

# Ukierunkowane leczenie chorych na czerniaka: tym razem to sprawa osobista

Keiran S. M. Smalley, Grant A. McArthur

Semin Oncol 2012, 39: 204-214.

Leczenie chorych na czerniaka z przerzutami zawsze było poważnym wyzwaniem. W ostatnich 8 latach znacznie lepiej poznano zmiany genetyczne przyczyniające się do rozwoju i progresji czerniaka. Wykazano, że jest to niejednorodna grupa nowotworów, której rozwojem kierują różne mutacje onkogenne. Udowodniono, że odpowiednimi punktami uchwytu działania leków są u niektórych chorych na czerniaka aktywujące mutacje w kinazie serynowej/treoninowej BRAF i kinazie tyrozynowej receptora KIT. Autorzy omawiają zmiany genetyczne i etiologię czerniaków skóry oraz pozaskórnych, a także analizują wyniki niektórych opublikowanych ostatnio badań przedklinicznych i klinicznych poświęconych nowym lekom o ukierunkowanym działaniu, które zaczynają wpływać na życie chorych na czerniaka.

**M**imo wielu lat badań czerniak rozsiany pozostaje poważnym problemem klinicznym. Tak frustrujący brak postępu sprawił, że niektórzy określają go mianem nowotworu z natury opornego na leczenie. Pojawiły się też sugestie, że fenotyp oporności może być charakterystyczną cechą biologii melanocytów.<sup>1</sup> W ostatnich latach podjęto bardzo wiele badań dokładnie analizujących profile genomowe, których wyniki dostarczyły nowych ważnych informacji o zdarzeniach molekularnych prowadzących do zapoczątkowania rozwoju i progresji czerniaka.<sup>2-4</sup> Szczególną uwagę zwraca częste występowanie mutacji lub amplifikacji w onkogenach, co stworzyło okazję do opracowania niezwykle wybiórczych metod leczenia o ukierunkowanym działaniu. Dzięki tym badaniom stało się jasne, że czerniaki są niejednorodną grupą nowotworów o różnych etiologiach i wymagają zastosowania odmiennych strategii terapeutycznych. Obecnie ocenia się rolę terapii o ukierunkowanym działaniu w leczeniu chorych na czerniaka. Metoda ta polega na doborze wybiórczych inhibitorów drobnocząsteczkowych do nowotworów, na powierzchni których dochodzi do ekspresji cząsteczek powstałych w wyniku określonych mutacji onkogennych. Przykładem takiej strategii jest wykorzystanie imatynibu u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (chronic myeloid leukemia, CML) i chorych na nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (gastrointestinal stromal tumors, GIST) oraz erlotynibu u chorych na typ niedrobnokomórkowego raka płuca (non-small cell lung cancer, NSCLC) z mutacjami aktywującymi w genie *EGFR*.<sup>5-7</sup> Autorzy omawiają najnowsze badania poświęcone podziałom czerniaków na podgrupy na podstawie ich cech molekularnych, przedstawiają też obiecujące strategie leczenia ukierunkowanego przeciw tym molekularnym podtypom czerniaka, będące obecnie przedmiotem badań.

## Dr Smalley,

The Programs of Cutaneous Oncology and Molecular Oncology, The Moffitt Cancer Center, Tampa, FL, Stany Zjednoczone.

## Dr McArthur,

Division of Cancer Medicine and Research, Peter MacCallum Cancer Centre, St Andrews Place, East Melbourne, Department of Medicine, St Vincent's Hospital, University of Melbourne, Fitzroy, Department of Pathology, University of Melbourne, Parkville, wszystkie ośrodki w stanie Victoria w Australii.

## Adres do korespondencji:

Keiran S.M. Smalley, PhD, The Programs of Cutaneous Oncology and Molecular Oncology, The Moffitt Cancer Center, 12902 Magnolia Dr, Tampa, FL, 33612, USA; e-mail: Keiran.Smalley@moffitt.org

Granty (K.S.M.S.):  
The Harry Lloyd Trust,  
The Bankhead-Coley Research  
Program of the State of Florida  
(09BN-14),  
granty badawcze American Cancer  
Society  
(#93-032-13) i NIH/National  
Cancer Institute  
(U54 CA143970-01 i R01  
CA161107-01).

Granty (G.A.M.):  
G.A.M. otrzymuje  
Sir Edward  
Dunlop Clinical Research Fellowship  
of the Cancer Council of Victoria  
oraz granty  
Victorian Cancer Agency,  
Cancer Council of Victoria  
oraz National Health and Medical  
Research Council Australia.

PODZIAŁ CZERNIAKÓW SKÓRY I INNYCH NARZĄDÓW NA PODGRUPY NA PODSTAWIE CECH  
GENETYCZNYCH

Mutacje *BRAF* w pozycji V600

Genomowa rewolucja w badaniach nad czerniakiem wybuchła w 2002 r., gdy w około 50% wszystkich czerniaków odkryto występowanie aktywującej mutacji w genie *BRAF* (ryc. 1).<sup>4</sup> Raf to rodzina białek złożona z trzech kinaz serynowo/treoninowych (ARAF, BRAF i CRAF) o nakładających się funkcjach.<sup>8</sup> W genie *BRAF* odkryto dotąd ponad 50 różnych mutacji.<sup>9</sup> Mutacja *BRAF*, prowadząca do substytucji w pozycji V600 (zastąpienie waliny kwasem glutaminowym), jest z pewnością najczęstsza, stanowi bowiem ponad 80% wszystkich mutacji *BRAF*.<sup>4,10</sup> Inne mutacje wykryte w próbkach czerniaków, rzadsze, ale mające znaczenie kliniczne, to V600K (16% wszystkich mutacji *BRAF*) i V600D/V600R (3% wszystkich mutacji *BRAF*).<sup>11</sup> Onkogenna aktywność zmutowanego genu *BRAF* jest najczęściej wyrażana przez zapoczątkowanie kaskady aktywowanej mitogenu kinazy białkowej (mitogen-activated protein kinase, MAPK), regulującej wejście komórek w cykl komórkowy przez kontrolę ekspresji cykliny D1 i supresję p27<sup>KIP1</sup>,<sup>12,13</sup> jak również przez wpływ na inwazję i przeżycie.<sup>14,15</sup> W modelach doświadczalnych o roli zmutowanego *BRAF* w czerniaku przekonali wyniki badań *in vitro*, w których wykazano właściwości onkogenne mutacji *BRAF* V600E w nieśmiertelnych melanocytach mysich,<sup>16</sup> a także odwrócenie fenotypu czerniaka w następstwie wybiórczego ograniczenia ekspresji mutanta *BRAF* V600E za pomocą RNAi.<sup>17,18</sup> Choć zmutowany *BRAF* niewątpliwie odgrywa ważną rolę w rozwoju czerniaka, wyłączna mutacja *BRAF* V600E nie wystarcza do transformacji pierwotnych melanocytów ludzkich ani mysich.<sup>19</sup> Wydaje się natomiast, że rozwój czerniaka wymaga zarówno BRAF/MAPK, jak i aktywności szlaku kinazy fosfoinozytydu-3 (PI3K)/AKT. Szczególnie przekonująco potwierdzono to w badaniach przeprowadzonych na myszach transgenicznym, u których pełna transformacja do czerniaka następowała dopiero po uaktywnieniu mutacji *BRAF* V600E równolegle z zahamowaniem ekspresji homologu fosfatazy i tensyny (phosphatase and tensin homolog, PTEN).<sup>20</sup>

Chociaż mutacje *BRAF* nie są wywoływane promieniowaniem ultrafioletowym (UV), wykazują skłonność do występowania w skórze ekspozowanej na działanie promieniowania UV, częściej u osób gorzej reagujących na opalanie.<sup>21</sup> Udowodniono, że czynnikiem przepowiadającym wystąpienie mutacji *BRAF* jest raczej przejściowa niż przewlekła ekspozycja na działanie promieniowania UV. Chorzy na czerniaki powstałe w następstwie takiej mutacji są na ogół młodsi (<55 lat), a ich skumulowana ekspozycja na promieniowanie UV jest mniejsza.<sup>22</sup> Występowanie lub brak mutacji *BRAF* może mieć znaczenie rokownicze. W jednym z badań przyczyniała się ona do skrócenia czasu przeżycia chorych z przerzutami (5,7 miesiąca w porównaniu z 8,5 miesiąca w grupie chorych bez mutacji *BRAF*).<sup>23</sup>

*Drobnocząsteczkowe inhibitory BRAF: sorafenib, PLX4032/4720 i GSK2118436*

Od czasu odkrycia w czerniakach aktywujących mutacji *BRAF* opracowano szereg inhibitorów BRAF, których działanie oceniano w badaniach *in vitro*.<sup>24-28</sup> Najintensywniejsze badania poświęcono inhibitorowi kinaz sorafenibowi (BAY43-9006, Nexxavar, Bayer, Wayne, NJ).<sup>28</sup> Opracowano go wprawdzie w celu hamowania CRAF, w trakcie badań okazało się jednak, że umiarkowanie skutecznie hamuje on również BRAF. Wykorzystano go zatem początkowo w badaniach typu proof-of-concept, oceniających skuteczność hamowania BRAF w czerniaku.<sup>29</sup> W modelach zwierzęcych podanie sorafenibu powodowało nieznaczną regresję wszczepionych obcogatunkowych czerniaków z mutacją *BRAF* V600E oraz w niewielkim stopniu zapoczątkowywało apoptozę.<sup>29,30</sup> W dalszych badaniach przedklinicznych sorafenib okazał się stosunkowo słabym inhibitorem BRAF. Oddziaływał też na wiele innych punktów uchwytu – przede wszystkim hamował receptory czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) i receptory płytkopochodnego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR).<sup>28,31</sup> Niewykluczone, że aktywność sorafenibu ukierunkowana przeciw komórkom czerniaka jest w dużym stopniu niezależna od jego wpływu na hamowanie BRAF.<sup>32</sup>

Od czasu pierwszych badań oceniających oddziaływanie sorafenibu na czerniaka opracowano nową generację inhibitorów BRAF. Leki te charakteryzują się silniejszym potencjałem wobec zmutowanego *BRAF*, wywołują też mniej działań niepożądanych. Wśród inhibitorów ocenianych obecnie w badaniach przedklinicznych są: SB590885, dabrafenib (GSK2118436), AZ628, XL281, GDC-0879 i wemurafenib (RG704, PLX4032/4720).<sup>24,25,33-39</sup> PLX4032 (i jego analog PLX4720) to inhibitory RAF kompetycyjne wobec ATP (stężenie inhibitora wymagane do zahamowania

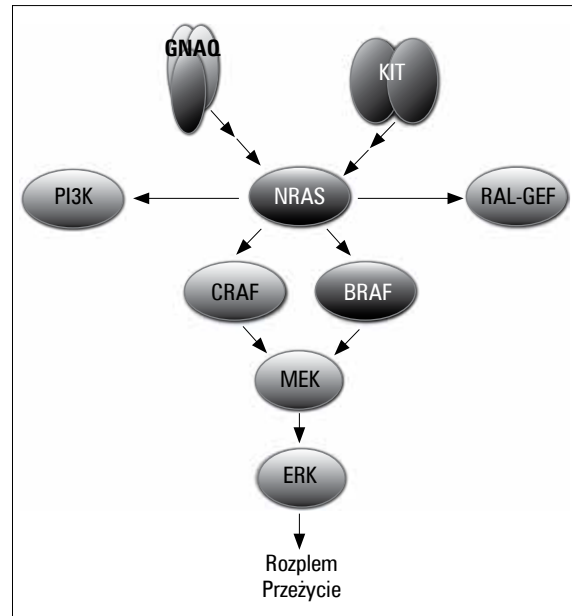
aktywności BRAF typu dzikiego w 50% [IC<sub>50</sub>] to 100 nmol/l, a zahamowanie aktywności zmutowanego BRAF wymaga IC<sub>50</sub>=31 nmol/l). W hodowli komórkowej oraz w modelach mysich z wszczepionym obcogatunkowym czerniakiem wybiórczo hamują one wzrost komórek czerniaka z mutacją BRAF V600E.<sup>25,38,40</sup> Inhibitor ten będzie dalej nazywany PLX4032 w badaniach przedklinicznych oraz wemurafenibem w badaniach klinicznych. Odpowiedzi na działanie PLX4032 obserwowane w modelach wszczepionych czerniaków obcogatunkowych były swoiste dla BRAF V600E i spektakularne. We wszystkich przypadkach wykazano odpowiedź pełną lub częściową, a w poszczególnych modelach bliski związek między ekspozycją na lek a odpowiedzią.<sup>38,40</sup> Co ciekawe, nie wszystkie linie komórkowe czerniaka z mutacją BRAF były równie wrażliwe na PLX4032 i PLX4720, wiele z nich cechowała bowiem różnego stopnia oporność własna.<sup>33,36,37</sup> Dostępne dane świadczą, że w najwrażliwszych liniach komórkowych PLX4032/4720 zatrzymuje zarówno cykl komórkowy, jak i apoptozę, a w liniach opornych lub mniej wrażliwych wyłącznie cykl komórkowy.<sup>33,37</sup> Niedawno przeprowadzono badanie genetyczne, w którym poszukiwano wzorców mutacji i powieżeń fragmentów genomu między komórkami wrażliwymi a opornymi na PLX4032. Nie stwierdzono w nim żadnych różnic między tymi dwoma typami komórek.<sup>37</sup> Wydaje się zatem, że wrodzona oporność na inhibitory BRAF jest złożona i wieloczynnikowa.<sup>41</sup> Wiadomo już, że występują podgrupy czerniaków z mutacją BRAF V600E, które dodatkowo zawierają mutacje w genach PTEN, cykliny D1, CDK2, CDK4, MITF i AKT3.<sup>42,43</sup> Nie wiadomo jednak, jak ekspresja oraz brak lub występowanie mutacji w tych genach wpływają na zachowanie biologiczne nowotworu i jaką odegrają rolę w wyborze przyszłej terapii.

Innym inhibitorem BRAF, wzbudzającym obecnie duże zainteresowanie i ocenianym w badaniach przedklinicznych oraz klinicznych, jest dabrafenib (GSK2118436), inhibitor kompetycyjny ATP BRAF V600E/D/K, prawidłowego BRAF, a także CRAF.<sup>44</sup> Wykazał on obiecującą aktywność w przedklinicznych modelach czerniaka, a teraz jest oceniany w badaniach klinicznych.<sup>45,46</sup>

Czerniaki z mało aktywnymi mutacjami BRAF (inne niż V600) i czerniaki zależne od CRAF

W niewielkiej podgrupie czerniaków wykryto mutacje genu BRAF w pozycji innej niż V600. Wiele takich mutantów BRAF innych niż V600 w izolowanych testach aktywności kinazowej prezentuje zaburzenia aktywności kinazy (stąd nazwa mutantów BRAF o małej aktywności) i wymaga obecności CRAF do transaktywacji ich szlaku sygnałowego MAPK.<sup>10</sup> Analiza dużego

RYCINA 1



Schemat przedstawiający wybrane ważne szlaki molekularne odgrywające rolę w progresji czerniaka. Geny przenoszące mutacje aktywujące zaznaczono ciemnym kolorem.

panelu linii komórkowych i tkanek czerniaka ujawniła, że około 1% z nich zawierało odpowiednio mutacje D594G lub G469E w genie BRAF, a około 1% próbek czerniaka zawierało mutację G469A.<sup>30</sup> Takie linie komórkowe z mutacjami BRAF innymi niż w pozycji V600 różnią się w przekazywaniu sygnałów przez mutanty BRAF V600, cechują się też dużymi stężeniami fosfo-ERK, małymi stężeniami fosfo-MEK oraz opornością na hamowanie MEK.<sup>30</sup> Co ciekawe, mutanty BRAF inne niż V600 wydają się tworzyć część szerszej podgrupy linii komórkowych czerniaka, w tym także z BRAF typu dzikiego i mutacją BRAF V600K, które do przeżycia wymagają czynnego CRAF.<sup>47</sup> Badania prowadzone przez dwa niezależne zespoły ujawniły unieczynnienie CRAF za pomocą shRNA w podgrupach czerniaka zależnych od CRAF wpływa na fosforylację BAD i ekspresję Bcl-2 niezależnie od MEK, co prowadzi do apoptozy i zaburzeń wzrostu nowotworu w modelu przeszczepów obcogatunkowych u myszy.<sup>30</sup>

Sorafenib jest wprawdzie stosunkowo słabym inhibitorem BRAF, lecz w miarę silnie działa na CRAF. W badaniach przedklinicznych stwierdzono, że jest on skutecznym czynnikiem proapoptotycznym w liniach komórek czerniaka z mutacjami BRAF o małej aktywności, hamującym wzrost tych linii komórkowych w przeszczepach obcogatunkowych u myszy.<sup>30</sup> Opracowanie bardziej wybiórczych i silniejszych inhibitorów CRAF

może być również korzystne w czerniakach i innych nowotworach złośliwych, w których zachodzi ekspresja mniej aktywnych mutacji *BRAF* innych niż V600.

#### *NRAS, KRAS i HRAS*

Białka RAS to duża rodzina drobnocząsteczkowych białek wiążących trójfosforan guanozyny (GTP) występujących w błonie plazmatycznej. W nowotworach ludzkich często rozpoznaje się mutacje w genach trzech członków rodziny RAS: *NRAS*, *HRAS* i *KRAS*. Ponad 20% nowotworów zawiera mutacje aktywujące w jednym z genów RAS.<sup>48</sup> Mutacje w genach *NRAS*, *KRAS* i *HRAS* wykryto odpowiednio w 20, 2 i 1% czerniaków.<sup>49</sup> Mutacje *NRAS* najczęściej są następstwem zmiany punktowej prowadzącej do zastąpienia lecytyny glutaminą w pozycji 61,<sup>4,50</sup> rzadziej natomiast występują mutacje w pozycjach 12 i 13.<sup>2</sup> Przeprowadzona na dużą skalę analiza wycinków czerniaka i linii komórkowych wykazała, że chociaż mutacje *BRAF* V600E i *NRAS* nawzajem się wykluczają, mutacje *BRAF* o małej aktywności pokrywają się z mutacjami *NRAS*.<sup>2,51</sup> Z mechanistycznego punktu widzenia mutacje w genie *NRAS* zaburzają aktywność GTP-azy, prowadząc do jej zablokowania w pozycji czynnej. W formie związanej z GTP RAS łączy się z wieloma enzymami efektorowymi uczestniczącymi w proliferacji i uaktywnia je. Najlepiej opisanym z nich jest CRAF.<sup>52</sup> Czerniaki z aktywnymi mutacjami *NRAS* różnią się zatem od czerniaków z mutacjami *BRAF* tym, że polegają na CRAF podczas indukcji szlaku MAPK.<sup>52</sup> Wiadomo też, że RAS aktywują szlak PI3K/AKT, co przyczynia się do progresji nowotworu na drodze modulowania wzrostu i przeżycia komórek, które uległy transformacji.<sup>13</sup> Oprócz MAPK i PI3K/AKT zmutowane białko *NRAS* może też aktywować inne szlaki przekazywania sygnałów wewnątrzkomórkowych, odgrywające ważną rolę w transformacji nowotworowej. Nowsze badania wykazały ważną rolę czynników wymiany nukleotydu guaniny Ral (Ral guanine nucleotide exchange factors, Ral-GEF) we wzroście komórek niezależnym od zakotwiczenia, obserwowanym po transformacji melanocytów w następstwie mutacji w genie *NRAS*.<sup>53</sup> Rolę mutacji RAS w zapoczątkowaniu rozwoju czerniaka potwierdzono w modelach zwierzęcych, w których wprowadzenie zmutowanych *HRAS* lub *NRAS* (Q61K) powoduje powstawanie czerniaka u myszy transgenicznych pozbawionych ekspresji inhibitora CDK p16<sup>INK4A</sup>.<sup>54,55</sup>

#### *Inhibitory transferazy farnesyly, podwójne hamowanie MEK/PI3K*

*NRAS* jest drobnocząsteczkową GTPazą, a zatem trudnym punktem uchwytu działania leków konwencjonalnych.<sup>48</sup> Inhibitory transferazy farnesyly

(farnesyltransferase inhibitor, FTI) to klasa leków zapobiegających umiejscowieniu się w błonie (i aktywacji) drobnocząsteczkowych białek G, początkowo zaprojektowanych jako leki o działaniu ukierunkowanym przeciw szlakowi sygnałowemu onkogenemu Ras.<sup>56</sup> Mimo zakrojonych na szeroką skalę prac związku te wykazały niewielką aktywność w monoterapii, nawet u chorych na raka jelita grubego, wśród których w około 40% występują mutacje w *KRAS*.<sup>56</sup> FTI nie oceniano w badaniach klinicznych przeprowadzonych z udziałem chorych na czerniaka dobranych ze względu na występowanie w nich lub brak mutacji *NRAS*. Zgromadzono niewiele dowodów przemawiających za pewną aktywnością FTI *in vitro* w hodowlach komórek czerniaka, badania te prowadzono jednak w czasach poprzedzających podział czerniaków na podgrupy na podstawie ich cech molekularnych.<sup>57</sup> Obecnie skupia się uwagę na szlakach przekazywania sygnałów umiejscowionym poniżej aktywacji Ras, które mogą być lepszym punktem uchwytu dla działania leków. Dowody pochodzące z badań przedklinicznych prowadzonych w modelach zwierzęcych wskazują, że jednoczesne zahamowanie szlaków MEK i PI3K prowadzi do regresji nowotworów z mutacją Ras.<sup>58,59</sup> W innych badaniach doświadczalnych jednoczesne zahamowanie *BRAF* i *CRAF* lub *BRAF* i PI3K (przez shRNA) skutecznie ogranicza wzrost i przeżycie obcogatunkowych przeszczepów ludzkiego czerniaka z mutacjami w genie *NRAS*.<sup>60</sup> Wiadomo, że aktywacja szlaku sygnałowego MAPK czerniaków z mutacją RAS wymaga CRAF, jednak niewiele dowodów przemawia za większą skutecznością sorafenibu w mutantach *NRAS* niż w liniach komórkowych czerniaka z mutacją *BRAF*.<sup>30</sup>

#### KIT

W czerniakach rozwijających się w regionach ciała, które nie są ekspozowane na promieniowanie UV, takich jak podeszwy stóp, powierzchnia dłoni, okolice pod paznokciami (czerniaki akralne) lub błony śluzowe (czerniaki błon śluzowych), rzadko występują mutacje *BRAF*.<sup>61</sup> Często natomiast stwierdza się w nich powielenie fragmentów materiału genetycznego i mutacje aktywujące w kinazie tyrozynowej receptora KIT. W przeprowadzonym niedawno w przełomowym badaniu wykazano mutacje aktywujące *KIT* w 21% czerniaków błon śluzowych, 11% czerniaków odsiebnych części kończyn i 17% czerniaków powstających pod wpływem uszkodzeń skóry wywołanych przewlekłą ekspozycją na promienie słoneczne, przy czym wiele z nich występuje w miejscu okołobłonowym decydującym o wrażliwości na imatynib.<sup>61</sup> Sekwencjonowanie eksonów 11, 13, 17 i 18 c-KIT ujawniło, że najczęstszymi mutacjami są K642E, L576P, D816H i V559A, które częściej znajdują się w innych miejscach niż mutacje *KIT* spotykane

w GIST lub nowotworach układu krwiotwórczego.<sup>62</sup> Nabyciu mutacji *KIT* towarzyszy zwykle zwiększenie liczby kopii i amplifikacja pewnych fragmentów genomu. Obserwowano też amplifikację genu *KIT* mimo braku mutacji.<sup>61</sup> Od czasu pierwszego opisu zaburzeń w *KIT* spostrzeżenia te potwierdzono w wielu kolejnych doniesieniach.<sup>63-65</sup> Zgromadzone dotychczas dane wskazują, że mutacje *KIT* występują w 14% czerniaków akralnych i 18% czerniaków błon śluzowych.<sup>66</sup> Ponieważ każdy z tych podtypów stanowi zaledwie 2% wszystkich czerniaków, całkowity odsetek czerniaków z mutacjami *KIT* jest niewielki. W populacji australijskiej, w której 40% czerniaków powstaje w następstwie przewlekłego uszkodzenia skóry przez ekspozycję na promieniowanie słoneczne, mutacje *KIT* są równie rzadkie.<sup>67</sup>

W badaniach doświadczalnych wprowadzenie mutacji D814Y do *KIT* w nienowotworowych nieśmiertelnych melanocytach w hodowli komórkowej nie powodowało ani transformacji nowotworowej, ani zwiększenia częstości podziałów komórek.<sup>68</sup> Brak proliferacji w melanocytach z mutacją *KIT* zaskakiwał, ale prawdopodobnie jest skutkiem jedynie pojedynczego zdarzenia onkogenego powodującego mutację *KIT*. Niedawno wykazano, że dwie mutacje *c-KIT* najczęściej spotykane w czerniaku (K642E i L576P) mogły doprowadzić do transformacji melanocytów jedynie w warunkach niedotlenienia lub po wprowadzeniu egzogenego, indukowanego niedotlenieniem czynnika 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ).<sup>69</sup> Z mechanistycznego punktu widzenia wydaje się, że pełna aktywacja obu szlaków wymagała uruchomienia przekazywania sygnałów w szlaku PI3K/AKT aktywowanego zmutowanym *c-KIT*, a nie MEK/ERK, a także połączenia niedotlenienia z mutacją *c-KIT*. Dane te ponownie potwierdzają, że w modelu transformacji obserwowanym w czerniakach z mutacją *BRAF* w celu zapoczątkowania rozwoju i progresji nowotworu konieczne jest jednoczesne przekazywanie sygnałów przez MAPK/AKT.<sup>69</sup>

#### *Imatynib, sunitynib, dazatynib*

Stosunkowo nieduża liczba linii komórkowych czerniaka z aktywującymi mutacjami *KIT* znacznie utrudnia prowadzenie badań przedklinicznych. Coraz wyraźniej widać, że raczej mutacje *KIT* niż amplifikacja fragmentu genomu pozwalają przewidzieć odpowiedź na zastosowanie drobnocząsteczkowych inhibitorów *KIT*.<sup>66</sup> Wydaje się też, że charakter mutacji *KIT* dyktuje, który z inhibitorów *KIT* będzie skuteczny.<sup>66</sup> Do dziś opublikowano wyniki jedynie dwóch badań przedklinicznych, w których wykorzystano linie komórek czerniaka uzyskane z czerniaków akralnych lub czerniaków błon śluzowych.<sup>65,70</sup> W pierwszym z badań opisano trzy pierwotne linie komórkowe czerniaka błon śluzowych, z których w jednej występowała mutacja *c-KIT* w ekso-

nie 11, V559D.<sup>65</sup> Dodanie do pożywki imatynibu zatrzymywało cykl komórkowy oraz zapoczątkowywało apoptozę i hamowało szlak przekazywania sygnałów JAK/STAT, PI3K/AKT i MAPK oraz ekspresję Bcl-2, surwiwiny i Mcl-1.<sup>65</sup> W drugim badaniu opisano linię komórkową czerniaka błony śluzowej z mutacją *c-KIT* w eksonie 17, D820Y (mutacja często wiązana z opornością na imatynib w GIST) z wrażliwością na sunitynib (tylko w dużych stężeniach).<sup>70</sup> W kolejnym opublikowanym niedawno doniesieniu opisano linie komórkowe czerniaka niebędące czerniakami akralnymi ani czerniakami błon śluzowych, z mutacją *KIT* L576P.<sup>71</sup> Ta linia komórkowa okazała się oporna na działanie imatynibu, nilotynibu i sorafenibu, ale wrażliwa na działanie dazatynibu.<sup>71</sup> Zgromadzono też pewne dowody wskazujące, że występowanie konstytutywnej aktywności *KIT* (co wykazano oznaczając fosfo-*KIT*) może być czynnikiem przepowiadającym odpowiedź na zastosowanie inhibitora *KIT*.<sup>72</sup>

Kolejnym podtypem czerniaka prawdopodobnie związanym z aktywacją przekazywania sygnałów *KIT* jest czerniak rozwijający się z komórek barwnikowych błony naczyniowej gałki ocznej. Jest on najczęstszym pierwotnym nowotworem oka u dorosłych, pochodzącym z melanocytów naczyniówki, tęczówki i ciała rzęskowego. W czerniakach błony naczyniowej, podobnie jak w innych czerniakach pozaskórnych, nie występują mutacje aktywującej *BRAF* i *NRAS*,<sup>73</sup> natomiast do 87% z nich zachowuje ekspresję *c-KIT*. W przeciwieństwie jednak do czerniaków akralnych i błon śluzowych w czerniakach błony naczyniowej gałki ocznej na ogół nie wykrywa się aktywujących mutacji *c-KIT*.<sup>74</sup> Badania doświadczalne przeprowadzone w hodowlach komórkowych ujawniły, że pod wpływem działania imatynibu w komórkach czerniaków błony naczyniowej gałki ocznej zachodzi ekspresja fosforylowanego *KIT*, a także do zatrzymania cyklu komórkowego.<sup>75</sup> Nie przedstawiono dotychczas wyników badań klinicznych oceniających przydatność inhibitorów *KIT* w leczeniu chorych na czerniaki błony naczyniowej gałki ocznej.

#### GNAQ i GNA11

Wydaje się, że dla rozwoju czerniaka jest konieczna aktywacja szlaku przekazywania sygnałów MAPK. Coraz więcej dowodów przemawia za tym, że w czerniakach błony naczyniowej gałki ocznej, z których w większości nie występują mutacje *BRAF* i *RAS*, w aktywności MAPK pośredniczy aktywacja mutacji Q209 w heterotrimerycznej podjednostce  $\alpha$  GNAQ białka G76 lub jej odpowiednika, reszty w blisko związanej podjednostce  $\alpha$  GNA11 białka G. Mutacje GNAQ w pozycji Q209 są analogiczne do obserwowanych w *NRAS* (w pozycji Q61) i zaburzają aktywność

GTPazy, prowadząc do nieprzerwanego przesyłania sygnałów. Oznaczenie profilów molekularnych pozwoliło wykryć mutację GNAQ Q209 w 46-49% wycinków czerniaka błony naczyniowej gałki ocznej i w 27% linii komórkowych tego czerniaka.<sup>76,77</sup> W badaniach *in vitro* wykazano, że samo wprowadzenie GNAQ-Q209L nie powoduje transformacji komórek w hodowlach pierwotnych melanocytów ludzkich. Jeśli jednak te same komórki zostały poddane transfekcji, w wyniku której hodowla stała się nieśmiertelna (mutacje TP53/CDK4 i hTERT), dochodziło do niezależnego od zakotwiczenia wzrostu.<sup>76</sup> Nie opracowano jeszcze wprawdzie drobno-cząsteczkowych inhibitorów GNAQ, ale potwierdzono potencjał terapeutyczny tego białka G, wykazując, że eliminacja czynnika GNAQ za pomocą siRNA przyspiesza śmierć komórek w liniach komórkowych czerniaka błony naczyniowej gałki ocznej z tą mutacją.<sup>76</sup>

#### DOSTOSOWANIE LECZENIA DO PROFILU MUTACJI: DANE KLINICZNE

Przedstawione wyżej dane z badań przedklinicznych doprowadziły do podjęcia wielu opartych na hipotezie badań klinicznych, w których punktem uchwytu działania leków były wykryte w czerniaku mutacje onkogenne. Pierwsze próby ukierunkowania terapii na te mutacje polegały na zastosowaniu u chorych na czerniaki leków o działaniu ukierunkowanym niezależnie od genotypu. Obecnie taką taktykę zastąpiono badaniami, w których chorych dobiera się na podstawie profilu mutacji, co zaowocowało bardzo interesującymi wynikami.

#### Inhibitory MEK

Odkrycie często występujących w czerniaku mutacji *BRAF* i *NRAS* przyczyniło się do rozpoczęcia prac nad inhibitorami MEK, w tym AZD6244, CI-1040 i PD0325901. Uczestników tych wczesnych badań nie dobierano na podstawie genotypu i nie jest pewne, czy oceniane leki były w stanie skutecznie hamować MEK oraz fosforylację ERK w komórkach czerniaka w maksymalnych tolerowanych dawkach.<sup>78-80</sup> Uzyskane wyniki były rozczarowujące, odsetek obiektywnych odpowiedzi wyniósł bowiem 10%, a retrospektywne analizy genotypów w podgrupie leczonych chorych nie pozwoliły przewidzieć możliwych korzyści klinicznych. Dawkowanie inhibitorów MEK ograniczało występowanie biegunki i zaburzeń wzroku, w tym zakrzepicy żyły siatkówki w małej podgrupie chorych. U chorych na czerniaka z mutacją *BRAF* V600E oceniano niedawno inhibitor MEK trametynib, skuteczniej i trwale hamujący MEK i pERK w dawkach dopuszczalnych klinicznie. Wstępne wyniki wskazują na odpowiedź przekraczającą 20%.<sup>81,82</sup>

Planuje się rozpoczęcie randomizowanych badań z użyciem tego leku, które powinny ostatecznie określić czas trwania i częstość odpowiedzi klinicznych na hamowanie MEK u chorych na zaawansowany nowotwór.

#### Inhibitory BRAF

Sorafenib to pierwszy inhibitor RAF oceniany w badaniach klinicznych u chorych na czerniaka. Uczestników tych badań nie dobierano na podstawie genotypu. Ze względu na słabą wybiórczość wobec konformacji BRAF, aktywnej dzięki mutacji V600E, a także na działania dodatkowe, wyniki tych badań rozczarowały, a uzyskany odsetek odpowiedzi był bardzo niewielki.<sup>83</sup> Rezultaty randomizowanych badań oceniających działanie sorafenibu w połączeniu z chemioterapią były bardzo różne, a odsetek uzyskanych odpowiedzi nieduży, nie udowodniono też wpływu terapeutycznego wyieranego za pośrednictwem hamowania BRAF.<sup>31,84</sup>

Zachęcające wyniki przyniosły natomiast badania nad inhibitorami BRAF działającymi wybiórczo na aktywną konformację kinazy. Inhibitor BRAF wemurafenib (PLX4032) w maksymalnej tolerowanej dawce zapoczątkowuje silne hamowanie dalszego przekazywania sygnałów w szlaku sygnałowym BRAF. Potwierdzono to na podstawie hamowania pERK, redukcji Ki67 i hamowania pobierania glukozy przez przerzuty czerniaka (oznaczane za pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej z użyciem fluorodeoksyglukozy, fluoro-deoxyglucose positron emission tomography [FDG-PET])<sup>40,85</sup> (ryc. 2). W niedawnym badaniu fazy III przeprowadzonym z udziałem nieleczonych wcześniej chorych na czerniaka z mutacją *BRAF* V600E ( $n=675$ ) leczenie wemurafenibem (960 mg dwa razy na dobę) pozwoliło na uzyskanie odpowiedzi u 48% chorych.<sup>86</sup> Odsetek odpowiedzi w grupie kontrolnej leczonej dakarbazyną wyniósł 5%. Po 6 miesiącach przeżycie całkowite chorych przyjmujących te leki wyniosło odpowiednio 84 i 64%.<sup>86</sup> Równie imponujący wpływ na szlaki przekazywania sygnałów i odpowiedź obserwowano, podając inny wybiórczy inhibitor BRAF, dabrafenib (GSK2118436),<sup>45</sup> obecnie oceniany w badaniach klinicznych fazy III.

Co ciekawe, wszystkie inhibitory BRAF, w tym sorafenib, wemurafenib, dabrafenib i XL281, oceniane w badaniach klinicznych indukowały zmiany proliferacyjne w skórze, które bardzo przypominają raki płaskonabłonkowe skóry typu rogowiała kolczystokomórkowego (keratoacanthoma).<sup>39,45,85-87</sup> Często cechują się one szybkim wzrostem, a postępowanie polega na chirurgicznym usunięciu zmiany lub zastosowaniu innej metody terapii miejscowej. Nie poznano wprawdzie w pełni mechanizmu powstawania takich zmian w następstwie hamowania kinaz RAF, udowodniono jednak, że aktywacja szlaku przekazywania sygnałów

MAPK w wyniku zahamowania BRAF paradoksalnie może odgrywać rolę w rozwoju płaskonabłonkowego raka skóry (patrz niżej).<sup>46</sup>

#### Inhibitory KIT

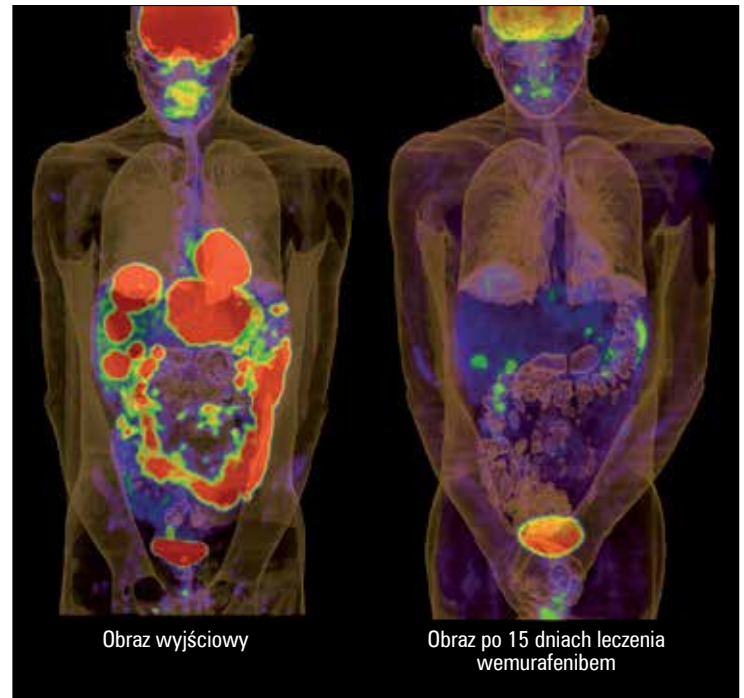
Wykazano, że hamowanie KIT przez inhibitory kinazy tyrozynowej indukuje odpowiedź kliniczną w czerniakach z mutacją KIT. Opisy pojedynczych przypadków oraz małych serii chorych wykazały obiektywne odpowiedzi na inhibitory KIT, imatynib i sorafenib.<sup>88-92</sup> Trwają badania z losowym doбором chorych, których celem jest ostateczne określenie, czy zahamowanie KIT wydłuża wolne od progresji przeżycie chorych na czerniaka (www.clinicaltrials.gov nr NCT01028222). Do leczenia GIST lub CML zarejestrowano dotychczas 5 inhibitorów KIT (imatynib, dazatynib, nilotynib, sorafenib i sunitynib). Cechują się one różnymi profilami wobec różnych mutacji KIT, co może pozwolić na dobór leku w zależności od indywidualnej mutacji KIT. Obserwowano odpowiedź kliniczną na leczenie sorafenibem chorych na czerniaka odbytu z przerzutami, cechującego się oporną na działanie imatynibu mutacją D820Y.<sup>91</sup>

#### OPORNOŚĆ I LECZENIE SKOJARZONE

Obecność aktywującej mutacji *BRAF* V600E pozwala na ogół przewidzieć wrażliwość na hamowanie BRAF, ale nie wszyscy chorzy na czerniaka z mutacją *BRAF* V600E odpowiadają na leczenie wemurafenibem. Udowodniono naturalną oporność niektórych chorych na działanie tego leku.<sup>85</sup> W przeprowadzonych niedawno badaniach przedklinicznych wykazano, że amplifikacja cykliny D1 (nawet w 17% czerniaków z mutacją *BRAF* V600E) lub utrata supresora nowotworów RB w połączeniu z utratą supresora nowotworów PTEN mogą się przyczyniać do rozwoju własnej oporności chorego na inhibitory BRAF.<sup>93-95</sup> W przypadku utraty PTEN wykazano, że hamowanie BRAF paradoksalnie aktywuje AKT, co zapobiega śmierci komórki na drodze supresji stężeń proapoptycznego białka BIM.<sup>94</sup>

Niemal wszyscy chorzy na czerniaka z mutacją *BRAF*, którzy odpowiadają na leczenie wemurafenibem, w końcu stają się oporni na działanie leków. Spostrzeżenia te odzwierciedlają wzorzec odpowiedzi obserwowany w leczeniu ukierunkowanym chorych na CML, GIST,<sup>96,97</sup> a ostatnio chorych na rdzeniaka,<sup>98,99</sup> gdy po początkowym okresie regresji nowotworu następuje nawrót. Jeszcze przed opracowaniem inhibitorów swoistych wobec BRAF wiadomo było, że zarówno czynniki wzrostu, jak i cytokiny mogą ocalić komórki czerniaka przed apoptozą następującą po indukowanym

RYCINA 2



Obrazy FDG-PET chorego uczestniczącego w badaniu klinicznym I fazy, w którym oceniano wemurafenib. Ukazano okolice występowania i rozmiary ognisk nowotworu przed rozpoczęciem podawania leku w dawce 960 mg dwa razy na dobę oraz po 15 dniach leczenia.

siRNA wyłączeniu genu *BRAF*.<sup>82,100,101</sup> Trwa wiele badań poświęconych mechanizmom nabytej oporności na inhibitory BRAF, zarówno w liniach komórek szpiczaka, jak i wycinkach pochodzących od chorych na czerniaka z mutacją *BRAF*, którzy nie odpowiadali na leczenie wemurafenibem. Opisano dużo potencjalnych mechanizmów oporności nabytej, w tym natężenie przekazywania sygnałów za pośrednictwem kinaz tyrozynowych receptorów (zarówno PDGFR $\beta$  i receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu 1 [insuline-like growth factor-1 receptor, IGF1R]), wystąpienie mutacji *de novo* w *NRAS*, nabycie nowych mutacji w *MEK1* i natężenie ekspresji MAP3K8 (inaczej COT).<sup>102-106</sup> Poznane mechanizmy oporności są zróżnicowane, jednak niemal wszystkie polegają na reaktywacji powszechnie występujących szlaków przekazywania sygnałów, o których już wiadomo, że pełnią ważną rolę w progresji czerniaka, takich jak MEK/ERK i PI3K/AKT/cel rapamycyny u ssaków (mammalian target for rapamycin, mTOR).<sup>106</sup> Dane pochodzące z badań przedklinicznych wskazują, że jednoczesne zahamowanie BRAF i MEK może zapobiec lub opóźnić wystąpienie oporności na PLX4720 i przełamać oporność, w której pośredniczą

mutacje *MEK1*, nadmierna ekspresja COT oraz nabycie *de novo* mutacji w genie *NRAS*.<sup>104,107,108</sup> Oporność, w której pośredniczy przekazywanie sygnałów w szlaku IGF1R, może natomiast zostać przełamana przez jednoczesne zahamowanie MEK+PI3K, a oporność, w której pośredniczy przekazywanie sygnałów przez PDGFR, można pokonać, ukierunkowując terapię na szlak mTOR/PI3K/AKT.<sup>103</sup> Wiele z tych mechanizmów reaktywuje MEK, podjęto więc badania fazy I i II nad zastosowaniem inhibitora BRAF (dabrafenibu) w połączeniu z inhibitorem MEK trametynibem (GSK1120212, NCT01072175) oraz wemurafenibu z inhibitorem MEK GDC-0973 (NCT01271803). Pojawiają się pierwsze sygnały przemawiające za skutecznością takiego leczenia skojarzonego. Podczas kongresu American Society of Clinical Oncology (ASCO) przedstawiono wyniki badania fazy I/II oceniającego skojarzenie trametynibu z dabrafenibu. Zastosowanie tych leków w dawkach wynoszących odpowiednio 150 i 1 mg przyniosło 77% odpowiedzi obiektywnych (odpowiedzi całkowite+odpowiedzi częściowe), a w dawkach wynoszących odpowiednio 150 i 2 mg 74%.<sup>46</sup> Co ważniejsze, połączenie inhibitora BRAF z inhibitorem MEK znacznie rzadziej powodowało wystąpienie raka płaskonabłonkowego skóry (<1%, *n*=109).<sup>46</sup> Wkrótce są planowane badania kliniczne łączące kojarzące BRAF z inhibitorami szlaku mTOR/PI3K/AKT.

Metody zmierzające do opanowania oporności czerniaków na leki różnią się od wykorzystywanego obecnie modelu leczenia chorych na inne nowotwory, u których powstała nabyta oporność, często w następstwie wtórnych mutacji w białkach, będących punktami uchwytu dla działania leków. Najlepiej znanym przykładem jest oporność na imatynib w przebiegu CML oraz *GIST*, do której dochodzi w wyniku mutacji *de novo* w tzw. genach będących stróżami genomu, odpowiednio *BCR-ABL* i *c-KIT*.<sup>96,109,110</sup> W badaniach przedklinicznych stwierdzono, że w *BRAF* taką funkcję pełni treonina w pozycji 529, dotychczas nie udowodniono jednak, że przewlekłe leczenie wemurafenibem chorych na czerniaka prowadzi do nabycia wtórnych mutacji w *BRAF* w tej właśnie pozycji lub jakiegokolwiek innej.<sup>32,85,102</sup>

#### DALSZE KIERUNKI

Znaczenie doboru chorych

Można sobie wyobrazić, że w przyszłości określenie molekularnego profilu nowotworu danego chorego stanie się nieodłącznym elementem doboru leczenia dla niego. Znaczenie takiego postępowania ukierunko-

wanego swoiście na czerniaka o konkretnym genotypie ilustrują najnowsze wyniki uzyskane w badaniach przedklinicznych. Wykazano w nich, że *BRAF* paradoksalnie aktywuje przekazywanie sygnałów w szlaku MAPK w nowotworach pozbawionych mutacji aktywujących *BRAF*. Doniesienia 6 niezależnych zespołów badawczych wykazują, że zahamowanie *BRAF* prowadzi do aktywacji MAPK w liniach komórkowych z mutacjami *NRAS* i *KRAS* oraz w tych liniach komórkowych, w których szlak MAPK jest aktywowany przez inne onkogeny, takie jak *HER2*.<sup>34,11-115</sup> Badania mechanistyczne ujawniły, że choć wemurafenib i inne inhibitory *BRAF* mogą silnie hamować aktywność kompleksów zawierających *BRAF* V600E w komórkach czerniaka, zamiast nich w komórkach z mutacjami *RAS* promują aktywność dimerów *CRAF-CRAF*, co prowadzi do aktywacji MEK.<sup>34,115</sup> Udowodniono też, że *PLX4032* zwiększa inwazyjny potencjał komórek czerniaka z mutacją *NRAS* na drodze aktywacji szlaków przekazywania sygnałów ERK i FAK.<sup>113</sup> W kolejnych badaniach stwierdzono, że inhibitory *BRAF* mogą się nawet przyczyniać do progresji nowotworów z mutacjami w *NRAS*, częściowo hamując apoptozę na drodze modulacji ekspresji *Mcl-1*.<sup>114</sup> Na podstawie tych spostrzeżeń niedawno opisano nową generację inhibitorów *BRAF*, które najszybciej zapobiegają paradoksalnej aktywacji przekazywania sygnałów przez szlak MAPK. Na razie niewiele o nich wiadomo, można jednak mieć nadzieję, że ich udoskonalony profil wybiórczości będzie zapobiegał powstawaniu płaskonabłonkowego raka skóry i opóźni wystąpienie oporności.

Przedstawione badania odgrywają niezwykle ważną rolę w opracowywaniu nowych metod walki z nowotworami, ich wyniki świadczą bowiem o tym, że prosta empiryczna ocena nowych leków może powodować uzyskanie niekorzystnych wyników. Potwierdza się natomiast słuszność racjonalnego tworzenia metod leczenia chorych na nowotwory, opartych na mocnych dowodach pochodzących z badań przedklinicznych, a także na profilach molekularnych poszczególnych chorych. Naprawdę nadszedł czas, by w leczeniu chorych na czerniaka zastosować indywidualne podejście.

#### PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Jasonowi Callahanowi i Rodowi Hicksowi za obrazy FDG-PET.

© Elsevier Inc. All rights reserved. This article from Seminars in Oncology 2012;39:204-214 The Current State of Targeted Therapy in Melanoma: This Time It's Personal by Keiran S. M. Smalley, Grant A. McArthur is translated and reprinted with permission of Elsevier.



PIŚMIENNICTWO

1. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003;22:3138–51.
2. Lin WM, Baker AC, Beroukhi R, et al. Modeling genomic diversity and tumor dependency in malignant melanoma. *Cancer Res* 2008;68:664–73.
3. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353:2135–47.
4. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:949–54.
5. Duensing S, Duensing A. Targeted therapies of gastrointestinal stromal tumors (GIST)—the next frontiers. *Biochem Pharmacol* 2010;80:575–83.
6. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031–7.
7. Yoshida T, Zhang G, Haura EB. Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer. *Biochem Pharmacol* 2010;80:613–23.
8. Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:875–85.
9. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:313–9.
10. Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004;116:855–67.
11. Rubinstein JC, Szol M, Pavlick AC, et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 2010;8:67.
12. Bhatt KV, Spofford LS, Aram G, McMullen M, Pumiha K, Aplin AE. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene* 2005;24:3459–71.
13. Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:133–42.
14. Smalley KSM. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003;104:527–32.
15. Boisvert-Adamo K, Aplin AE. Mutant B-RAF mediates resistance to anikins via Bad and Bim. *Oncogene* 2008;27:3301–12.
16. Wellbrock C, Ogilvie L, Hedley D, et al. V599E-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 2004;64:2338–42.
17. Hingorani SR, Jacobetz MA, Robertson GP, Herlyn M, Tuveson DA. Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* 2003;63:5198–202.
18. Karasarides M, Chioleches A, Hayward R, et al. B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 2004 Aug. 19;23(37):6292–8.
19. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuiltman T, van der Horst CM, et al. BRAF(V600E)-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005;436:720–4.
20. Dankort D, Curley DP, Cartledge RA, et al. Braf (V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet* 2009;41:544–52.
21. Landi MT, Bauer J, Pfeiffer RM, et al. MC1R germline variants confer risk for BRAF-mutant melanoma. *Science* 2006;313:521–2.
22. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* 2008;5:e120.
23. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29:1239–46.
24. King AJ, Patrick DR, Batorsky RS, et al. Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRAF by the kinase inhibitor SB-590885. *Cancer Res* 2006;66:11100–5.
25. Tsai J, Lee JT, Wang W, et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3041–6.
26. Haass NK, Sproesser K, Nguyen TK, et al. The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin Cancer Res* 2008;14:230–9.
27. Solit DB, Garraway LA, Pratilas CA, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 2006;439:358–62.
28. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64:7099–109.
29. Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599E-Braf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res* 2005;65:2412–21.
30. Smalley KS, Xiao M, Villanueva J, et al. CRAF inhibition induces apoptosis in melanoma cells with non-V600E BRAF mutations. *Oncogene* 2009;28:85–94.
31. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, et al. 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;27:2823–30.
32. Whittaker S, Kirk R, Hayward R, et al. Gatekeeper mutations mediate resistance to BRAF-targeted therapies. *Sci Transl Med* 2010;2:35ra41.
33. Paraiso KH, Fedorenko IV, Cantini LP, et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer* 2010;102:1724–30.
34. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 2010;464:427–30.
35. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res* 2008;68:4853–61.
36. Sondergaard JN, Nazarian R, Wang Q, et al. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAF(V600E) mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 2010;8:39.
37. Tap WD, Gong KW, Dering J, et al. Pharmacodynamic characterization of the efficacy signals due to selective BRAF inhibition with PLX4032 in malignant melanoma. *Neoplasia* 2010;12:637–49.
38. Yang H, Higgins B, Kolinsky K, et al. RG7204 (PLX4032), a selective BRAF(V600E) inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res* 2010;70:5518–27.
39. Schwartz GK, Robertson S, Shen A, et al. A phase I study of XL281, a selective oral RAF kinase in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2009;27:15:3513.
40. Bollag G, Hirth P, Tsai J, et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010;467:596–99.
41. Smalley KSM, Sondak VK. Melanoma—an unlikely poster child for targeted therapy. *N Engl J Med* 2010;363:876–78.
42. Smalley KS, Nathanson KL, Flaherty KT. Genetic subgrouping of melanoma reveals new opportunities for targeted therapy. *Cancer Res* 2009;69:3241–4.
43. Nathanson KL. Using genetics and genomics strategies to personalize therapy for cancer: focus on melanoma. *Biochem Pharmacol* 2010;80:755–61.
44. Villanueva J, Cipolla A, Kong J, et al. A kinase switch underlies acquired resistance to BRAF inhibitors. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009;22:136.
45. Kefford R, Arkenau H, Brown MB, et al. 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;28:15:8503.
46. Infante JR, Falchook GS, Lawrence DA, et al. Phase I/II Study of the oral MEK1/2 inhibitor GSK1120212 dosed in combination with the oral BRAF inhibitor GSK2118436. *J Clin Oncol* 2011;29:18S:CRA8503.
47. Jilaveanu L, Zito C, Lee SJ, et al. Expression of sorafenib targets in melanoma patients treated with carboplatin, paclitaxel and sorafenib. *Clin Cancer Res* 2009;15:1076–85.
48. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11–22.
49. Milagre C, Dhomen N, Geyer FC, et al. A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res* 2010;70:5549–57.
50. Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62:6997–7000.
51. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010;140:209–21.
52. Dumaz N, Hayward R, Martin J, et al. In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Res* 2006;66:9483–91.
53. Mishra PJ, Ha L, Rieker J, et al. Dissection of RAS downstream pathways in melanomagenesis: a role for Raf in transformation. *Oncogene* 2010;29:2449–56.
54. Chin L, Pomerantz J, Polsky D, et al. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility *in vivo*. *Genes Dev* 1997;11:2822–34.
55. Ackermann J, Fruttschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 2005;65:4005–11.
56. Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:541–55.
57. Smalley KSM, Eisen TG. Farnesyl transferase inhibitor SCH66336 is cytostatic, pro-apoptotic and enhan-

- ces chemosensitivity to cisplatin in melanoma cells. *Int J Cancer* 2003;105:165–75.
58. Hoefflich KP, O'Brien C, Boyd Z, et al. *In vivo* anti-tumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin Cancer Res* 2009;15:4649–64.
59. Engelman JA, Chen K, Tan X, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat Med* 2008;14:1351–6.
60. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kjavini NM, et al. Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. *PLoS One* 2009;4:e5717.
61. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24:4340–6.
62. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ, Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:1692–703.
63. Torres-Cabala CA, Wang WL, Trent J, et al. Correlation between KIT expression and KIT mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. *Mod Pathol* 2009;22:1446–56.
64. Antonescu CR, Busam KJ, Francone TD, et al. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int J Cancer* 2007;121:257–64.
65. Jiang X, Zhou J, Yuen NK, et al. Imatinib targeting of KIT-mutant oncoprotein in melanoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:7726–32.
66. Woodman SE, Davies MA. Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics. *Biochem Pharmacol* 2010;80:568–74.
67. Handolias D, Salemi R, Murray W, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:210–5.
68. Alexeev V, Yoon K. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol* 2006;126:1102–10.
69. Monsel G, Ortonne N, Bagot M, Bensussan A, Dumaz N. c-Kit mutants require hypoxia-inducible factor 1alpha to transform melanocytes. *Oncogene* 2010;29:227–36.
70. Ashida A, Takata M, Murata H, Kido K, Saida T. Pathological activation of KIT in metastatic tumors of acral and mucosal melanomas. *Int J Cancer* 2009;124:862–8.
71. Woodman SE, Trent JC, Stemke-Hale K, et al. Activity of dasatinib against L576P KIT mutant melanoma: molecular, cellular, and clinical correlates. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2079–85.
72. Smalley KS, Contractor R, Nguyen TK, et al. Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclindependent kinase-4 overexpression. *Cancer Res* 2008;68:5743–52.
73. Rimoldi D, Salvi S, Lienard D, et al. Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res* 2003;63:5712–5.
74. Pache M, Glatz K, Bosch D, et al. Sequence analysis and high-throughput immunohistochemical profiling of KIT (CD 117) expression in uveal melanoma using tissue microarrays. *Virchows Arch* 2003;443:741–4.
75. All-Ericsson C, Girnita L, Muller-Brunotte A, et al. c-Kit-dependent growth of uveal melanoma cells: a potential therapeutic target? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2075–82.
76. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, et al. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* 2009;457:599–602.
77. Onken MD, Worley LA, Long MD, et al. Oncogenic mutations in GNAQ occur early in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:5230–4.
78. Lorusso PM, Adjei AA, Varterasian M, et al. Phase I and pharmacodynamic study of the oral MEK inhibitor CI-1040 in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2005;23:5281–93.
79. Rinehart J, Adjei AA, Lorusso PM, et al. Multicenter phase II study of the oral MEK inhibitor, CI-1040, in patients with advanced non-small-cell lung, breast, colon, and pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:4456–62.
80. Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol* 2008;26:2139–46.
81. Infante JR, Fecher LA, Nallapareddy S, et al. Safety and efficacy results from the first-in-human study of the oral MEK 1/2 inhibitor GSL1120212. *J Clin Oncol* 2010;28:15s:2503.
82. Gilmartin AG, Bleam MR, Groy A, et al. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained *in vivo* pathway inhibition. *Clin Cancer Res* 2011;17:989–1000.
83. Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT, et al. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer* 2006;95:581–6.
84. McDermott DF, Sosman JA, Gonzalez R, et al. 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;26:2178–85.
85. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–19.
86. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364:2507–16.
87. Arnault JB, Mateus C, Wechsler J, et al. Paradoxical cutaneous squamous cell proliferations in patients treated with sorafenib. *J Clin Oncol* 2009;27:15s:9564.
88. Hodi FS, Friedlander B, Corless CL, et al. Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol* 2008;26:2046–51.
89. Quintas-Cardama A, Lazar AJ, Woodman SE, Kim K, Ross M, Hwu P. Complete response of stage IV anal mucosal melanoma expressing KIT Val560Asp to the multikinase inhibitor sorafenib. *Nat Clin Pract* 2008;5:737–40.
90. Lutzky J, Bauer J, Bastian BC. Dose-dependent, complete response to imatinib of a metastatic mucosal melanoma with a K642E KIT mutation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21:492–3.
91. Handolias D, Hamilton AL, Salemi R, et al. Clinical responses observed with imatinib or sorafenib in melanoma patients expressing mutations in KIT. *Br J Cancer* 2010;102:1219–23.
92. Satzger I, Kuttler U, Volker B, Schenck F, Kapp A, Gutzmer R. Anal mucosal melanoma with KIT-activating mutation and response to imatinib therapy—case report and review of the literature. *Dermatology* 2010;220:77–81.
93. Smalley KS, Lioni M, Palma MD, et al. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2876–83.
94. Paraiso KH, Xiang Y, Rebecca VW, et al. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. *Cancer Res* 2011;71:2750–60.
95. Xing F, Persaud Y, Pratilas CA, et al. Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring (V600E)BRAF. *Oncogene* 2011 Jul 4. doi: 10.1038/onc.2011.250.
96. Bauer S, Duensing A, Demetri GD, Fletcher JA. KIT oncogenic signaling mechanisms in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor: PI3-kinase/AKT is a crucial survival pathway. *Oncogene* 2007;26:7560–8.
97. Sawyers C. Targeted cancer therapy. *Nature* 2004;432:294–7.
98. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* 2009;361:1173–8.
99. Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alick B, et al. Smoothed mutation confers resistance to a hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science* 2009;326:572–74.
100. Christensen C, Guldberg P. Growth factors rescue cutaneous melanoma cells from apoptosis induced by knockdown of mutated (V 600 E) B-RAF. *Oncogene* 2005;24:6292–302.
101. Gray-Schopfer VC, Karasarides M, Hayward R, Marais R. Tumor necrosis factor-alpha blocks apoptosis in melanoma cells when BRAF signaling is inhibited. *Cancer Res* 2007;67:122–9.
102. Nazarian R, Shi H, Wang Q, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010;468:973–77.
103. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 2010;18:683–95.
104. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010;468:968–72.
105. Wagle N, Emery C, Berger MF, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol* 2011;29:3085–96.
106. Fedorenko IV, Paraiso KH, Smalley KS. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol* 2011;82:201–9.
107. Paraiso KH, Fedorenko IV, Cantini LP, et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer* 2010;102:1724–30.
108. Emery CM, Vijayendran KG, Zipsper MC, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:20411–6.
109. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia,

potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell* 2009;16:401–12.

110. Michor F, Hughes TP, Iwasa Y, et al. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature* 2005;435:1267–70.

111. Carnahan J, Beltran PJ, Babij C, et al. Selective and potent Raf inhibitors paradoxically stimulate normal cell proliferation and tumor growth. *Mol Cancer Ther* 2010;9:2399–410.

112. Heidorn SJ, Milagre C, Whittaker S, et al. Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* 2010;140:209–21.

113. Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, et al. PLX4032, a selective BRAF(V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:190–200.

114. Kaplan FM, Shao Y, Mayberry MM, Aplin AE. Hyperactivation of MEK-ERK1/2 signaling and resistance to apoptosis induced by the oncogenic B-RAF inhibitor, PLX4720, in mutant N-Ras melanoma cell lines. *Oncogene* 2010;30:366–71.

115. Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464:431–5.