinie jest coraz lepsze zrozumienie patogenezy czerniaka oraz dokładniejsze

opisanie skomplikowanych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój choroby i tworzenie zmian przerzutowych.

## Zaburzenia molekularne w patogenezie czerniaków

Zdefiniowano wiele wydarzeń na poziomie molekularnym towarzyszących transformacji prawidłowych melanocytów do komórek tworzących znamiona łagodne lub do komórek czerniaka [1, 3]. Czerniak jest nowotworem bardzo heterogennym, jego patogeneza po części zależy od mutacji DNA, które prowadzą do aktywacji onkogenów albo inaktywacji genów supresorowych nowotworu, ale także do utraty lub amplifikacji części albo całości chromosomów. Te aberracje genomu prowadzą do zmutowanych profilów kariotypowych, różnych w poszczególnych podtypach czerniaka [10]. Ostatnio lepiej poznano genetyczną różnorodność pomiędzy tymi podtypami oraz zidentyfikowano pewne nawracające w nich mutacje molekularne. Są to między innymi mutacje w onkogenach *NRAS*, *BRAF*, *C-KIT* i *GNAQ* oraz *GNA11*, mutacje w genach supresorowych, takich jak *PTEN*, *P53* i innych [3, 11]. Wydaje się, że niektóre zmiany molekularne są związane z podtypem histologicznym lub lokalizacją ogniska pierwotnego czerniaka [11, 12]. Przykładowo mutacje *C-KIT* znajdują się w 15–20% czerniaków odsiebnych części kończyn (akralno-lentiginalnych) oraz błon śluzowych, zaś rzadko występują w przypadku czerniaków rozwijających się w obrębie skóry przewlekle uszkodzonej przez słońce [8, 11, 13]. Mutacje *GNAQ* i *GNA11* pojawiają się w czerniaku naczyń i są one wzajemnie wykluczające się. Łącznie występują w 80% przypadków tych rzadkich nowotworów. Mutacje w szlaku kinaz MAP występują w około 75% przypadków czerniaka skóry — są to głównie mutacje *NRAS* obserwowane w 15–30% przypadków oraz najczęstsze mutacje w *BRAF* wykrywane w około 60–80% przypadków czerniaka (głównie powstającego w skórze nienarażonej na przewlekle działanie promieni słonecznych). Występowanie tych dwóch mutacji wzajemnie się wyklucza [8, 11].

Szlak sygnałowy kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) zawierający kinazy RAS/RAF/MEK/ERK jest wewnątrzkomórkowym szlakiem przekazującym sygnały mitogenne do jądra komórkowego poprzez serie fosforylacji cząstek tworzących tę ścieżkę. Reguluje on funkcję komórki poprzez kontrolę proliferacji, różnicowania i apoptozy. Zaburzenia tego szlaku prowadzą do ustawicznego, niekontrolowanego pobudzenia jednego z jej elementów, przyczyniając się do nabrania przez uszkodzoną w ten sposób komórkę cech złośliwości. Poszczególne elementy szlaku ostatnio stały się interesującymi celami terapeutycznymi, ponieważ jego regu-



Rycina 1. Szlak sygnałowy kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK); zaznaczono miejsca działania inhibitorów BRAF i MEK

Figure 1. Mitogen activated protein kinase signaling pathway; the activity of BRAF and MEK inhibitors are marked

lacja zaburzona jest w wielu nowotworach złośliwych. Wewnątrzkomórkowa kaskada RAS–RAF–MEK–ERK może być aktywowana w odpowiedzi na wiele bodźców zewnętrznych. Czynniki wzrostu, takie jak naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF, *insulin-like growth factor*) czy transformujący czynnik wzrostu, zapoczątkowują przekazanie sygnału poprzez związanie przez błonowych receptorów umiejscowionych na powierzchni komórki. Stymulacja tych receptorów prowadzi do aktywacji białka RAS, które z kolei przekazuje sygnał do rodziny kinaz serynowo-treoninowych RAF, na którą składają się ARAF, BRAF, CRAF. Każda z tych trzech kinaz może aktywować następny stopień szlaku, jakim są kinazy MEK1/MEK2, kolejnym ogniwem szlaku zaś jest ERK1 albo ERK2, których z kolei celem fosforylacji są białka cytoplazmatyczne, bądź też ERK1/2 przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie działają na czynniki transkrypcyjne regulujące proliferację, różnicowanie i przetrwanie związanych z nimi genów [14–16].

Somatyczne mutacje w BRAF występują w około 7% ludzkich nowotworów złośliwych, mutacje w CRAF są rzadkie, zaś mutacje w ARAF dotąd nie opisano. Taka

różnica w częstości występowania mutacji w poszczególnych kinazach wynika z zupełnie różnych regulacji tych genów kodujących kinazy. BRAF do onkogennej aktywacji wymaga zaledwie jednej substytucji aminokwasów, w przypadku CRAF i ARAF są to dwie mutacje, co jest znacznie rzadziej występującym zjawiskiem [17, 18].

Mutacje w BRAF opisano w ponad 50% czerniaków (częstotliwość ta różni się w zależności od lokalizacji ogniska pierwotnego), 30–70% raków tarczycy, 30% nisko zróżnicowanych surowicznych raków jajnika i 10% raków jelita grubego [18, 19]. BRAF jest najczęściej zmutowanym białkiem w czerniakach. Mutacje BRAF z podobną częstością występują w ognisku pierwotnym i zmianach przerzutowych. Stwierdza się je też w łagodnych znamionach skóry, co sugeruje, że do uzyskania profilu nowotworu złośliwego znamię musi nabyć dodatkowych zmian molekularnych [3, 16]. Na modelach zwierzęcych taką współwystępującą mutacją, prowadzącą razem z mutacją *BRAF* do powstania czerniaka, okazała się mutacja w genie kodującym białko p53 [20]. Opisano też rolę białka p16 (INK4a) w ochronie przed indukowaną mutacją *BRAF* nasiloną proliferacją komórkową, utrata tej ochrony (obserwowana w większości czerniaków) skutkuje rozwinięciem się choroby [3, 21].

Dotychczas opisano występowanie w czerniaku ponad 75 somatycznych mutacji w genie kodującym *BRAF*. W zmutowanym *BRAF* najczęstsza jest mutacja V600E (74–90%) oraz mutacja V600K (16–29%) [22, 23]. Mutacja V600E następuje w egzonie 15. — jest to mutacja zmiany sensu prowadząca do substytucji waliny przez kwas glutaminowy w pozycji 600. Jest to mutacja nabycia funkcji, prowadzi ona do 10,7-krotnie większej aktywności kinazy niż w normalnych komórkach, a w konsekwencji do pobudzenia sygnałów ERK i proliferacji komórki niezależnie od bodźców z zewnątrz [11]. Jedną z hipotez tłumaczących mechanizm niekontrolowanego pobudzenia jest zwiększona ekspozycja segmentu aktywacji na interakcje, gdy mały hydrofobowy aminokwas walina w pozycji 600 zostaje zastąpiony przez aminokwas hydrofilny. W warunkach prawidłowych domena kinazy RAF w konformacji nieaktywnej jest ukryta w swojej hydrofobowej kieszeni [21].

Czerniaki z mutacją w genie kodującym *BRAF* mają charakterystyczny obraz kliniczno-patologiczny. Ich szczególne cechy to:

- młodszy wiek chorego w chwili zachorowania;
- ognisko chorobowe częściej zlokalizowane na skórze tułowia;
- mniej cech uszkodzenia słonecznego w skórze otaczającej ognisko pierwotne (uważa się, że mutacja *BRAF* charakterystyczna jest dla osób, które często ulegały poparzeniom słonecznym w dzieciństwie, nie zaś dla tych, którzy stale narażeni są na szkodliwe działanie promieni słonecznych) [12, 13, 24];
- większa liczba znamion barwnikowych skóry;
- charakterystyczny obraz histopatologiczny — czerniaki guzkowe albo szerzące się powierzchownie.

Nie znaleziono związku pomiędzy obecnością mutacji *BRAF* a grubością ogniska pierwotnego w skali Breslow. Obecność mutacji w genie kodującym *BRAF* nie wiąże się ze skróceniem okresu, jaki mija od czasu zdiagnozowania ogniska pierwotnego do pojawienia się zmian przerzutowych lub nieresekcyjnej postaci choroby, ale w przypadku, gdy już dojdzie do rozsiewu choroby (4. stopień zaawansowania), to czas przeżycia u chorych ze zmutowanym genem *BRAF* jest istotnie krótszy [25].

## Leczenie ukierunkowane inhibitorami BRAF

Rozwój terapii celowanych w onkologii, oparty między innymi na coraz powszechniej stosowanych drobnocząsteczkowych inhibitorach kinaz, a także coraz większa wiedza na temat biologii czerniaka, w tym stwierdzenie występowania u części z nich zmutowanego białka BRAF, skłoniło świat medyczny do poszukiwania leku ukierunkowanego na blokowanie tego procesu.

Pierwszym badanym inhibitorem BRAF był sorafenib (BAY43-9006). Jest to cząstka pierwotnie zaprojektowana jako inhibitor CRAF. Wykazuje ona cechy inhibitora wielokinazowego, blokuje m.in. zarówno BRAF typu dzikiego („wild type”), jaki i zmutowany w V600E BRAF, a także C-KIT, PDGFRA, VEGFR-2 i VEGFR-3 [6, 14, 16]. W badaniach *in vitro* na ludzkich komórkach czerniaka sorafenib prowadził raczej do stabilizacji choroby niż obiektywnych odpowiedzi [22]. Potwierdziły to wyniki późniejszych badań klinicznych. W badaniu II fazy nad skutecznością sorafenibu w monoterapii zaawansowanego czerniaka obejmującym grupę 37 chorych wykazano tylko jedną częściową odpowiedź, zaś u 19% uzyskano stabilizację choroby, mediana czasu wolnego od progresji (PFS, *progression-free survival*) wyniosła 11 tygodni. Odsetek odpowiedzi nie zależał od obecności mutacji w V600E *BRAF* [26]. Inne podwójnie zaślepienie badanie II fazy porównujące skuteczność sorafenibu dodanego do dakarbazyny ze skutecznością dakarbazyny i placebo wykazało niewielkie przedłużenie czasu wolnego od progresji w grupie przyjmującej sorafenib (21,1 tygodnia vs. 11,7 tygodnia w grupie chorych leczonych wyłącznie dakarbazyną), ale bez istotnie statystycznego wydłużenia czasu przeżycia całkowitego [27]. Niepowodzeniem okazało się kolejne badanie, trzeciej fazy, obejmujące grupę chorych na rozsianego czerniaka, porównujące skuteczność dodania sorafenibu do karboplatyny i paklitakselu u chorych, u których nastąpiła progresja po leczeniu dakarbazyną ze skutecznością takiego samego połączenia i placebo. Nie wykazano ani wydłużenia PFS, ani zwiększenia odsetka odpowiedzi w grupie chorych otrzymujących sorafenib, większy za to w tej grupie był odsetek zdarzeń niepożądanych [28]. Badanie to nie potwierdziło wcześniejszych doniesień z badania pierwszej fazy wskazujących na korzyść z takiego połączenia [29]. Mimo że sorafenib nie wykazał swojej skuteczności jako inhibitor BRAF w leczeniu rozsianego czerniaka, to w związku ze swoją skutecznością w blokowaniu CRAF może okazać się skuteczny w przełamywaniu oporności na inhibitory V600E BRAF [11].

Rozczarowanie sorafenibem w zakresie blokowania aktywności białka BRAF nie zatrzymało dalszych badań nad tym szlakiem komórkowym u chorych na czerniaki. Opublikowano wiele wyników badań nad selektywnymi inhibitorami BRAF. Obecnie trwa wiele badań I i II fazy nad drobnocząsteczkowymi inhibitorami zmutowanego *BRAF*, takimi jak RAF265 (Novartis), AZ628 (Astra-Zeneca) czy XL281 (Exelis/Bristol Myers Squibb), które wykazują znacznie większą niż sorafenib swoistość w blokowaniu szlaku MAPK oraz dużą skuteczność przeciwnowotworową w badaniach nad komórkami czerniaka *in vivo* [11, 16, 24, 30]. Dwie spośród badanych substancji weszły do fazy dalszych badań klinicznych w wyselekcjonowanych grupach chorych z potwierdzoną obecnością mutacji *BRAF*, a w przypadku jednej z nich skuteczność



udowodniono w badaniu III fazy, co doprowadziło do jej rejestracji w Stanach Zjednoczonych.

GSK2118436 jest odwracalnym inhibitorem BRAF z mutacją w V600E, V600K, V600D. Wykazuje też pewną aktywność w blokowaniu prawidłowego białka BRAF (bez mutacji) oraz CRAF, potwierdzono jego aktywność przeciw komórkom czerniaka w fazie badań przedklinicznych. Badanie pierwszej fazy nad tym doustnym związkiem przeprowadzono na grupie ponad 60 chorych (w większości z rozpoznaniem czerniaka) [31]. Lek podawano w dawkach od 12 do 400 mg na dobę. Terapia była dobrze tolerowana, wśród działań niepożądanych dominowały w stopniu 1. i 2: nudności/wymioty, zmęczenie, gorączki, bóle głowy oraz wysypki skórne. U 9% leczonych chorych w 2.–14. tygodniu terapii stwierdzono raka płaskonabłonkowego skóry o niskim stopniu złośliwości. Dane farmakodynamiczne wykazały zależność od dawki inhibicję ERK, której stopień korelował z odpowiedzią kliniczną. Kliniczne odpowiedzi (63% częściowych odpowiedzi PR) zaobserwowano przy rekomendowanej do II fazy badania dawce 150 mg na dobę w 2 dawkach dziennie. Odpowiedź dotyczyła zmian przerzutowych w płucach, wątrobie, kościach, a także w ośrodkowym układzie nerwowym. Co bardzo istotne, odpowiedzi dotyczyły nie tylko chorych na czerniaki ze stwierdzoną mutacją w V600E, ale także z mutacją V600K i V600G. Obecnie trwa badanie z losowym doбором chorych nad zastosowaniem GSK2118436 w porównaniu z dakarbazyną w leczeniu I linii zaawansowanego czerniaka z mutacją *BRAF*, gdzie głównym punktem końcowym będzie ocena czasu wolnego od progresji (projekt badania zakłada opcję *cross-over* po wystąpieniu progresji u chorych leczonych dakarbazyną) oraz kolejne badające skuteczność połączenia terapii GSK2118436 z inhibitorem MEK [22, 32, 33].

W 2011 roku zaprezentowano wyniki badania III fazy (BRIM3) oceniającego efektywność inhibitora BRAF — wemurafenibu (PLX4032, Roche) w pierwszej linii leczenia u chorych na zaawansowanego czerniaka z mutacją *BRAF*. Wyniki tego wieloośrodkowego badania były podstawą dla FDA do zarejestrowania wemurafenibu do terapii chorych na zaawansowanego czerniaka z mutacją w *BRAF* V600E w sierpniu 2011 roku. Wyniki tego przełomowego badania opublikowano w czerwcu tego roku w czasopiśmie *New England Journal of Medicine* [34]. Było to randomizowane badanie obejmujące grupę 675 chorych, wcześniej nieleczonych, z rozpoznaniem przerzutowego czerniaka z mutacją w V600E *BRAF* [obecność mutacji oceniona za pomocą analizy reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*real time PCR*, *real time polymerase chain reaction*)]. Chorych przydzielono w stosunku 1:1 do dwóch grup — w jednej podawano dakarbazynę w dawce 1000 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała w cyklach co 3 tygodnie, w drugiej zaś wemurafenib w dawce 960 mg 2 razy dziennie. Wyniki

są bardzo obiecujące: stwierdzono wydłużenie czasu całkowitego przeżycia w grupie chorych przyjmujących wemurafenib, 6-miesięczne całkowite przeżycie u tych chorych wyniosło 84%, podczas gdy w grupie chorych przyjmujących dakarbazynę było to 64% ( $p < 0,001$ ). Mediana PFS wyniosła 5,3 miesiąca w porównaniu z 1,6 miesiąca w grupie chorych leczonych dakarbazyną. U 48% chorych w grupie przyjmujących inhibitor BRAF stwierdzono obiektywną odpowiedź na leczenie (2 całkowite odpowiedzi i 104 częściowe odpowiedzi) — w grupie chorych leczonych dakarbazyną było zaledwie 12 częściowych odpowiedzi (5%). Różnice te były istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ). Korzyść kliniczną u pacjentów stosujących wemurafenib odnotowano we wszystkich grupach chorych niezależnie od wieku, płci, statusu sprawności według *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), stopnia zaawansowania nowotworu (M1a-M1c) czy aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*). W grupie chorych przyjmujących wemurafenib u 10 pacjentów stwierdzono mutacje *BRAF* V600K, z czego u 4 osób w toku badania uzyskano częściową odpowiedź na zastosowane leczenie. Badanie to potwierdziło wcześniejsze dobre wyniki badań przedklinicznych oraz pierwszej i drugiej fazy nad skutecznością wemurafenibu [15, 35, 36]. W badaniu pierwszej fazy w grupie chorych na czerniaka z potwierdzoną mutacją *BRAF* V600E stwierdzono 81% obiektywnych odpowiedzi na leczenie. Odpowiedź trwała od 2 do ponad 18 miesięcy. Do tej fazy badania włączono też grupę chorych na czerniaka bez mutacji w V600E, u żadnej z tych osób nie wystąpiła odpowiedź na leczenie. Z kolei w badaniu II fazy, do którego włączono grupę 132 chorych z potwierdzoną mutacją *BRAF*, u 52% pacjentów stwierdzono zmniejszenie masy nowotworu o  $> 30\%$ , a 82% odniosło kliniczną korzyść z leczenia (52% obiektywnych odpowiedzi, 30% stabilizacja zmian).

Leczenie wemurafenibem zasadniczo jest dobrze tolerowane, wśród działań niepożądanych dominują te w stopniu 1. lub 2. Najczęstsze zdarzenia niepożądane to bóle stawowe, wysypka, nudności, nadwrażliwość na światło, zmęczenie, zespół ręka–stopa. Charakterystycznym objawem ubocznym jest rozwój nowotworów skóry typu raka płaskonabłonkowego skóry o niskim stopniu złośliwości lub rogowiaka kolczystokomórkowego (*keratoacanthoma*). W badaniu trzeciej fazy stwierdzono je u 61 chorych (18%). Średni czas pojawienia się tych zmian to 8 tygodni od rozpoczęcia leczenia, nowotwory te usuwano chirurgicznie i nie powodowały zaburzeń w terapii [35, 37]. Raki skóry w tej grupie chorych były umiejscowione — w przeciwieństwie do przypadków sporadycznych — na obszarach ciała nienarażonych na stałą ekspozycję na promieniowanie słoneczne, nie były też związane z żadnymi wcześniej występującymi zmianami skórnymi, takimi jak brodawki czy rogowa-

cenie słoneczne. Dotychczas ostatecznie nie wyjaśniono przyczyny zwiększonej zapadalności na raki skóry towarzyszącej leczeniu wemurafenibem, istnieją teorie o paradoksalnym pobudzeniu szlaku CRAF w keratynocytach pod wpływem terapii inhibitorem BRAF [19]. Co ciekawe, wśród chorych leczonych PLX4032 nie zaobserwowano w trakcie terapii żadnej zmiany liczby i rozmiaru łagodnych znamion barwnikowych, w których mutacja *BRAF* jest bardzo częsta [37].

Wykazano skuteczność terapii wemurafenibem i innymi selektywnymi inhibitorami BRAF u chorych na rozsialego czerniaka, powinny być one jednak stosowane tylko w grupie chorych z potwierdzoną mutacją *BRAF*. Ostatnie badania wykazały niebezpieczeństwa, jakie mogą grozić przy stosowaniu tych leków u chorych bez mutacji. Odnotowano, że w tej grupie inhibitory mogą raczej indukować zamiast hamować szlaki RAF/MEK. Badacze podkreślają konieczność starannej selekcji chorych do terapii inhibitorami BRAF oraz obowiązek, by zawsze przed włączeniem chorego do terapii określić status mutacji *BRAF*, by zamiast oczekiwanej korzyści nie przyspieszyć rozwoju choroby [15, 38].

Problemem, z jakim muszą zmierzyć się teraz badacze, jest pierwotna i wtórna oporność części chorych na czerniaki z mutacją *BRAF* na leczenie inhibitorami. Odpowiedź na pytanie: Dlaczego u części chorych nie zaobserwowano reakcji na leczenie mimo potwierdzonej mutacji, zaś u tych, u których udało się uzyskać efekt kliniczny z czasem dochodzi do rozwinięcia wtórnej oporności na leczenie i postępu choroby? — wymaga dalszych badań nad szlakami odpowiedzialnymi za rozwój nowotworu. Występowania oporności nie można wytłumaczyć heterogenicznością mutacji *BRAF* w komórkach chorobowych, wykazano, że występuje ona z jednakową częstością we wszystkich przerzutach. Nie jest więc tak, że któraś z subpopulacji komórek czerniaka nie posiada mutacji i jej wzrost w przeciwieństwie do pozostałych komórek nie jest zablokowany przez obecność inhibitora i ten odsetek komórek odpowiada za progresję choroby u leczonego chorego [19, 39]. Badania na komórkami pobranymi od chorych pierwotnie lub wtórnie opornymi na terapię inhibitorami BRAF zaowocowało kilkoma teoriami tłumaczącymi powód tej oporności. Wykazano, że oporność na leczenie nie wynika z wtórnych mutacji *BRAF*, ale z ominięcia zablokowanego ogniwa szlaku. Jednym ze sposobów wytworzenia takiego swoistego by-passu w szlakach komórkowych jest zwiększona ekspresja w opornych komórkach receptora beta dla płytkopochodnego czynnika wzrostu (*PDGFR $\beta$* , *platelet-derived growth factor receptor beta*). Powoduje to uniezależnienie się rozwoju komórki od zablokowanego inhibitorem szlaku MAPK i przewodzenie sygnału alternatywnym szlakiem komórkowym. W innych opornych komórkach wykazano zwiększoną aktywację ERK poprzez nabytą mutację *RAS*, skutkującą tworzeniem się dimerów RAF.

Zablokowanie jednego z tych dimerów powoduje transaktywację drugiego i pobudzenie szlaku mimo obecności inhibitora [40, 41]. Kolejną drogą, jaką omijana jest blokada szlaku RAF, jest nadekspresja MAP3K8 (kinaza białkowa aktywowana mitogenami, alternatywna nazwa *COT* — *cancer Osaka thyroid oncogene*). Skutkuje ona niezależnym od RAF pobudzeniem następnego ogniwa szlaku MEK–ERK i stymulacją rozwoju komórki [42]. Powyższe doniesienia zachęcają do szukania odpowiednich kombinacji lekowych pozwalających ominąć mechanizmy oporności. Jedną ze strategii może być np. łączenie inhibitorów BRAF z inhibitorami MEK [19] (choć istnieją doniesienia o komórkach czerniaka omijających także takie połączenia przez tworzenie opornych na leczenie zmutowanych MEK [43]).

## Leczenie ukierunkowane inhibitorami MEK

MEK jest kolejnym ogniwem szlaku MAPK, nad blokowaniem którego w czerniaku trwają intensywne badania. Rezultaty jak dotąd nie są takie spektakularne, ale inhibitory MEK na pewno znajdują swoje miejsce w terapii rozsianego czerniaka, zważywszy szczególnie na doniesienia mówiące o ich zdolności do zwiększania wrażliwości komórek na tradycyjnie stosowane chemioterapeutyki, takie jak np. cisplatyna czy taksoidy [44, 45].

Interesujące dla przyszłych badań są też wyniki tych analiz *in vivo* stwierdzające szczególną aktywność inhibitorów MEK w komórkach z potwierdzoną mutacją *BRAF* w porównaniu z komórkami bez obecności mutacji *BRAF* [46].

Obecnie badanych jest w wielu nowotworach złośliwych (nie tylko w czerniaku) kilka cząsteczek hamujących MEK. Inhibitory MEK wykazują obiecującą skuteczność również u chorych na raka niedrobnokomórkowego płuca, jelita grubego czy trzustki.

CI-1040 był pierwszym inhibitorem MEK, który wykazał aktywność w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych *in vivo* i na tej podstawie wszedł do pierwszej fazy badania klinicznego [47]. Do badania włączono 67 chorych, w tym 6 pacjentów z rozpoznaniem przerzutowego czerniaka. Wyniki badania wykazały co prawda odpowiedzi wśród chorych z innymi nowotworami, ale żaden pacjent leczony z powodu czerniaka nie odniósł korzyści z terapii. Kolejnym inhibitorem MEK, którego skuteczność badano między innymi w czerniaku, był PD0325901. Lek ten w badaniu pierwszej fazy u dwóch chorych na czerniaka pozwolił na uzyskanie częściowej remisji choroby, u pięciu zaś w trakcie terapii stwierdzono stabilizację zmian. Kolejną cząstką to AZD6244 (selumetinib) — wysoce selektywny inhibitor MEK. W badaniach *in vivo* wykazał szczególną aktywność w komórkach ze stwierdzoną mutacją *BRAF*.

W badaniu pierwszej fazy spośród 16 chorych na czerniaka u 12 stwierdzono stabilizację choroby trwającą co najmniej 5 miesięcy (5–13 i więcej miesięcy) [14, 48]. Ze względu na to, że w przeciwieństwie do inhibitorów zmutowanego *BRAF*, inhibitory MEK działają niewybiórczo na wszystkie komórki organizmu, a nie tylko te z mutacją, więc działania niepożądane są przy takim leczeniu częstsze. Oprócz dominujących w stopniu 1. i 2. nudności/wymiotów, zmęczenia, biegunki czy obrzęków obwodowych, leczenie inhibitorami MEK powoduje powstawanie charakterystycznych zmian skórnych. Dermatologiczne działania niepożądane występują u ponad 90% chorych leczonych AZD6244. Jest to grudkowa wysypka mogąca pojawić się w każdej lokalizacji, rogowacenie skóry, szczególnie bolesne, jeśli dotyczy skóry dłoni i stóp, rumień czy zapalenie wału okołopaznokciowego. Są to zdarzenia niepożądane zwykle w stopniu 1. lub 2. i rzadko prowadzą one do konieczności zmniejszenia dawki lub zaprzestania leczenia [49, 50].

## Podsumowanie

Po latach stagnacji w leczeniu rozsianego czerniaka osiągnięcia ostatnich lat wydają się być wyjątkowo przełomowe głównie dzięki rozwojowi wiedzy nad blokowaniem elementów szlaku MAPK oraz wprowadzeniu immunoterapii nieswoistej. Osiągnięcie coraz bardziej spektakularnych zwycięstw na tym polu będzie wymagać spersonalizowania terapii oraz dalszych badań nad kombinacjami lekowymi. Bardzo interesujące są wyniki badania I/II fazy nad leczeniem skojarzonym inhibitorami MEK i *BRAF* u chorych z potwierdzoną mutacją *BRAF*, w którym uzyskano wysokie odsetki odpowiedzi przy mniejszej toksyczności skórnej terapii. Obiecujące wydają się też być inne połączenia mające na celu jednoczesne zablokowanie kilku ścieżek stymulujących wzrost nowotworu. Bardzo ciekawe mogą być wyniki badań łączących terapię inhibitorami *BRAF* z immunoterapią przeciwciałami monoklonalnymi anty-CTLA4. Podstawą do takich badań okazało się odkrycie, że inhibitory *BRAF* powodują przesunięcie antygenów czerniaka na powierzchnię komórki, uwrażliwiając układ odpornościowy i pozwalając na lepsze rozpoznanie przez krążące limfocyty T. Stosowanie blokady *BRAF* nie wykazało, wbrew obawom, supresyjnego wpływu na odpowiedź immunologiczną, dla której działania kluczowe jest prawidłowe funkcjonowanie szlaku MAPK [19, 34]. Badacze spodziewają się też efektu klinicznego po jednoczesnym zablokowaniu dwóch bardzo istotnych szlaków odpowiedzialnych za rozwój komórek nowotworowych — szlaku MAPK i szlaku PI3K/AKT/mTOR. Podstawą do poszukiwań jest odkrycie, że współistnienie mutacji *BRAF* i *PI3K* prowadzi w modelach zwierzęcych

do rozwoju czerniaka [16, 45]. Ponieważ opisano rolę mutacji V600E *BRAF* w promocji tworzenia się zmian przerzutowych poprzez neoangiogenezę pobudzoną przez zwiększoną sekrecję receptora czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*) oraz kontrolę wydzielania interleukiny 8 (IL-8) — prozapalnej cytokiny pobudzającej wzrost nowotworu i tworzenie naczyń — powstaje pytanie, czy można tę wiedzę wykorzystać w praktyce klinicznej, na przykład poprzez wzmocnienie efektu inhibitorów *BRAF* przez kombinacje z inhibitorami VEGF, takimi jak bewacyzumab, co wymaga dalszych badań [19, 45]. Konieczne jest także opisanie połączenia nowych cząsteczek z dotychczasowymi, standardowymi metodami stosowanymi w paliatywnej terapii czerniaka, takimi jak chemioterapia czy radioterapia (w badaniach *in vivo* wykazano zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące w komórkach czerniaka poddanych blokadzie zmutowanego *BRAF*) [52]. Ponieważ inhibitory *BRAF* w wyselekcjonowanej grupie chorych na zaawansowane czerniaki (z mutacją *BRAF*) powodują szybką odpowiedź i kontrolę nowotworu u większości chorych, a jednocześnie czas trwania odpowiedzi jest ograniczony w związku z pojawianiem się mechanizmów oporności (mediana czasu trwania odpowiedzi wynosi 6,7 miesiąca), prawdopodobnie będą to leki z wyboru u chorych z objawami choroby o dużej masie nowotworu przed rozpoczęciem leczenia ipilimumabem lub też będą stosowane w terapii skojarzonej (z ipilimumabem lub inhibitorami MEK).

## Piśmiennictwo

1. Fisher D.E., Kwong L.N., Chin L. Molecular Biology of Cutaneous melanoma. In: DeVita V.T., Lawrence T.S., Rosenberg S.A. Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. Chapter 48 — Section 1. Wyd. 8. Lippincott Williams & Wilkins 2008.
2. National program of cancer registries. Department of Health. Dostępne na: <http://www.cdc.gov/>.
3. Miller J.A., Mihm C.M. Melanoma, mechanisms of disease. N. Engl. J. Med. 2006; 355: 51–65.
4. Ruka W., Krzakowski M., Placek W. i wsp. Czerniak skóry zasady postępowania diagnostyczno-terapeutycznego. Onkol. Prakt. Klin. 2009; 5: 20–32.
5. Ruka W., Nowecki Z., Rutkowski P. Czerniak skóry u dorosłych. Medipage, Warszawa 2005; 119–123.
6. Hesrey P., Bastholt L., Chiarion-Sileni V. i wsp. Small molecules and targeted therapies in distant metastatic disease. Ann. Oncology 2009; Supl. 6.
7. Bajeta E., Del Vecchio M., Bernard-Marty C. i wsp. Metastatic melanoma: chemotherapy. Semin. Oncol. 2002; 29: 472–445.
8. Algazi A., Soon W.C., Daud A. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. Cancer Manage. Res. 2010; 2: 197–201.
9. Hodi S.F., O'Day S.J., McDermott D.F. i wsp. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N. Engl. J. Med. 2010; 8: 711–723.
10. Junkins-Hopkins J. Malignant melanoma: molecular cytogenetics and their implications in clinical medicine. J. Am. Acad. Dermatol. 2010; 63: 329–332.
11. Shepherd C., Puzanov I., Sosman J. B-Raf Inhibitors: an evolving role in therapy of malignant melanoma. Curr. Oncol. Rep. 2010; 12: 146–152.

12. Curtin J., Fridlyand J., Kageshita T. Distinct sets of genetic alteration in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2005; 20: 2135–2147.
13. Bauer J., Buttner P., Murali R. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24: 345–351.
14. Ramnath N., Adjei A. Inhibitors of Raf kinase and MEK signaling. *Update on Cancer Ther.* 2007; 2: 111–118.
15. Vultur A., Villanueva J., Heryl M. Targeting BRAF in advanced melanoma: a first step toward manageable disease. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17: 1658–1663.
16. Wellbrock C., Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem. Pharmacol.* 2010; 80: 561–567.
17. Heath E.M.L., Kaufman K.L., Christopherson R.J. B-RAF: A contributor to the melanoma phenotype. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011; 43: 29–32.
18. Dhomen N., Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 2007; 17: 31–39.
19. Puzanov I., Burnett P., Flaherty K. Biological challenges of BRAF inhibitor therapy. *Molec. Oncol.* 2011; 5: 116–123.
20. Patton E., Widlund H., Kutok J. BRAF Mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the Genesis of melanoma. *Curr. Biol.* 2005; 15: 249–254.
21. Haluska F., Nageatte I. Therapeutic target in melanoma MAPKinase pathway. *Curr. Oncol. Rep.* 2006; 8: 400–405.
22. Arkenau H.T., Kefford R., Long G.V. Targeting BRAF for patients with melanoma. *Br. J. Cancer* 2011; 104: 392–398.
23. Casula M., Colombino M., Satta M. BRAF Gene is somatically mutated but does not make a major contribution to malignant melanoma susceptibility: the Italian melanoma intergroup study. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 286–291.
24. Romano E., Schwartz G.K., Chapman P.B. i wsp. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol.* 2011; 9: 913–922.
25. Long G., Menzies A., Nagrial A. i wsp. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2011; 29: 1239–1246.
26. Platz A., Egyhazi S., Ringborg U. i wsp. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenic subclass and body site. *Mol. Oncol.* 2008; 1: 395–405.
27. Eisen T., Ahmad T., Flaherty K.T. i wsp. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br. J. Cancer* 2006; 95: 581–586.
28. McDermott D.F., Sosman J.A., Gonzalez R. Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group. *J. Clin. Oncol.* 2008; 26: 2178–2185.
29. Hauschild A., Agarwala S.S., Trefzer U. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 2823–2830.
30. Flaherty K.T., Brose M., Schuchter L. i wsp. Phase I/II trial of BAY 43-9006, carboplatin (C) and paclitaxel (P) demonstrates preliminary antitumor activity in the expansion cohort of patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22: 7507.
31. Halilovic E., Solit D.B. Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. *Curr. Opin. Pharm.* 2008, 8: 419–426.
32. Kefford R., Arkenau H., Brown M.P. i wsp. Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2010; abstr 8503.
33. Eggermont A., Caroline R. New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur. J. Cancer* 2011; 47: 2150–2157.
34. Ribas A., Flaherty K.T. BRAF targeted therapy changes the treatment paradigm in melanoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2011; 7: 426–433.
35. Chapman P., Hauschild A., Robert C. i wsp. Improved survival with Vemurafenib in melanoma with BRAG V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 2507–2516.
36. Yang H., Higgins B., Kolinsky K. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res.* 2010; 70: 5518–5527.
37. Flaherty K., Puzanov I., Kim K. i wsp. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363: 809–819.
38. Bollag G., Hirth P., Tsai J. Clinical efficacy of a RAF inhibitor leads broad target blockade in BRAF mutant melanoma. *Nature* 2010; 467: 596–599.
39. Halaban R., Zhang W. i wsp. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigm. Cell Melanoma Res.* 2010; 23: 190–200.
40. Gorden A., Osman I., Gai W. i wsp. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res.* 2003; 63: 3955–3957.
41. Solit D., Rosen N. Resistance to BRAF inhibition in melanomas. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364: 772–774.
42. Nazarian R., Shi H., Qi W. i wsp. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK Or N-RAS upregulation. *Nature* 2010; 468: 973–977.
43. Johannessen C.M., Boehm J.S., Kim S.Y. i wsp. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010; 468: 968–972.
44. Wagle N., Emery C., Berger M. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J. Clin. Oncol.* 2011; 22: 3085–3096.
45. Inamdar G.S., Madhunapantula S.V., Robertson G.P. Targeting the MAPK pathway in melanoma: why some approaches succeed and other fail. *Biochem. Pharmacol.* 2010; 80: 624–637.
46. Smalley K.S., Flaherty K.T. Integrating BRAF/MEK inhibitors into combination therapy for melanoma. *Br. J. Cancer* 2009; 100: 431–435.
47. Solit D.B., Garraway L.A., Pratilas C.A. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006; 439: 358–362.
48. Lorusso P.M., Adjei A.A., Varterasian M. i wsp. Phase I and pharmacodynamic study of the oral MEK inhibitor CI-1040 in patients with advanced malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 5281–5293.
49. Wang D., Boerner S., Winkler J. Clinical experience of MEK inhibitors in cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2007; 1773: 1248–1255.
50. Balagula Y., Barth Huston K. i wsp. Dermatologic side effects associated with the MEK 1/2 inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886). *Invest. New Drugs* 2011; 29: 1114–1121.
51. Thomas M., Robert C. Dermatologic manifestations according to targeted pathways MEK inhibitors — a new dermatology, cutaneous side effects induced by targeted anticancer therapies 2011. Editions Privat; 95–102.
52. Sambade M.J., Peters E.C., Thomas N.E. i wsp. Melanoma cells show a heterogeneous range of sensitivity to ionizing radiation and are radiosensitized by inhibition of B-RAF with PLX-4032. *Radiother. Oncol.* 2011; 98: 394–399.