



BIULETYN
Wydziału Farmaceutycznego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Biul. Wyzd. Farm. WUM, 2016, 8, 52-56
<http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/>

WEMURAFENIB JAKO SELEKTYWNY INHIBITOR KINAZY SERONINOWO-TREONINOWEJ B-RAF STOSOWANY W LECZENIU CZERNIAKA

Krzysztof Kubica*, Aleksander Mazurek

Zakład Chemii Leków, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Banacha 1, 02-097 Warszawa

* autor korespondujący, tel: +48 505 430 166, e-mail: krzysztof.pawel.kubica@gmail.com

Otrzymany 27.06.2016, zaakceptowany 26.08.2016, zamieszczony 2.12.2016

STRESZCZENIE

Kinazy białkowe są obecnie drugą co do ważności grupą białek stanowiących cel ukierunkowanych molekularnie terapii przeciwnowotworowych. Hamowanie ich aktywności okazało się ważnym punktem w podejściu do leczenia tych chorób. Wemurafenib jest niezwykle skutecznym lekiem w terapii czerniaka, dzięki ograniczeniu jego działania jedynie do białka B-RAF. Wykazuje stosunkowo nieduże działania niepożądane. Największym problemem jest występowanie rozwijającej się oporności komórek nowotworowych na ten lek. Rozwiązaniem wydaje się być wprowadzenie terapii kombinowanych, które będą stanowić przyszłość w leczeniu czerniaka inhibitorami kinaz białkowych.

SŁOWA KLUCZOWE: czerniak, kinazy białkowe, inhibitory kinaz białkowych, wemurafenib

ABSTRACT

WEMURAFENIB AS A SELECTIVE INHIBITOR OF THE SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE B-RAF, USED IN THE TREATMENT OF MELANOMA

Protein kinases are now the second most important group of proteins targeted in molecular-level anticancer therapies. Inhibiting the activity of protein kinases emerged as an important aspect of anticancer therapy. Vemurafenib is particularly effective in treating melanoma because its inhibitory activity is limited only to the B-RAF protein. It has relatively minor side effects. The biggest problem is an increasing resistance of tumor cells to this drug. The solution may involve combination therapies that will likely constitute the preferred future treatment of melanoma by inhibitors of protein kinases.

KEYWORDS: melanoma, protein kinases, protein kinase inhibitors, vemurafenib

1. Charakterystyka choroby

Czerniak, zwany też czerniakiem złośliwym (łac. *melanoma malignum*) to złośliwy nowotwór skóry, błon śluzowych lub błony naczyniowej oka, wywodzący się z melanocytów. Staje się on coraz poważniejszym problemem wielu krajów świata. Stanowi od 5% do 7% nowotworów złośliwych skóry. Co 12 miesięcy obserwuje się wzrost częstotliwości zachorowań na czerniaka w zakresie od 2 do 8% [1,2]. Corocznie w Stanach Zjednoczonych rozpoznaje się ponad 75 000 przypadków tej choroby, większość u osób rasy białej [3-5]. W Europie każdego roku czerniak diagnozowany jest u około 26100 mężczyzn i 33300 kobiet, powodując odpowiednio 8300 i 7600 zejść śmiertelnych [6]. Czerniak u ludzi w wieku poniżej 40 lat występuje rzadko, choroba jest diagnozowana najczęściej pomiędzy siedemdziesiątym a osiemdziesiątym rokiem życia. Najczęściej pojawia się na skórze niezmienionej, choć może powstać w obrębie znamion barwnikowych. Podejrzenie czerniaka budzi pojawienie się nowej zmiany skórnej, przypominającej atypowe znamię lub metamorfoza wcześniej istniejącego znamienia barwnikowego. Do głównych objawów czerniaka należą: asymetryczne zabarwienie, kształt i powierzchnia zmiany, jej wypuklenie ponad otaczającą skórę, nieregularne ograniczenie krawędzi lub duży wymiar. Również świąd, ból, krwawienie i owrozczenie w obrębie znamienia

lub nowej zmiany skórnej budzą podejrzenie złośliwego charakteru [7].

2. Czynniki ryzyka

Głównymi czynnikami ryzyka są ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe pochodzące ze słońca lub sztucznych źródeł i indywidualna podatność na nowotwór, przede wszystkim przez zwiększone ryzyko genetyczne [8-10]. Intensywna, przerywana ekspozycja na promieniowanie ultrafioletowe prowadząca do oparzenia słonecznego, szczególnie w okresie dzieciństwa, wiąże się z większym ryzykiem zachorowania niż wieloletnia regularna ekspozycja [11-13]. Nowotwór ma łagodniejszy przebieg u kobiet [14].

3. Rozpoznanie i metody leczenia

Rozpoznanie kliniczne jest oparte głównie na badaniu dermatoskopowym, a pozostałe badania pełnią rolę pomocniczą. Podejrzana zmiana jest wycinana z niewielkim marginesem zdrowych tkanek, a próbka badana histopatologicznie. Badanie to umożliwia ostateczne rozpoznanie choroby oraz ocenę wielu czynników o charakterze rokowniczym [8,15,16].

Podstawową metodą leczenia czerniaka jest radykalne wycięcie guza z odpowiednio szerokim marginesem zdrowych tkanek. W przypadku choroby nieoperacyjnej lub

obecności przerzutów odległych stosuje się leczenie ogólnoustrojowe oparte na nowoczesnych lekach celowanych, dobieranych indywidualnie dla każdego chorego w oparciu o rodzaj występującej mutacji, będącej przyczyną nowotworu i obraz kliniczny choroby. Wykorzystywanych jest kilka grup leków celowanych: inhibitory BRAF (kinazy serotoninowo-treoninowej B-Raf) - wemurafenib, dabrafenib; inhibitory MEK (kinaz aktywowanych mitogenami) - trametynib; przeciwciała blokujące antygen CTLA-4 (ipilimumab); przeciwciała anty-PD-1 (inhibitory receptora programowanej śmierci) - pembrolizumab, niwolumab oraz inhibitory protoonkogenu c-KIT - imatynib. W leczeniu stosuje się również klasyczną immunoterapię opartą o interferon-alfa i interleukinę-2. Klasyczna chemioterapia jest stosowana u chorych nieodpowiadających na leki celowane i immunoterapię.

Zapobieganie polega na unikaniu nadmiernego wystawiania się na działanie promieniowania słonecznego.

4. Inhibitory kinaz białkowych jako leki przeciwnowotworowe

Kinazy białkowe biorą udział w reakcji fosforylacji cząsteczki białka specyficznego dla danej kinazy. Są one zaliczane do nadrodziny białek enzymatycznych klasyfikowanych jako fosfotransferazy. Katalizują przeniesienie reszty fosforanowej z ATP (adenozyno-5'-trifosforan) lub GTP (guanozyno-5'-trifosforan) na specyficzne białka będące substratami tego procesu. W zależności od rodzaju aminokwasu, do którego przyłączana jest reszta fosforanowa, kinazy zostały podzielone na cztery główne grupy: serotoninowo/treoninowe, tyrozynowe, histydynowe (fosforylują również reszty lizyny i argininy) oraz asparaginianowo/glutaminianowe [17]. Mechanizm fosforylacji polega na ataku nukleofilowym tlenu grupy hydroksylowej na γ -fosforan ATP. Fosforylowana grupa hydroksylowa jest aktywowana przez katalityczną zasadową resztę asparaginianu. Jest to reakcja kowalencyjna, zapewniająca stabilną modyfikację, prowadzącą do zmiany konformacji białka i, w konsekwencji, modyfikacji jego aktywności, zdolności do wiązania się z innymi białkami lub przemieszczenia cząsteczki w obrębie komórki. Odłączenie reszty fosforanowej zachodzi na drodze hydrolizy wiązania estrowego przeprowadzonego przez fosfatazy.

Większość szlaków metabolicznych komórki, zwłaszcza sygnalizacyjnych, angażuje enzymy z grupy kinaz białkowych. Ich funkcja podlega wielostopniowej regulacji, również angażującej kinazy i fosfatazy białkowe. Fosforylacja białka może zwiększać albo zmniejszać jego aktywność. Do domen regulatorowych kinaz mogą również przyłączać się białka aktywatorowe lub inhibitorowe, wpływające na ich aktywność [18]. Deregulacja aktywności kinaz jest częstą przyczyną chorób, zwłaszcza nowotworowych.

Kinazy białkowe są obecnie drugą co do ważności, zaraz po receptorach sprzężonych z białkami G (GPCR, ang. *G-protein coupled receptors*), grupą białek stanowiących cel ukierunkowanych molekularnie terapii przeciwnowotworowych [19]. Hamowanie ich aktywności okazało się ważnym punktem w terapii przeciwnowotworowej. Dzięki postępowi wiedzy o roli kinaz w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowym w warunkach zdrowia i patologii opracowano nowe terapie [20,21]. W ostatnich latach ponad 100 potencjalnych inhibitorów kinaz białkowych znalazło się na różnych etapach badań klinicznych [22-24]. Ponad 20 z nich to blokery kieszeni ATP enzymu [25].

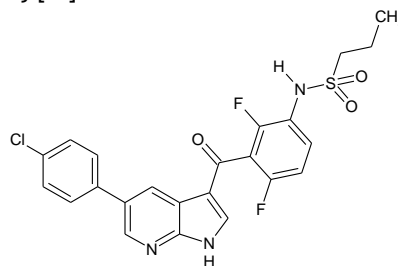
Białko BRAF (kinaza serotoninowo-treoninowa B-Raf) jest enzymem należącym do grupy kinaz RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*), biorących udział w przekazywaniu sygnału do wzrostu i podziału komórki. Wchodzi w skład rodziny kinaz serotoninowo-treoninowych RAF, które z kolei są częścią szlaku sygnałowego kinaz aktywowanych mitogenami - MAPK [26]. Prawidłowa kinaza BRAF reaguje tylko na zewnętrzny sygnał, dzięki czemu cały proces wzrostu i podziału komórek znajduje się pod ścisłą kontrolą. W przypadku zmutowanego genu produktem jest nieprawidłowe białko, którego funkcja jest zaburzona [27]. Zmienione białko przekazuje sygnał do podziału komórki w sposób niekontrolowany i niepożądanym. Skutkiem jest rozwój nowotworu, a w konsekwencji powstanie przerzutów odległych [28,29].

Potwierdzenie obecności mutacji BRAF dokonuje się dzięki analizie DNA tkanki nowotworowej pobranej podczas operacji chirurgicznej. Ponad połowa zdiagnozowanych czerniaków posiada mutację BRAF [30].

Coraz większa wiedza na temat biologii czerniaka i roli zmutowanego białka BRAF skłania świat medycyny do poszukiwania leku ukierunkowanego molekularnie (terapia celowana) na blokowanie procesu, u którego podstaw stoi wyżej wymieniona mutacja. Pierwszym badanym wielokinasowym inhibitorem był sorafenib [31]. Mimo tego, że lek świetnie sobie poradził w początkowych stadiach choroby, niestety nie wykazał oczekiwanych rezultatów u pacjentów z rozsiałym czerniakiem w fazie 4. Zmusiło to badaczy do poszukiwania bardziej selektywnych inhibitorów BRAF.

5. Wemurafenib - selektywny inhibitor BRAF stosowany w terapii czerniaka

Wemurafenib - N-[3-[5-(4-chlorofenylo)-1H-pirol[2,3-b]pirydyno-3-karbonylo]-2,4-difluorofenylo]-propanosulfonamid (ryc. 1, na etapie badań klinicznych oznaczany jako PLX4032) jest wysoce specyficznym inhibitorem BRAF [32,33]. O pozwolenie na dopuszczenie do obrotu wystąpiła firma Roche powołując się na wyniki badania klinicznego trzeciej fazy, opublikowane w 2011 roku [34,35]. Związek został zatwierdzony do leczenia czerniaka w sierpniu 2011 w Stanach Zjednoczonych oraz lutym 2012 na terenie Unii Europejskiej [23].



Ryc.1. Wzór chemiczny wemurafenibu.

Wemurafenib jest przełomowym osiągnięciem w terapii czerniaka ze względu na ograniczenie jego działania jedynie do białka B-RAF. Selektowność ta spowodowała powstanie leku o wielokrotnie większej skuteczności w porównaniu do dostępnych substancji, jednocześnie charakteryzującym się niewielkimi działaniami niepożądanymi. Odkrycie wemurafenibu było punktem zwrotnym, które zapoczątkowało poszukiwanie leków przede wszystkim o wysokiej selektywności działania.

5.1. Mechanizm działania

Wemurafenib powoduje programowaną śmierć komórek nowotworowych czerniaka [36]. Działa tylko u pacjentów z mutacją BRAF V600E (mutacja polegająca na zastąpieniu waliny w pozycji 600 białka B-Raf na kwas glutaminowy) oraz rzadziej występującą mutacją V600K (w tym przypadku walina zastąpiona jest przez lizynę) [37-39]. Komórki czerniaka bez tych mutacji nie są podatne na działanie leku. Może on paradoksalnie stymulować wzrost guza w przypadku występowania białka BRAF w normalnej, niezmutowanej postaci [40,41].

Jedną z wad selektywnych inhibitorów BRAF jest możliwość rozwinięcia się tolerancji komórek na lek. Do tej pory odkryto 3 mechanizmy wykształcania oporności: nadekspresja genu kodującego białko powierzchniowe PDGFRB (*beta-type platelet-derived growth factor receptor*), mutacja onkogenu NRAS, powodującego przywrócenie normalnej sekwencji sygnałowej BRAF [42] oraz sekrecja czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) przez komórki podścieliska [43,44]. Podejrzewa się również istotny udział glutaminy w mechanizmie wytwarzania oporności na lek [45].

5.2. Skuteczność

W badaniu klinicznym pierwszej fazy, przeprowadzonym na 16 uczestnikach, wemurafenib istotnie redukował liczbę komórek nowotworowych u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem, powodując wydłużenie średniego czasu przeżycia o 6 miesięcy w porównaniu z grupą kontrolną [46,47]. W drugim badaniu klinicznym pierwszej fazy badano odpowiedź na wemurafenib u 49 pacjentów z mutacją BRAF V600E. Średni czas przeżycia w grupie przyjmującej lek był ponad 7 miesięcy dłuższy [48]. W badaniu klinicznym drugiej fazy na 132 chorych na wcześniej leczonego uogólnionego czerniaka z mutacją BRAF lek wykazał 53% odsetek odpowiedzi obiektywnej, średni czas przeżycia wolny od progresji choroby wyniósł 6,8 miesiąca, a mediana przeżycia całkowitego wyniosła 15,9 miesięcy [49]. Gorszą odpowiedź na leczenie zaobserwowano u chorych z podniesionym poziomem dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy krwi, 1,5-krotnie powyżej górnej granicy normy [30]. W badaniu klinicznym trzeciej fazy, 2107 chorych losowo przydzielono do jednej z dwóch grup. Pacjentom z pierwszej grupy podawano wemurafenib, z drugiej - dakarbazynę. Sześciomiesięczny odsetek przeżycia całkowitego leczonych wemurafenibem wyniósł 84%, podczas gdy leczonych dakarbazyną 64%. Również średni czas przeżycia całkowitego był lepszy w pierwszym przypadku i wynosił odpowiednio 13,2 miesiąca oraz 9,6 miesięcy [35].

5.3. Farmakokinetyka oraz dawkowanie

Stwierdzono, że średni okres półtrwania wemurafenibu wynosi 51,6 godziny i wykazuje dużą zmienność osobniczą [50]. Obserwuje się zależność między wartością stężenia leku we krwi a skutecznością jego działania [51], jednak jego wartość charakteryzuje się również dużą zmiennością osobniczą. Warto zwrócić uwagę na fakt, że zmniejszenie dawki leku powoduje jedynie nieznaczny spadek wartości jego stężenia w stanie stacjonarnym [50]. Wykazano również wpływ pokarmów o wysokiej zawartości tłuszczu na wartości farmakokinetyczne wemurafenibu [52]. Zalecany schemat dawkowania zakłada podawanie 960 mg leku doustnie, dwa razy dziennie [30].

5.4. Działania niepożądane

W badaniu przeprowadzonym w 2012 roku na grupie 42 pacjentów stwierdzono niekorzystne działania wemurafenibu. U wszystkich pacjentów przyjmujących lek wystąpiła przynajmniej jedna reakcja skórna. Najczęstszą występującą zmianą były brodawczaki (79%), oraz reakcje skórne występujące na rękach oraz stopach (60%). Częstymi efektami niepożądanymi była rozległa wysypka (55%), nadwrażliwość na światło (52%), łysienie (45%) oraz torbiele naskórkowe (33%) [53].

Występowanie niekorzystnych reakcji skórnych można tłumaczyć zaburzeniem procesu rogowacenia występującego przy nieprawidłowym przekazywaniu sygnałów na szlaku kinaz białkowych aktywowanych mitogenem, występującym przy stosowaniu inhibitorów BRAF [54].

W badaniu przeprowadzonym w 2013 roku na 520 pacjentach, zmiany skórne były dominującym efektem niepożądanym w terapii [55]. Nie zaobserwowano korelacji między częstością występowania działań niepożądanych a skutecznością działania leku, którą to zależność zaobserwowano w przypadku stosowania inhibitorów receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR) [50]. Wemurafenib wydaje się również być nefrotoksyczny, zwłaszcza u pacjentów płci męskiej cierpiących na czerniaka, wobec czego zaleca się kontrolę stanu nerek oraz poziomu elektrolitów podczas terapii tym lekiem [56].

5.5. Leczenie skojarzone

Wobec pojawiającej się oporności komórek nowotworowych na inhibitory BRAF, zaczęto podejmować próby terapii kombinowanej, w której stosuje się wemurafenib wraz z inhibitorami MEK. Jednoczesne podawanie kobimektynib z wemurafenibem skutkowało znaczącym wydłużeniem czasu przeżycia wśród chorych [33,57].

6. Podsumowanie

Zachorowalność na czerniaka wykazuje stałą tendencję wzrostową, w konsekwencji choroba ta będzie stanowić coraz poważniejszy problem. Połowa znanych ludzkich genów kodujących kinazy jest powiązana z nowotworami i innymi chorobami. Efektem tego faktu będzie rosnąca rola kinaz białkowych jako celu ukierunkowanych molekularnie terapii przeciwnowotworowych. Początkowe sukcesy inhibitorów kinaz białkowych, takich jak sorafenib, zostały osłabione przez brak ich selektywności. Wemurafenib jest niezwykle skuteczny w terapii dzięki ograniczeniu jego działania jedynie do białka B-RAF. Wykazuje stosunkowo nieduże działania niepożądane. Największym problemem jest występowanie rozwijającej się oporności komórek nowotworowych na ten lek. Rozwiązaniem wydaje się być wprowadzenie terapii kombinowanych, polegających na leczeniu skojarzonym przy użyciu inhibitora BRAF wraz z inhibitorem MEK. Pierwsze badania z zastosowaniem tego schematu leczenia przynoszą obiecujące rezultaty. Należy się spodziewać, że terapia kombinowana będzie optymalnym sposobem postępowania w leczeniu czerniaka inhibitorami kinaz białkowych.

7. Wykaz skrótów

BRAF	Kinaza serotonowo-treoninowa B-Raf
ATP	Adenozyno-5'-trifosforan

GTP	Guanozyno-5'-trifosforan
GCPR	Receptory sprzężone z białkami G (ang. <i>G-protein coupled receptors</i>)
RAF	Kinazy będące częścią szlaku MAPK
MAPK	Kinazy aktywowane mitogenami (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
PDGFRB	Receptor beta płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. <i>beta-type platelet-derived growth factor receptor</i>)
HGF	Czynnik wzrostu hepatocytów
LDH	Dehydrogenaza mleczanowa
EGFR	Nabłonkowy czynnik wzrostu
MEK	Kinaza wchodząca w skład szlaku sygnałowego MAPK

8. Bibliografia

- Linou E, Swetter SM, Cockburn MG, Colditz GA, Clarke CA. Increasing burden of melanoma in the United States. *J Invest Dermatol* 2009, 129(7), 1666-1674.
- Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 2009, 27(1), 3-9.
- Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, Bray F. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer* 2013, 132(2), 385-400.
- Bucheit AD, Davies MA. Emerging insights into resistance to BRAF inhibitors in melanoma. *Biochem Pharmacol* 2014, 87(3), 381-389.
- Cancer Facts and Figures 2016. American Cancer Society 2016.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001, 94(2), 153-156.
- Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: The role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin* 1985, 35(3), 130-151.
- Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *The Lancet* 2005, 365(9460), 687-701.
- Ford D, Bliss JM, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Franceschi S, Green A, Holly EA, Mack T, MacKie RM. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* 1995, 62(4), 377-381.
- Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of familial melanoma. *Dermatol Clin* 1995, 13(3), 605-612.
- Armstrong BK, Kricger A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 2001, 63(1-3), 8-18.
- Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003, 22(20), 3042-3052.
- Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pintel D, Bastin BC. Improving Melanoma Classification by Integrating Genetic and Morphologic Features. *PLOS Med* 2008, 5(6), e120.
- Azoury SC, Lange JR. Epidemiology, risk factors, prevention, and early detection of melanoma. *Surg Clin North Am* 2014, 94(5), 945-962.
- Michael Binder, Scott Menzies. Computer aided instrumentation for the diagnosis of primary melanoma. CRC Press 2003, 234-240.
- Cook MG, Clarke TJ, Humphreys S, Fletcher A, McLaren KM, Smith NP, Stevens A, Theaker JM, Melia J. The evaluation of diagnostic and prognostic criteria and the terminology of thin cutaneous malignant melanoma by the CRC Melanoma Pathology Panel. *Histopathology* 1996, 28(6), 497-512.
- Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2003.
- Ubersax JA, Ferrell Jr JE. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8(7), 530-541.
- Cohen P. Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 2002, 1(4), 309-315.
- Zhang J, Yang PL, Gray NS. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2009, 9(1), 28-39.
- Hidaka H, Kobayashi R. Pharmacology of Protein Kinase Inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992, 32(1), 377-397.
- Li R, Stafford JA, editors. Protein Inhibitor Drugs 2009.
- Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, Hirth P. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2012, 11(11), 873-886.
- Force T, Kuida K, Namchuk M, Parang K, Kyriakis JM. Inhibitors of Protein Kinase Signaling Pathways Emerging Therapies for Cardiovascular Disease. *Circulation* 2004, 109(10), 1196-1205.
- Traxler P. Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures. *Expert Opin Ther Targets* 2003, 7(2), 215-234.
- Kosela H, Świtaj T, Rutkowski P. BRAF and MEK inhibitors in therapy of advanced melanoma. *Oncol Clin Pract* 2011, 7(5), 246-253.
- Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall C, Springer CJ, Barford D, Marais R. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell* 2004, 116(6), 855-867.
- Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007, 26(22), 3100-3112.
- Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004, 6(4), 313-319.
- Swaika A, Crozier JA, Joseph RW. Vemurafenib: an evidence-based review of its clinical utility in the treatment of metastatic melanoma. *Drug Des Devel Ther* 2014, 8, 775-787.
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008, 7(10), 3129-3140.
- Niezgoda A, Niezgoda P, Czajkowski R. Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy. *BioMed Res Int BioMed Res Int* 2015.
- Richman J, Martin-Liberal J, Diem S, Larkin J. BRAF and MEK inhibition for the treatment of advanced BRAF mutant melanoma. *Expert Opin Pharmacother* 2015, 16(9), 1285-1297.
- da Rocha Dias S, Salmonson T, van Zwieten-Boot B, Jonsson B, Marchetti S, Schellens JHM, Giuliani R, Pignatti F. The European Medicines Agency review of vemurafenib (Zelboraf®) for the treatment of adult patients with BRAF V600 mutation-positive unresectable or metastatic melanoma: Summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *Eur J Cancer* 2013, 49(7), 1654-1661.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont A, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med* 2011, 364(26), 2507-2516.
- Sala E, Mologni L, Truffa S, Gaetano C, Bollag GE, Gambacorti-Passerini C. BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells. *Mol Cancer Res MCR* 2008, 6(5), 751-759.
- Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, He Y, Burrall B, Duong C, Kloiox AM, Sultani H, Wilken R, Martinez SR, Patel F. Metastatic melanoma - a review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol* 2015, 95(5), 516-524.
- McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto PA, Garbe C, Testori A, Maio M, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, O'Day SJ, Kirkwood JM, Eggermont A, Dreno B, Sosman JA, Flaherty KT, Yin M, Caro I, Cheng S, Trunzer K, Hauschild A. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAFV600E and BRAFV600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 2014, 15(3), 323-332.
- Ravnan MC, Mataka MS. Vemurafenib in Patients With BRAF V600E Mutation-Positive Advanced Melanoma. *Clin Ther* 2012, 34(7), 1474-1486.
- Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, Ludlam MJC, Stokoe D, Gloor SL, Vigers G, Morales T, Aliagas I, Liu B, Sideris S, Hoeflich KP, Jaiswal BS, Seshagiri S, Koeppen H, Belvin M, Friedman LS, Malek S. RAF inhibitors prime

- wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010, 464(7287), 431-435.
41. Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, Krauthammer M, McCusker JP, Kluger Y, Sznol M. 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(2), 190-200.
 42. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010, 468(7326), 973-977.
 43. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, Davis A, Mongare MM, Gould J, Frederick DT, Cooper ZA, Chapman PB, Solit DB, Ribas A, Lo RS, Flaherty KT, Ogino S, Wargo JA, Golub TR. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012, 487(7408), 500-504.
 44. Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffatt J, Sutherin DP, Koepfen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012, 487(7408), 505-509.
 45. Hernandez-Davies JE, Tran TQ, Reid MA, Rosales KR, Lowman XH, Pan M, Moriceau G, Yang Y, Wu J, Lo RS, Kong M. Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence. *J Transl Med* 2015, 13:210. 1-11
 46. Garber K. Melanoma Drug Vindicates Targeted Approach. *Science* 2009, 326(5960), 1619-1619.
 47. Flaherty K, Puzanov I, Sosman J, Kim K, Ribas A, McArthur G, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Phase I study of PLX4032: Proof of concept for V600E BRAF mutation as a therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010, 28(1). suppl; abstr nr 9000.
 48. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 2010, 363(9), 809-819.
 49. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos S, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A. Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *N Engl J Med* 2012, 366(8), 707-714.
 50. Funck-Brentano E, Alvarez JC, Longvert C, Abe E, Beauchet A, Funck-Brentano C, Saiag P. Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 2015, 26(7), 1470-1475.
 51. Kramkimel N, Sakji L, Schoemann A, Golmard J, Rosencher E, Theodore C, Goldwasser F. Severe skin rash during vemurafenib treatment: A predictive factor of early positive response in metastatic melanoma? *J Clin Oncol* 2014, 32(5). suppl; abstr nr 9092.
 52. Ribas A, Zhang W, Chang I, Shirai K, Ernstoff MS, Daud A, Cowey CL, Daniels G, Seja E, O'Laco E, Glaspy JA, Chmielowski B, Hill T, Joe AK, Grippo JF The effects of a high-fat meal on single-dose vemurafenib pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol* 2014, 54(4), 368-374.
 53. Boussemart L, Routier E, Mateus C, Opletalova K, Sebille G, Kamsukom N, Thomas M, Vagner S, Favre M, Tomasic G, Wechsler J, Lacroix L, Robert C. Prospective study of cutaneous side-effects associated with the BRAF inhibitor vemurafenib: a study of 42 patients. *Ann Oncol* 2013, 24(6), 1691-1697.
 54. Boyd KP, Vincent B, Andea A, Conry RM, Hughey LC. Nonmalignant cutaneous findings associated with vemurafenib use in patients with metastatic melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2012, 67(6), 1375-1379.
 55. Lacouture ME, Duvic M, Hauschild A, Prieto VG, Robert C, Schadendorf D, Kim CC, McCormack C, Myskowski PL, Spleiss O, Trunzer K, Su F, Nelson B, Nolop KB, Grippo JF, Lee RJ, Klimek MJ, Troy JL, Joe AK. Analysis of Dermatologic Events in Vemurafenib-Treated Patients With Melanoma. *The Oncologist* 2013, 18(3), 314-322.
 56. Jhaveri KD, Sakhiya V, Fishbane S. Nephrotoxicity of the braf inhibitors vemurafenib and dabrafenib. *JAMA Oncol* 2015, 1(8), 1133-1134.
 57. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, Mandalá M, Demidov L, Stroyakovskiy D, Thomas L, de la Cruz L, Dutriaux C, Garbe C, Sovak MA, Chang I, Choong N, Hack SP, McArthur GA, Ribas A. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 2014, 371(20), 1867-1876.