

## STRESZCZENIE

Czerniak złośliwy to niebezpieczny rak skóry, odpowiadający za większość zgonów związanych z nowotworami skóry. U wielu pacjentów chorujących na tego raka, komórki nowotworowe posiadają mutację V600E w genie BRAF. Mutacja ta powoduje konstytutywną aktywację szlaku sygnałowego MAPK/ERK, przyczyniając się znacząco do procesu kancerogenezy. W niniejszym artykule omówiony został proces projektowania leków na przykładzie specyficznego inhibitora dla BRAF V600E, wemurafenibu. Na początku zaprezentowane są najczęściej stosowane metody projektowania leków. Druga część artykułu skupia się na wemurafenibie. Przedstawiony jest proces pierwszej syntezy tego inhibitora BRAF V600E oraz jego analogu i przebieg trzech etapów badań klinicznych. Na rynku wemurafenib jest sprzedawany w postaci leku Zelboraf. Dalej znajduje się opis innych popularnych leków na czerniaka złośliwego czyli dakarbazyny i dabrafenibu oraz krótka charakterystyka zalet terapii z równoczesnym zastosowaniem dwóch inhibitorów. Na końcu krótko omówiona jest rola sztucznej inteligencji w przyszłości projektowania leków.

## WPROWADZENIE

Nowotwory to grupa chorób charakteryzujących się tym, że komórki dzielą się w niekontrolowany sposób, zazwyczaj w wyniku uszkodzeń DNA spowodowanych predyspozycjami genetycznymi lub czynnikami środowiskowymi. Komórki nowotworowe są też w stanie indukować powstawanie nowych naczyń krwionośnych w procesie zwanym neoangiogenezą i ukrywać się przed lub „oszukiwać” układ odpornościowy. O raku mówimy dopiero wtedy, kiedy mamy do czynienia ze złośliwym nowotworem wywodzącym się z tkanki nabłonkowej. Niebezpieczeństwo raka wynika z jego umiejętności do przemieszczenia się i atakowania innych tkanek (przerzutowania) [1].

## CZERNIAK ZŁOŚLIWY ZE ZMUTOWANUM BIAŁKIEM B-RAF I MUTACJĄ BRAF V600E

Nowotwory skóry są jednymi z najczęstszych nowotworów. Większość z nich nie jest na tyle groźna, by wymagała szczególnie skomplikowanej interwencji medycznej – należą tu nieczerniakowe raki skóry. Przykładem bardzo niebezpiecznego nowotworu skóry jest natomiast czerniak złośliwy. Odpowiada on za ponad 60% zgonów związanych z nowotworami skóry. Jest to nowotwór złośliwy wywodzący się z melanocytów naskórka. Melanocyty to komórki odpowiedzialne za produkcję melaniny w procesie melanogenezy. Melaniny to grupa związków, klasyfikowanych jako pigmenty, które u ludzi odpowiadają m.in. za kolor skóry i oczu [2]. Oprócz skóry, czerniak złośliwy może także dotyczyć każdego obszaru ciała, w którym występują te komórki np. błony śluzowej przewodu pokarmowego lub gałki ocznej. Wyróżnia się 5 stopni zaawansowania czerniaka złośliwego, na podstawie klasyfikacji TNM (od Tumor Node Metastasis) [3]. Jest to system służący do określania poziomu zaawansowania raka, na podstawie wielkości pierwotnego guza, obecności przerzutów do węzłów chłonnych i obecności przerzutów do odległych narządów.

- Stopień 0 (*in situ*): Guz jest ograniczony do naskórka. Nie obserwuje się przerzutów do węzłów chłonnych ani odległych narządów.
- Stopień I: Guz nie przekracza 2 mm grubości (przez grubość rozumie się jak głęboko guz wnika do wnętrza tkanki), znajduje się w naskórku i skórze właściwej. Mogą występować wrzody. Nie obserwuje się przerzutów do węzłów chłonnych ani odległych narządów.
- Stopień II: Guz ma od 1 do 4 mm grubości, znajduje się w naskórku i skórze właściwej. Mogą występować wrzody. Nie obserwuje się przerzutów do węzłów chłonnych ani odległych narządów.
- Stopień III: Wyróżnia się 4 podgrupy (IIIA, IIIB, IIIC, IIID), określane na podstawie kilku różnych czynników. U wszystkich czerniaków złośliwych III

lic. Jan Wnuk,

dr hab. Tomasz Wilanowski✉

Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

[https://doi.org/10.18388/pb.2021\\_498](https://doi.org/10.18388/pb.2021_498)

✉ autor korespondujący: t.wilanowski@uw.edu.pl

**Słowa kluczowe:** badania kliniczne; BRAF V600E; czerniak złośliwy; nowotwór; projektowanie leków; wemurafenib

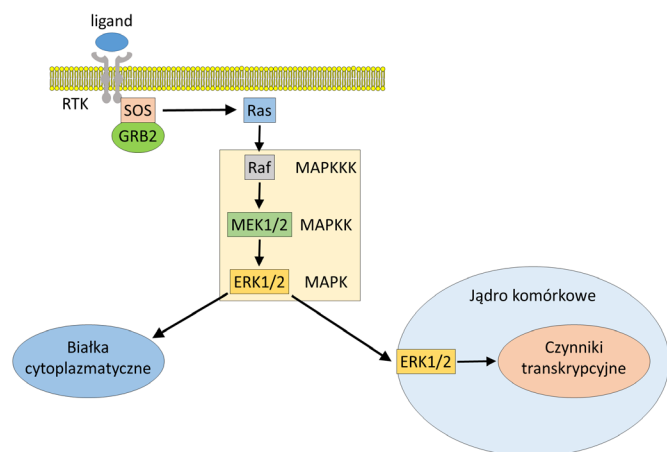
**Stosowane skróty:** BRIM – nazwa badań klinicznych wemurafenibu (ang. *Braf Inhibitor In Melanoma*); ERK – kinaza MAP odpowiedzialna za regulację procesów komórkowych (ang. *extracellular signal-regulated kinase*); FDA – Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. *U.S. Food and Drug Administration*); HTS – wysokoprzepustowe badanie przesiewowe (ang. *High Throughput Screening*); IND – wniosek o pozwolenie na sprzedaż leku na terenie USA (ang. *Investigational New Drug*); MAPK – kinaza białkowa aktywowana mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*); MEK – kinaza MAPK, inaczej MAPKK; NDA – wniosek o pozwolenie na przeprowadzenie badań klinicznych na ludziach na terenie USA (ang. *New Drug Application*); RAF – rodzina kinaz białkowych serynowo-treoninowych (ang. *rapidly accelerated fibrosarcoma*)

stopnia występują przerzuty do węzłów chłonnych, ale nie obserwuje się przerzutów do odległych narządów.

- Stopień IV: Występują przerzuty do odległych narządów i węzłów chłonnych.

W ponad 60% przypadków czerniaka złośliwego, w komórkach nowotworowych można wykryć zmutowane białko B-Raf, zawierające mutację V600E [4]. Termin BRAF odnosi się do genu znajdującego się na długim ramieniu chromosomu 7, natomiast białko kodowane przez ten gen nosi formalną nazwę B-Raf. B-Raf należy do rodziny kinaz białkowych serynowo-treoninowych RAF (ang. *rapidly accelerated fibrosarcoma*), które biorą udział w regulacji szlaku sygnałowego MAPK/ERK (ang. *mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase*) [5]. Rodzina białek RAF składa się z 3 izoform: A-Raf, B-Raf oraz c-Raf/Raf-1. Raf-1 jest ludzkim homologiem v-Raf, genu wyizolowanego z mysiego retrowirusa 3611. Został on odkryty w 1983 r. i bierze udział w procesie przemiany mysich fibroblastów w komórki nowotworowe, powodując rozwój włókniakomięsaków. Krótco po sklonowaniu v-Raf i odkryciu genu RAF1 na chromosomie 3 u ludzi, zidentyfikowano także gen ARAF na chromosomie 11 i BRAF [6].

Szlak sygnałowy MAPK/ERK (zwany także szlakiem Ras-Raf-MEK-ERK) odgrywa kluczową rolę w funkcjonowaniu komórek odpowiadając za różnicowanie, wydzielanie, podział komórkowy i apoptozę (Ryc. 1). Przekazywanie sygnału wzdłuż szlaku rozpoczyna się od związania ligandu (zazwyczaj w postaci naskórkowego czynnika wzrostu) do receptora w postaci receptorowej kinazy tyrozynowej w błonie komórkowej. Związanie ligandu skutkuje autofosforylacją reszty tyrozynowej. Następnie dochodzi do rekrutacji białek GRB2 (ang. *growth factor receptor-bound protein 2*) i SOS (ang. *Son of Sevenless*). SOS jest cząsteczką sygnałową odpowiedzialną za aktywację GTPazy Ras (ang. *rat sarcoma virus*) poprzez wymianę związanego z nią GDP na GTP. Aktywne Ras rekrutuje i wiąże się z Raf (MAPKKK – kinaza kinazy MAPK) w błonie komórkowej. Raf następnie aktywuje kinazy MEK 1/2



Rycina 1. Schemat szlaku sygnałowego MAPK/ERK [8]. Białka Raf są kluczowymi regulatorami szlaku sygnałowego MAPK/ERK, kontrolującego m. in. tempo podziałów komórkowych i różnicowanie komórek, procesy kluczowe w rozwoju chorób nowotworowych.

(MAPKK – kinaza MAPK) przez fosforylację dwóch reszt serynowych. Kinazy MEK 1/2 fosforylują kinazy ERK 1/2 (MAPK). Aktywne kinazy ERK wpływają na regulację ekspresji genów m.in. poprzez fosforylację czynników transkrypcyjnych i białek cytoplazmatycznych oraz licznych innych substratów w jądrze komórkowym [7].

W 2002 roku, BRAF został zidentyfikowany jako protoonkogen i stał się głównym obiektem licznych badań dotyczących terapii nowotworowych. Mutacje w BRAF występują w wielu rodzajach nowotworów i są najczęściej spotykane w przypadku czerniaka złośliwego i raka jelita grubego. Większość mutacji dotyczy substytucji kodonu 600 kodującego walinę (Val) na kodon kwasu glutaminowego (Glu) w eksonie 15 (V600E). Mutacja V600E jest zlokalizowana w domenie kinazy. Efektem mutacji jest konstytutywna, niezależna od Ras, aktywacja białka i szlaku sygnałowego MAPK/ERK. Mutacje w genie BRAF pełnią kluczową rolę w procesie nowotworzenia, ale nie są wystarczające do powstania nowotworu [9].

## WPROWADZENIE LEKU DO TERAPII

### METODY PROJEKTOWANIA LEKÓW

Projektowanie leków to proces tworzenia nowych farmaceutyków w oparciu o znajomość celu molekularnego (ang. *molecular target*). W odniesieniu do projektowania leków, jako cel molekularny najczęściej rozumie się białko biorące udział w regulacji metabolizmu lub będące częścią szlaków sygnałowych. Jeżeli takie białko nie pracuje poprawnie np. w wyniku mutacji, może to doprowadzać do rozwoju choroby. Żeby osiągnąć oczekiwany efekt terapeutyczny, należy upewnić się, że projektowany lub odkryty przez nas związek biologicznie czynny będzie jak najlepiej oddziaływał z celem. Takim związkiem jest najczęściej komplementarna mała cząsteczka, ale w ostatnich latach szybko rozwija się dziedzina projektowania leków opartych na przeciwciałach monoklonalnych. Proces odkrywania nowych leków jest bardzo skomplikowany, długi oraz kosztowny. Koszty wyprodukowania nowego leku szacuje się od 100 milionów do 6 miliardów dolarów amerykańskich. Od momentu pierwszego zsyntetyzowania leku do jego pojawienia się na rynku zazwyczaj mija co najmniej 10 lat. Wymaga on zaangażowania dużych zespołów naukowców – w tym bioinformatyków, gdyż dzisiejsze metody zazwyczaj polegają na korzystaniu z różnorodnych programów i modeli komputerowych, które generują znaczne ilości danych. Do 90% leków nigdy nie zostaje dopuszczonych na rynek. Główną przyczyną tego, dlaczego nie udało się wyjść poza fazę kliniczną jest albo to, że lek nie jest skuteczny, albo to, że jest on niebezpieczny. Często wynika to z niedopracowania podejścia projektowania nowych leków. Projektowanie leków to dziedzina nauki, która ciągle się rozwija przy pomocy nowych technologii, ale jest daleka od perfekcji. Dwoma głównymi podejściami do odkrywania leków jest podejście tradycyjne (ang. *traditional drug discovery approach*) i tzw. racjonalne projektowanie leków (ang. *rational drug design*). W ostatnich latach pojawiła się także metoda znajdowania nowych zastosowań dla już znanych leków (ang. *drug repurposing*) [10-12].

## TRADYCYJNE PODEJŚCIE DO ODKRYWANIA LEKÓW

Tradycyjne podejście do odkrywania leków było główną metodą stosowaną do lat 60. XX wieku. Polegało ono na analizie licznych naturalnych lub syntetycznych związków pod względem ich aktywności i właściwości. Kiedy obiecujący związek został zidentyfikowany, dopiero wtedy szukano dla niego zastosowania, czyli odpowiedniego celu molekularnego. Następnym krokiem była optymalizacja związku w celu zaprojektowania najbardziej wydajnego i bezpiecznego leku. Taka metoda tworzenia leków miała wiele problemów, w związku z czym nie korzysta się z niej tak często w dzisiejszych czasach. Głównym problemem wynikającym z tego podejścia jest brak informacji na temat związku, na podstawie którego tworzymy lek. Nie wiemy dlaczego dany związek jest lub nie jest biologicznie czynny, w jaki sposób możemy zwiększyć jego skuteczność, czy jest on specyficzny dla docelowego białka. Brak specyficzności może doprowadzić do szeregu niepożądanych efektów ubocznych w wyniku interakcji z niewłaściwymi białkami i ostatecznie skutkować tym, że lek nie zakończy pomyślnie badań klinicznych. Pod koniec lat 90. szacunkowe koszty takich badań w USA wynosiły od 200 do 500 milionów dolarów rocznie. Wiele leków, które udało się wprowadzić na rynek, było tylko analogami istniejących leków z minimalnymi zmianami w strukturze i o niemal identycznych właściwościach [13].

## RACJONALNE PROJEKTOWANIE LEKÓW

Racjonalne projektowanie leków jest inaczej nazywane „odwróconą farmakologią” (ang. *reverse pharmacology*) i jak sama nazwa wskazuje jest w założeniu odwrotnością tradycyjnej metody. Tutaj pierwszym krokiem jest identyfikacja celu molekularnego, którego modyfikacja przyniesie oczekiwany efekt terapeutyczny. Dopiero potem dobieramy związek, który się z nim zwiąże. Sam proces polega na tworzeniu małych cząsteczek z określonymi właściwościami i interakcją z celem molekularnym, którego wpływ na procesy komórkowe i struktura przestrzenna są w większości przypadków znane. Po zidentyfikowaniu celu dokonuje się badania przesiewowego szerokiej biblioteki małych cząsteczek. Wiodące związki badane się w zakresie poziomu powinowactwa i specyficzności wiązania do celu, równowagi między hydrofilnością i lipofilnością, absorpcji, metabolizmu, toksyczności cząsteczki i produktów jej metabolizmu oraz wiele innych [10,12,14].

Jednym z najważniejszych narzędzi stosowanych w racjonalnym projektowaniu leków jest wysokoprzepustowe badanie przesiewowe (ang. *high throughput screening*, HTS). HTS to metoda badania przesiewowego wykorzystująca robotykę, detektory i programy umożliwiające automatyczne przetwarzanie dużych ilości danych. Za pomocą HTS można zbadać do 100 tysięcy próbek dziennie. HTS jest zazwyczaj wykorzystywane do badania małych cząsteczek, ale znajduje także zastosowanie w badaniu białek, przeciwciał i oligonukleotydów. Aparatura do HTS wykorzystuje mikropłytki najczęściej posiadające 96, 384 lub 1.536 dołków, rzadziej stosowane są płytki z 3.456 lub 6.144 dołkami. W dołkach znajduje się badany związek, zazwyczaj rozpuszczony w wodnym roztworze dimetylosulfotlenku.

Obecnie najbardziej zaawansowanym i wydajnym procesem racjonalnego projektowania leków jest projektowanie leków w oparciu o ich strukturę (ang. *structure based drug design*, SBDD). Jest to możliwe dzięki postępom w metodach wyznaczania struktury molekularnej związku przy użyciu spektroskopii biomolekularnej. Poznano trójwymiarowe struktury ponad 100 tysięcy białek, w tym licznych białek o istotnym znaczeniu terapeutycznym. Proces ten rozpoczyna się od rozpoznania centrum aktywnego w trójwymiarowej strukturze za pomocą rentgenografii strukturalnej lub NMR, a dopiero potem badanie przesiewowe biblioteki związków. Może to być klasyczny HTS, ale coraz częściej stosuje się „wirtualne badanie przesiewowe” (ang. *virtual screening*), korzystające z internetowych baz danych ZINC lub PubChem [10,12,14].

ZINC-22 jest bezpłatną, internetową bazą danych dostępnych na rynku drobnocząsteczkowych związków organicznych. Zawiera ona struktury trójwymiarowe ponad 37 miliardów związków (stan na lipiec 2023) i jej głównym zastosowaniem jest wirtualne badanie przesiewowe w ramach projektowania leków. Zaletami wirtualnego badania w porównaniu do HTS jest krótszy czas analizy, mniejsze koszty i brak potrzeby stosowania zaawansowanej aparatury [15].

Innym popularnym podejściem w racjonalnym projektowaniu leków jest tzw. „*fragment based drug design*”, w skrócie FBDD. Polega ono na poszukiwaniu małych cząsteczek chemicznych, mniejszych niż związki wiodące (ang. *lead compounds*) i leki. Takie fragmenty charakteryzują się niską masą cząsteczkową, słabym wiązaniem do centrum aktywnego i niską złożonością. Rozpoznaje się je dzięki analizie bibliotek związków. Dopiero na podstawie tych fragmentów, w przypadku których wykazano wiązanie z celem molekularnym, buduje się pełne cząsteczki związków wiodących, poprzez dodawanie odpowiednich podstawników. Celem dodawania tych podstawników jest poprawienie właściwości cząsteczek pod kątem ich przyszłego zastosowania jako leków, takich jak wchłanianie, specyficzność, metabolizm, toksyczność i inne [16].

Podobnym podejściem do FBDD jest „metoda rusztowań” (ang. *scaffold-based drug design*). Główna różnica polega na tym, że zamiast małych fragmentów, korzysta się z większych „rusztowań” (ang. *scaffolds*). Przez rusztowanie rozumie się rdzeń cząsteczki, który warunkuje jej właściwości. Otrzymuje się je poprzez pozbawienie cząsteczki podstawników, zachowując tylko jej budowę pierścieniową. Nowe rusztowania można także otrzymać w wyniku dodania lub usunięcia pierścienia od istniejącego już rusztowania [17].

## BADANIA PRZEDKLINICZNE POTENCJALNEGO LEKU

Zanim związek chemiczny może zostać dopuszczony do testów klinicznych – czyli badań na ludziach, wcześniejsze testy muszą wykazać, że jest on bezpieczny dla organizmu. Badania przedkliniczne muszą stosować się do wytycznych Dobrych Praktyk Laboratoryjnych (ang. *Good Laboratory Practice*, GLP). Te wytyczne mają za zadanie zapewnienie



jakości, integralności i powtarzalności zebranych danych. Jak podaje FDA, dwoma typami badań przedklinicznych są badania *in vitro* i *in vivo*. Badania *in vitro* to badania na żywych, wyizolowanych z organizmu komórkach. Najczęściej stosuje się specjalnie do tego celu przygotowane linie komórkowe. Najpopularniejsze są komórki mysie, szczurze i ludzkie. Badania *in vivo* to badania na żywych organizmach wykorzystujące modele zwierzęce. Głównymi modelami zwierzęcymi są myszy i szczury, ale korzysta się także z chomików, kotów, psów i ssaków naczelnych. Przeprowadzenie jakichkolwiek badań na zwierzętach wymaga uprzedniego uzyskania zgody komisji etycznej. Na etapie badań przedklinicznych przeprowadza się badania z dziedziny farmakodynamiki ("co związek chemiczny robi z organizmem"), farmakokinetyki ("co organizm robi ze związkiem chemicznym") i toksykologii.

Badania farmakodynamiczne dotycząca wpływu związku chemicznego na organizm.

Badania farmakokinetyczne dotyczą głównie absorpcji, metabolizowania i wydalania związku chemicznego.

Badania toksyczności dotycząca bezpieczeństwa związku chemicznego i wraz z badaniami farmakodynamicznymi umożliwiają określenie bezpiecznej dawki związku chemicznego.

Dopiero po wykazaniu, że związek chemiczny jest bezpieczny u modeli zwierzęcych i wypełnieniu odpowiednich protokołów można otrzymać zgodę na przejście do badań klinicznych [18,19].

## OGÓLNE ZASADY BADAŃ KLINICZNYCH NA PRZYKŁADZIE WEMURAFENIBU

### PIERWSZA FAZA KLINICZNA

Badania 1 fazy klinicznej, BRIM 1 (ang. *B-raf inhibitor in melanoma 1*), zostały podjęte w celu oceny bezpieczeństwa i farmakokinetycznych właściwości terapii z zastosowaniem wemurafenibu. Terapia uwzględniała podawanie związku chemicznego doustnie dwa razy dziennie, żeby ocenić maksymalną dawkę, przy której nie występują efekty uboczne. Dodatkowo zmierzono częstotliwość i czas trwania odpowiedzi nowotworu oraz tempo progresji nowotworu. Badania były sponsorowane przez firmy Plexxikon i Roche Pharmaceuticals [20].

Badanie było podzielone na dwa etapy. I etapem była faza eskalacji dawki, w której brało udział w sumie 55 pacjentów. Każdy pacjent miał nowotwór z mutacją BRAF V600E; 49 z nich miało czerniaka złośliwego, a pozostałych 6 miało raka brodawkowego tarczycy. II etap był etapem rozszerzenia, w którym wdrożono 32 dodatkowych pacjentów, którzy wszyscy mieli czerniaka złośliwego z mutacją BRAF V600E [20].

W I etapie wemurafenib wstępnie znajdował się w postaci krystalicznej. Jednakże, ze względu na niską biodostępność związku chemicznego w takiej postaci, badanie zostało przerwane. Po wznowieniu badania wemurafenib podawano nowym pacjentom w postaci sproszkowanej w

kapsułkach i tabletkach. Podawanie wemurafenibu rozpoczęto od 160 mg w postaci dwóch 80 mg kapsułek dwa razy dziennie i regularnie zwiększano dawkę aż do osiągnięcia dawki 1.120 mg. Przy takiej dawce zaobserwowano u licznych pacjentów efekty uboczne w postaci wysypki, zmęczenia i bólu stawów. Zdecydowano się na dawkę 960 mg podawaną dwa razy dziennie (2 razy po 480 mg) jako zalecaną dawkę do stosowania w drugim etapie. Na tym etapie u 11 spośród 16 pacjentów z czerniakiem zawierającym mutację BRAF V600E i 3 pacjentów z rakiem tarczycy zaobserwowano reakcję na wemurafenib. Z tych 11 pacjentów, dziesięć miało odpowiedź częściową, a jeden kompletną. Odpowiedź kompletna była definiowana jako zniknięcie wszystkich zmian chorobowych, zaś odpowiedź częściowa jako zmniejszenie o co najmniej 30% sumy największych średnic każdej zmiany chorobowej w porównaniu do pomiaru na początku badania. Odpowiedź obejmowała wszystkie miejsca, gdzie pojawiły się przerzuty m.in. w wątrobie i kościach i trwała od 2 do 18 miesięcy [20].

W II etapie badania uczestniczyli tylko pacjenci z czerniakiem złośliwym zawierającym mutację BRAF V600E. W tym etapie skupiano się na ocenie toksyczności leku i odpowiedzi nowotworu. Na tym etapie u 26 z 32 pacjentów zaobserwowano reakcję na lek, z czego u dwóch pacjentów była to odpowiedź kompletna. U 3 pacjentów w ciągu 2 tygodni zmniejszyło się zapotrzebowanie na leki przeciwbólowe. Odpowiedź na lek obejmowała przerzuty na narządy wewnętrzne, kości i węzły chłonne. Oszacowano, że pacjenci, u których wystąpiła odpowiedź powinni przeżyć ponad 7 miesięcy bez rozwoju choroby. Wyniki 1 fazy klinicznej były bardzo obiecujące dla wemurafenibu. Potwierdziły one jego wysoką specyficzność do mutacji BRAF V600E i skuteczność w leczeniu czerniaka złośliwego [20].

### DRUGA FAZA KLINICZNA

Badania 2 fazy klinicznej, BRIM 2, zostały rozpoczęte w 2009 r. i polegały na zbadaniu efektów wemurafenibu u osób, które były uprzednio leczone na czerniaka złośliwego zawierającego mutację BRAF V600E. Zrekrutowano 132 pacjentów, którzy otrzymywali dawkę 960 mg leku doustnie dwa razy dziennie (2 razy po 480 mg), aż do pojawienia się widocznych efektów ubocznych lub postępu choroby. Kompletna odpowiedź została zaobserwowana u 8 pacjentów, zaś częściowa odpowiedź u 62 pacjentów. U 38 pacjentów stan choroby był stabilny. Mediana przeżycia po terapii wynosiła 16 miesięcy. U większości pacjentów reakcja na lek pojawiała się bardzo szybko. Niektórzy pacjenci wymagali zmniejszenia dawki lub tymczasowego przerwania dawkowania, ale nigdy nie doszło do stanu zagrożenia życia. Większość pacjentów spotkała się z co najmniej jednym efektem ubocznym. Najczęstszymi negatywnymi skutkami brania leku były bóle stawów, wysypka, zmęczenie i łysienie plackowate. Wyniki badania zgadzały się z wynikami 1 fazy, że wemurafenib ma dobre właściwości przeciwnowotworowe ze znacznym odsetkiem i czasem trwania odpowiedzi więc zakwalifikowano go do dalszych badań [21].

## TRZECIA FAZA KLINICZNA

Badania 3 fazy klinicznej, BRIM 3, zostały rozpoczęte na początku 2010 roku i polegały na porównaniu efektów terapii wemurafenibem do terapii dakarbazyną (omówiona poniżej) u osób, które nie były wcześniej leczone na czerniaka złośliwego. Do badania zakwalifikowano 675 pacjentów. Były to osoby pełnoletnie, cierpiące na czerniaka złośliwego III lub IV stopnia z mutacją BRAF V600E. Pacjenci zostali w losowy sposób przydzieleni do dwóch równych grup, leczonych wemurafenibem lub dakarbazyną. Grupa przyjmująca wemurafenib zażywała dawkę 960 mg dwa razy dziennie (2 razy po 480 mg), zaś druga grupa otrzymywała lek dożylnie raz na 3 tygodnie w dawce 1.000 mg na metr kwadratowy powierzchni ciała. W badaniu mierzono przeżycie, częstotliwość odpowiedzi, długość odpowiedzi i bezpieczeństwo terapii [22].

W trakcie trwania badania 118 pacjentów zmarło, ocena odpowiedzi nowotworowej była przeprowadzona u 439 pacjentów (65% wszystkich). Pacjenci poddani terapią wemurafenibem radzili sobie znacznie lepiej niż ci w grupie leczonej dakarbazyną. 106 z 219 pacjentów (46%) leczonych wemurafenibem wykazywało reakcję na lek (w tym 2 osoby wykazały pełną reakcję) z medianą odpowiedzi 1,45 miesiąca. W drugiej grupie tylko 12 z 220 pacjentów (5%) wykazało częściową reakcję na lek po około 3 miesiącach terapii. W związku ze znaczącą różnicą w częstotliwości odpowiedzi, po zakończeniu badania pacjenci z grupy z dakarbazyną kontynuowali leczenie stosując wemurafenib. Najczęstszymi efektami ubocznymi w grupie leczonej wemurafenibem były zmiany skórne, bóle stawów i zmęczenie. U osób leczonych dakarbazyną występowały głównie nudności z wymiotami, neutropenia (spadek liczby neutrofilów poniżej normy) i zmęczenie. Badania wykazały, że terapia z zastosowaniem wemurafenibu zmniejszała ryzyko śmierci o 63%, oraz ryzyko rozwoju nowotworu o 74% w porównaniu z terapią dakarbazyną [22].

## WNIOSEK O WPROWADZENIE LEKU - DOKUMENTACJA

Na każdym etapie projektowania leków potrzebny jest szereg dokumentów i zgód. Do najważniejszych dokumentów wymaganych przy pracy nad lekami należą:

- zgoda komisji etycznej na prowadzenie badań na zwierzętach,
- pozwolenie na prowadzenie badań klinicznych na ludziach - wniosek IND (Investigational New Drug) w USA; wniosek IMPD (Investigational Medicinal Product Dossier) w UE; wniosek do Komisji Bioetycznej w Polsce,
- broszura badacza,
- protokół badań klinicznych,
- formularz świadomej zgody,
- raport z badania klinicznego,
- wniosek o zatwierdzenie leku do sprzedaży - wniosek NDA (New Drug Application) w USA; wniosek MAA (Marketing Approval Application) w UE i inne [23].

Żadne badania na zwierzętach nie mogą się odbyć bez zgody komisji etycznych ds. badań na zwierzętach. Żeby

uzyskać zgodę należy m.in. uzasadnić wykorzystanie zwierząt do badania, oszacować jaki wpływ badania będą miały na zwierzęta, poinformować czy i jak będą uśmiercane; jakie zabiegi będą zastosowane by uśmierzyć im ból i cierpienie np. zastosowanie znieczulenia. Komisja może dokonywać kontroli i w ostateczności nakazać przerwanie badania [24,25].

Wniosek IND to dokument służący do uzyskania zgody FDA (ang. *U.S Food and Drug Administration*) na podawanie badanego leku ludziom. Zazwyczaj taki wniosek jest składany przez sponsora badań klinicznych. Zgoda ta jest wymagana aby lek mógł przejść do fazy badań klinicznych i musi być uzyskana zanim dojdzie do podania leku pacjentom. Wniosek IND powinien zawierać informacje zebrane w trakcie badań przedklinicznych, informacje o wytwarzaniu leku i protokół przebiegu badań klinicznych. Jeżeli podczas badań pacjentom będą podawane inne substancje, w tym placebo, dla każdej substancji powinien być złożony oddzielny wniosek. Po złożeniu wniosku FDA potrzebuje co najmniej 30 dni na przestudiowanie wniosku i ocenę czy planowane badania będą bezpieczne. Do upływu tego okresu czasu i uzyskania oficjalnej zgody, nie można rozpocząć badań klinicznych [23,26,27].

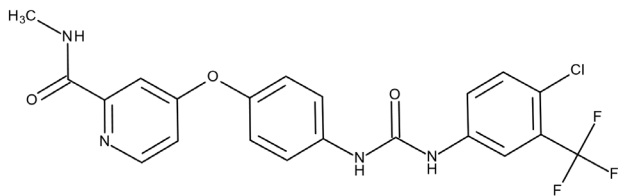
Odpowiednikiem IND na terenie Unii Europejskiej jest wniosek IMPD. Dossier badanego produktu leczniczego jest składany do Europejskiej Agencji Leków i zawiera informacje dotyczące jakości, produkcji i kontroli produkcji badanego leku. Tak jak w przypadku IND, dossier powinien zawierać komplet informacji zebranych podczas badań przedklinicznych [28].

Broszura badacza to dokument zawierający całość aktualnych informacji o badanym leku pochodzących z badań przedklinicznych i klinicznych. Broszura służy temu, by każda osoba związana z badaniem miała łatwy dostęp do wszystkiego co musi o nim wiedzieć i jak z nim pracować. Broszura badacza powinna być regularnie uzupełniana o aktualne informacje i nowe odkrycia [23,29].

Protokół badań klinicznych to dokument przedstawiający plan przeprowadzenia badania klinicznego. Odpowiednio przygotowany protokół powinien zawierać m.in. cel badania, zasady kwalifikacji pacjentów, wstępną ocenę bezpieczeństwa i efektywności leku oraz harmonogram badania [23,30].

Formularz świadomej zgody to dokument, który musi być podpisany przez każdego uczestnika badania klinicznego. Ma on za zadanie poinformowanie pacjenta o celu i procesie badania oraz o poziomie ryzyka. Formularze powinny być pisane prostym językiem, tak żeby pacjent był świadomy swojej decyzji. Oprócz ochrony pacjenta, odpowiednio przygotowany formularz może zwalniać prowadzących badania od odpowiedzialności prawnej w przypadku wystąpienia skutków ubocznych brania leku [23,31].

Raport z badania klinicznego to dokument skrupulatnie opisujący przeprowadzone badanie kliniczne i jego wyniki. Swoją strukturą przypomina on standardową publikację naukową. Tak jak w przypadku publikacji naukowych, ra-



Rycina 2. Struktura chemiczna sorafenibu.

port z badania klinicznego zawiera opis materiałów i metod, wszystkie wyniki uzyskane podczas badań klinicznych oraz wyciągnięte na ich podstawie wnioski. Zasadnicza różnica w porównaniu z publikacją naukową dotyczy długości: raporty z badań klinicznych są bardzo szczegółowe i w wielu przypadkach ich długość może osiągać do kilkuset stron [32].

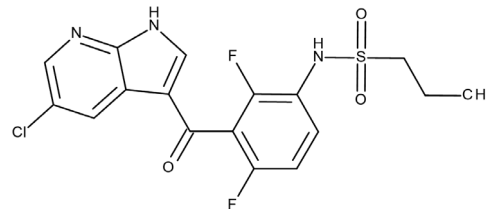
Wniosek NDA to dokument, który jest wymagany do uzyskania zgody na sprzedaż i marketing leku na terenie Stanów Zjednoczonych. NDA zawiera wszystkie informacje na temat leku zebrane podczas badań przedklinicznych i klinicznych, w tym jego skład, proces produkcji oraz planowane opakowanie i etykietę leku. Wszystkie te aspekty podlegają dokładnej recenzji. Jeśli lek zostanie zaakceptowany, może zostać oficjalnie dopuszczony na rynek. Podobnym dokumentem do NDA jest ANDA (Abbreviated New Drug Application). Jedyną różnicą jest to, że ANDA dotyczy leków generycznych, czyli leków przypominających istniejące już na rynku produkty. W związku z tym, we wniosku ANDA nie są wymagane dane z badań przedklinicznych i klinicznych. Zamiast tego, we wniosku muszą zostać uwzględnione informacje, które dowodzą, że ten lek działa w ten sam sposób i równie skutecznie co oryginał [33,34].

Na terenie Unii Europejskiej odpowiednikiem NDA jest wniosek MAA, którego recenzją zajmuje się Europejska Agencja Leków. W przypadku obu dokumentów należy odczekać od 6 miesięcy do roku zanim lek zostanie dopuszczony na rynek [35].

## PIERWSZE INHIBITORY BIAŁKA B-RAF

### SORAFENIB WOBEC B-RAF I INNE ZASTOSOWANIE

Sorafenib (BAY 43-9006) jest inhibitorem licznych kinaz, wykazującym działalność antyproliferacyjną i antyangiogenną w stosunku do komórek nowotworowych (Ryc. 2). Był jednym z pierwszych inhibitorów RAF badanych pod kierunkiem zastosowania ich jako leków na czerniaka złośliwego. Został zaprojektowany w celu blokowania białka c-Raf, ale wykazuje także aktywność hamującą B-Raf, rodzinę receptorów czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego – VEGFR (ang. *vascular endothelial growth factor receptor*) i rodzinę receptorów płytkopochodnego czynnika wzrostu PDGFR (ang. *platelet-derived growth factor receptor*). W testach klinicznych terapie z zastosowaniem sorafenibu nie skutkowały wyższą przeżywalnością pacjentów. Ostatecznie, wycofano się ze stosowania sorafenibu jako leku na czerniaka złośliwego. Po niepowodzeniu sorafenibu, badacze doszli do wniosku, że następnym krokiem powinno być skupienie się na wysoce selektywnych inhibitorach dla B-Raf z mutacją V600E [36,37].

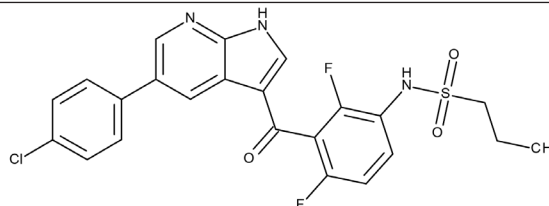


Rycina 3. Struktura chemiczna PLX-4720.

Aktualnie, sorafenib jest dostępny na rynku pod nazwą Nexavar. W 2006 roku FDA zatwierdziło jego zastosowanie jako leku na zaawansowanego raka nerki ze względu na swoją aktywność hamującą VEGFR i PDGFR. Inhibicja VEGFR i PDGFR hamuje neoangiogenezę w komórkach nowotworowych. Występowanie neoangiogenezy jest istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój nowotworów, gdyż nowo powstałe naczynia krwionośne zaopatrują komórki nowotworowe w tlen i składniki odżywcze, promując ich wzrost [36].

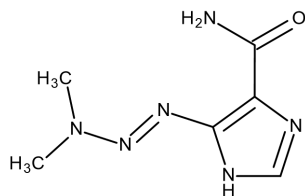
### PLX-4720 I WEMURAFENIB (PLX-7432) – SELEKTYWNE INHIBITORY NOWEJ GENERACJI

W 2007 roku Tsai i wsp., za pomocą metody rusztowań, opracowali selektywny inhibitor B-Raf nowej generacji [38]. W celu zidentyfikowania odpowiednich rusztowań inhibitorów B-Raf, przeprowadzili oni wysokopręciowe badanie przesiewowe, w którym wykorzystali bibliotekę 20.000 związków o masie molekularnej od 150 do 350 daltonów. Dane zebrane ze wstępnej analizy zostały dalej przeanalizowane pod kątem wybrania odpowiednich związków do przeprowadzenia badań krystalograficznych kompleksów białko-inhibitor, mającej na celu znalezienie wysoce specyficznych oddziaływań. Takim badaniom poddano 238 związków i odkryto, że cząsteczki wykazujące najwyższe powinowactwo do centrum aktywnego enzymu kinazy B-Raf posiadają fragment 7-azaindolowy. Rusztowanie pod postacią rdzenia 7-azaindolowego zostało przyjęte jako optymalny kandydat do opracowania nowej biblioteki związków do dalszej analizy. Po przeprowadzeniu screeningu nowej biblioteki oraz optymalizacji znalezionych związków zidentyfikowano pierwszego obiecującego kandydata: PLX-4720 czyli N-(3-(5-chloro-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridyno-3-karbonylo)-2,4-difluorofenyl)propano-1-sulfonamid (C17H14ClF2N3O3S) (Ryc. 3). Jest to wysoce selektywny inhibitor zarówno normalnego jak i zmutowanego białka B-Raf, ale wykazuje wyższe powinowactwo do mutantów. W związku z tym, PLX-4720 hamuje zmutowane B-Raf przy wielokrotnie niższych stężeniach niż niezmutowane B-Raf. Hamowanie funkcjonowania kinazy B-Raf przez PLX-4720 skutkuje obniżeniem poziomu aktywacji szlaku MAPK.



Rycina 4. Struktura chemiczna wemurafenibu.





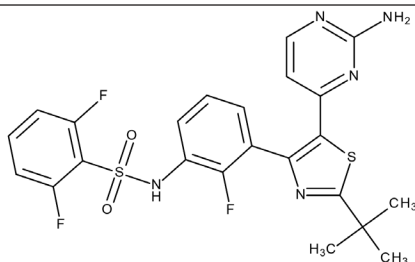
Rycina 5. Struktura chemiczna dakarbazyny.

Powoduje to zatrzymanie cyklu komórkowego i wywołuje apoptozę u komórek czerniaka złośliwego z mutacją BRAF V600E. Badania przedkliniczne przeprowadzone na myszach były bardzo obiecujące. Wykazały one, że PLX-4720 charakteryzuje się wysoką biodostępnością, silnym działaniem przeciwnowotworowym i powoduje redukcję guza bez wyraźnych efektów ubocznych [38,39].

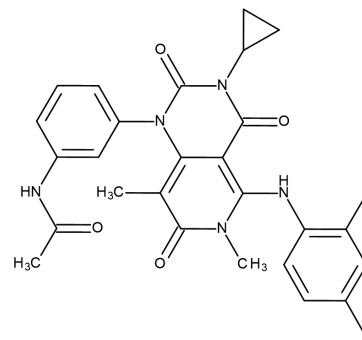
Analogiem PLX-4720, także odkrytym za pomocą metody rusztowań, jest PLX-4032, czyli wemurafenib (od *V600E mutated B-Raf inhibition*) (Ryc. 4). PLX-4032 różni się od PLX-4720 zamianą grupy chlorowej na grupę chlorofenylową: N-[3-[5-(4-chlorofenilo)-1H-pirol[2,3-b]pirydyno-3-karbonylo]-2,4-difluorofenilo]propano-1-sulfonamid. Wemurafenib ma podobne właściwości do PLX-4720 m.in. silne działanie przeciwnowotworowe. Wemurafenib wykazuje wyjątkowo wysoką selektywność w stosunku do komórek czerniaka złośliwego z mutacją BRAF V600E. Przeciwno komórkom nowotworu tarczycy także zawierającym mutację BRAF V600E, zaobserwowano znacznie słabszą aktywność. Ostatecznie to wemurafenib został wybrany do opracowania terapii na czerniaka złośliwego zamiast PLX4720. Decyzja ta została podjęta na podstawie osiągania przez wemurafenib lepszych wyników farmakokinetycznych w badaniach przedklinicznych [39].

Wemurafenib jest sprzedawany pod handlową nazwą Zelboraf. Na terenie Stanów Zjednoczonych został on wprowadzony na rynek 17 sierpnia 2011 roku. Na terenie Unii Europejskiej otrzymał autoryzację marketingową 17 lutego 2012. Wemurafenib jest produkowany i sprzedawany przez firmę Hoffman La Roche. Do wprowadzenia wemurafenibu na rynek istniały tylko 3 leki na czerniaka złośliwego - dakarbazyna, aldesleukina i ipilimumab. Terapie z zastosowaniem tych substancji nie były aż tak efektywne jak terapia wemurafenibem [40].

Lek ten jest sprzedawany w postaci tabletek powlekanymi zawierających 240 mg wemurafenibu. Można go kupić w opakowaniach po 56 lub 112 tabletek. Cena za pojedynczą tabletkę to około 52 dolarów amerykańskich. Zalecana daw-



Rycina 6. Struktura chemiczna dabrafenibu.



Rycina 7. Struktura chemiczna trametynybu.

ka to 960 mg wemurafenibu przyjmowana 2 razy dziennie – po 4 tabletki rano i wieczorem [41].

Przed rozpoczęciem terapii wemurafenibem pacjent musi wykonać test na obecność mutacji BRAF V600E. Mutację można wykryć za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera lub testu na mutację BRAF V600E cobas 4800. Test cobas to badanie wykorzystujące PCR w czasie rzeczywistym w celu zbadania DNA zebranego z fragmentu biopsji czerniaka [40].

#### DAKARBAZYNA

Dakarbazyna, czyli 5-(3,3-dimetylo-1-triazeno)imidazo-4-karboksyamid, to jeden z pierwszych leków zatwierdzonych przez FDA do stosowania w terapii na czerniaka złośliwego (Ryc. 5). Został on wprowadzony na rynek w 1975 r. Oprócz leczenia czerniaka złośliwego znajduje on zastosowanie w terapii na chłoniaka Hodgkina, zazwyczaj w połączeniu z innymi lekami. Dakarbazyna jest podawana dożylnie w postaci codziennych infuzji przez kilka dni, w cyklach 3-4 tygodni lub pojedynczych, dużych dawkach raz na cykl. Dokładny mechanizm działania dakarbazyny jest nadal nie do końca poznany. Terapia samą dakarbazyną, bez stosowania innych leków, nie jest bardzo efektywna – wykazuje częstotliwość odpowiedzi na poziomie 20% i minimalny wpływ na przeżycie [42].

#### NOWA GENERACJA LEKÓW DLA TERAPII CZERNIAKA ZŁOŚLIWEGO

##### DABRAFENIB

Dabrafenib, sprzedawany na rynku pod nazwą Tafinlar, to inhibitor B-Raf selektywny dla białek z mutacją BRAF V600E (Ryc. 6). Dabrafenib, wraz z trametynybem, zostały 22 czerwca 2022 zaakceptowane przez FDA jako terapia na nowotwory z mutacją BRAF V600E. Dabrafenib jest podawany doustnie w dawce 150 mg dwa razy dziennie, wraz z 2 mg trametynybu raz dziennie [43].

Dabrafenib wiąże się z aktywną formą białka B-Raf z mutacją BRAF V600E i zmniejsza poziom aktywacji szlaku sygnałowego MAPK/ERK powodując zatrzymanie cyklu komórkowego. Dabrafenib wykazuje znacznie wyższe powinowactwo do mutantów BRAF w stosunku do normalnego BRAF, w tym takich z mutacjami innymi niż BRAF V600E. Dabrafenib bardzo dobrze radzi sobie z przerzuta-

mi nowotworu do mózgu. Terapia z zastosowaniem tylko dabrafenibu szybko staje się nieskuteczna ze względu na nabycie odporności na lek. Z tego względu dabrafenib jest zazwyczaj podawany wraz z trametynibem [44].

#### TRAMETYNIB, ZNACZENIE TERAPII WIELOLEKOWEJ

Trametynib, sprzedawany na rynku pod nazwą Mekinist, to inhibitor kinaz MEK 1/2 (Ryc. 7). Tak jak dabrafenib, zmniejsza on poziom aktywacji szlaku sygnałowego MAPK/ERK i prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego. Połączenie inhibitora B-Raf z inhibitorem MEK znacznie zwiększa skuteczność terapii [44,45].

Pomiędzy dabrafenibem i wemurafenibem istnieje wiele podobieństw. Oba te leki to inhibitory B-Raf V600E, stosowane najczęściej do terapii czerniaka złośliwego. W testach klinicznych oba leki wykazywały podobne właściwości. Głównym elementem odróżniającym terapię dabrafenibem od wemurafenibu, jest stosowanie drugiego inhibitora. Wędlug badań klinicznych do zalet stosowania mieszanej terapii nad terapią wemurafenibem należą:

- dłuższy okres czasu przed pojawieniem się odporności na lek,
- zmniejszone ryzyko zgonu,
- dłuższy okres przeżycia bez postępów choroby,
- mniejsza częstotliwość występowania zmian skórnych,
- większa częstotliwość i długość trwania odpowiedzi nowotworu,
- i to wszystko bez dodatkowej toksyczności [45,46].

#### PERSPEKTYWY ANALIZY DUŻYCH ZESTAWÓW DANYCH W PROJEKTOWANIU LEKÓW

Projektowanie leków to dziedzina nauki, która ciągle się rozwija, ale napotyka także na nowe wyzwania. Jednym z największych takich wyzwań ostatnich lat jest nadejście ery dużych zestawów danych (Big Data). Mogą one zmienić każdy etap procesu odkrywania leków, dostarczając ogromnych ilości informacji i spostrzeżeń, które wcześniej były niedostępne. Nowoczesne techniki potrafią produkować nawet bardzo duże ilości danych, które następnie należy przeanalizować i odfiltrować bezużyteczny „szum” od znaczących wyników. Za przykład takich dużych zestawów danych może posłużyć sekwencja genomu człowieka, której otrzymanie było możliwe dzięki wielkiemu wysiłkowi wielu krajów i która do dzisiaj jest bardzo użyteczna przy opracowywaniu nowych leków. Inne przykłady to wyniki analiz proteomicznych, badań asocjacyjnych całego genomu (ang. *genome-wide association studies*, GWAS), analizy szlaków sygnałowych, internetowe książeczki zdrowia i inne [47].

W ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem cieszy się korzystanie w tym celu ze sztucznej inteligencji. Mówiąc o sztucznej inteligencji chodzi nam konkretnie o uczenie maszynowe. Polega ono na tworzeniu „samouczących się” algorytmów, do których wprowadzamy liczne zestawy danych. Z czasem maszyna „uczy się” na podstawie dostarczonych informacji jak wykonywać zleczone jej zadanie i jak je zoptymalizować. W ramach dziedziny projektowania leków uczenie maszynowe można wykorzystać m.in.

w: identyfikacji celów molekularnych i ich struktur, projektowaniu małych cząsteczek a nawet przewidywaniu, którzy uczestnicy badania klinicznego wykażą odpowiedź na badany lek. Rozwój sztucznej inteligencji może doprowadzić nie tylko do uproszczenia samego procesu projektowania nowych leków, ale także skutkować skuteczniejszymi, bezpieczniejszymi, bardziej spersonalizowanymi terapiami [48,49].

#### PODSUMOWANIE

Badania nad BRAF V600E wykazały, że wysoko specyficzne inhibitory są wyjątkowo skuteczne do zwalczania chorób nowotworowych. Pokazały, że jest możliwe opracowywanie inhibitorów konkretnych zmutowanych wersji białek. Celowanie w konkretne mutacje pozwala na ograniczenie działania leku tylko do komórek nowotworowych, co zwiększa efektywność terapii i ogranicza szkodliwe efekty uboczne. Dzieje się tak dlatego, że zmutowane białka w ogóle nie występują w zdrowych komórkach, zatem blokowanie ich funkcjonowania nie wywołuje żadnych niekorzystnych konsekwencji dla zdrowych komórek. Przyszłością leczenia czerniaka złośliwego i innych nowotworów będzie zapewne rozwój terapii skojarzonych. Terapie z zastosowaniem więcej niż jednego wysoko specyficznego inhibitora, celujące w ten sam szlak sygnałowy, oferują jeszcze wyższą skuteczność bez wpływania na toksyczność.

#### PIŚMIENNICTWO

1. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
2. Mostert AB (2021) Melanin, the What, the Why and the How: An Introductory Review for Materials Scientists Interested in Flexible and Versatile Polymers. *Polymers* 13: 1670
3. <https://www.aimatmelanoma.org/melanoma-101/how-melanoma-is-diagnosed/melanoma-staging/>
4. DeLuca AM, Srinivas A, Alani RM (2008) BRAF kinase in melanoma development and progression. *Expert Rev Mol Med* 10: e6
5. Hussain MRM, Baig M, Mohamad HSA, Ulhaq Z, Hoessli DC, Khogeer GS, Al-Sayed RR, Al-Aama JY (2015) BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi J Biol Sci* 22: 359-373
6. Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH, Stephenson JR (1983) Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4218-4222
7. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W (2005) Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J* 392: 249-261
8. Cordover E, Minden A (2020) Signaling pathways downstream to receptor tyrosine kinases: targets for cancer treatment. *J Cancer Metastasis Treat* 6: 45
9. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954
10. Mandal S, Moudgil M, Mandal SK (2009) Rational drug design. *Eur J Pharmacol* 625: 90-100
11. Szumilak M, Stańczak A (2014) Repozycjonowanie leków, czyli jak przekuć porażkę w sukces. *Farm Pol* 70: 579-587



12. Zhou S-F, Zhong W-Z (2017) Drug Design and Discovery: Principles and Applications. *Molecules* 22: 279
13. Parrill AL, Reddy MR (1999) Rational Drug Design: Novel Methodology and Practical Applications. American Chemical Society, Washington, Stany Zjednoczone
14. Batool M, Ahmad B, Choi S (2019) A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci* 20: 2783
15. Tingle BI, Tang KG, Castanon M, Gutierrez JJ, Khurelbaatar M, Dandarchuluun C, Moroz YS, Irwin JJ (2023) ZINC-22—A Free Multi-Billion-Scale Database of Tangible Compounds for Ligand Discovery. *J Chem Inf Model* 63: 1166–1176
16. Li Q (2020) Application of Fragment-Based Drug Discovery to Versatile Targets. *Front Mol Biosci* 7: 180
17. Bajorath J (2017) Computational scaffold hopping: Cornerstone for the future of drug design? *Future Med Chem* 9: 629–631
18. Shegokar R (2020) Preclinical testing – Understanding the basics first, W: Drug Delivery Aspects, tom 4: Expectations and Realities of Multifunctional Drug Delivery Systems, Elsevier, Amsterdam, Holandia, str. 19-32
19. <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-2-preclinical-research>
20. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB (2010) Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Eng J Med* 363: 809–819
21. Young K, Minchom A, Larkin J (2012) BRIM-1, -2 and -3 trials: Improved survival with vemurafenib in metastatic melanoma patients with a BRAF<sup>V600E</sup> mutation. *Future Oncol* 8: 499–507
22. 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 AMM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA, BRIM-3 Study Group (2011) Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Eng J Med* 364: 2507–2516
23. <https://dev.trilogywritng.com/document/need-key-documents-drug-lifecycle/>
24. <https://www.animaethics.org.au/animal-ethics-committees>
25. <https://hal.science/hal-03790586/document>
26. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/development-approval-process-cber/investigational-new-drug-applications-ind-cber-regulated-products>
27. <https://www.fda.gov/drugs/types-applications/investigational-new-drug-ind-application>
28. <https://english.ccmo.nl/investigators/clinical-trials-with-medicinal-products-ctr/preparation-ctr/research-dossier-part-i/g-investigational-medicinal-product-dossier-impd>
29. Rengelshausen J, Breithaupt-Groegler K, Donath F, Erb-Zohar K, Hardman T, Mikus G, Plassmann S, Wensing G, Sourgens H (2021) How to Interpret an Investigator's Brochure for Meaningful Risk Assessment: Results of an AGAH Discussion Forum. *Ther Innov Regul Sci* 55: 612–618
30. <https://hub.ucsf.edu/protocol-development>
31. Jefford M, Moore R (2008) Improvement of informed consent and the quality of consent documents. *Lancet Oncol* 9: 485–493
32. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/e3-structure-and-content-clinical-study-reports>
33. <https://www.fda.gov/drugs/types-applications/new-drug-application-nda>
34. <https://www.fda.gov/drugs/types-applications/abbreviated-new-drug-application-nda>
35. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/marketing-authorisation/obtaining-eu-marketing-authorisation-step-step>
36. Rini BI (2006) Sorafenib. *Expert Opin Pharmacother* 7: 453–461
37. Shepherd C, Puzanov I, Sosman JA (2010) B-RAF Inhibitors: An Evolving Role in the Therapy of Malignant Melanoma. *Curr Oncol Rep* 12: 146–152
38. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, Sproesser K, Li L, Smalley KSM, Fong D, Zhu Y-L, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim S-H, Schlessinger J, Zhang KYJ, West BL, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim PN, Hirth P, Artis DR, Herlyn M, Bollag G (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3041–3046
39. Kim A, Cohen MS (2016) The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert Opin Drug Discov* 11: 907–916
40. Kim G, McKee AE, Ning Y-M, Hazarika M, Theoret M, Johnson JR, Xu QC, Tang S, Sridhara R, Jiang X, He K, Roscoe D, McGuinn WD, Helms WS, Russell AM, Miksinski SP, Zirkelbach JF, Earp J, Liu Q, Ibrahim J, Justice R, Pazdur R (2014) FDA Approval Summary: Vemurafenib for Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma with the BRAFV600E Mutation. *Clin Cancer Res* 20: 4994–5000
41. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zelforaf>
42. Eggermont AMM, Kirkwood JM (2004) Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? *Eur J Cancer* 40: 1825–1836
43. Odogwu L, Mathieu L, Blumenthal G, Larkins E, Goldberg KB, Griffin N, Bijwaard K, Lee EY, Philip R, Jiang X, Rodriguez L, McKee AE, Keegan P, Pazdur R (2018) FDA Approval Summary: Dabrafenib and Trametinib for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancers Harboring BRAF V600E Mutations. *Oncologist* 23: 740–745
44. Kainthla R, Kim KB, Falchook GS (2014) Dabrafenib. *Recent Results Cancer Res* 201: 227–240
45. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, Lichinitser M, Dummer R, Grange F, Mortier L, Chiarion-Sileni V, Drucis K, Krajsova I, Hauschild A, Lorigan P, Wolter P, Long GV, Flaherty K, Nathan P, Ribas A, Martin A-M, Sun P, Crist W, Legos J, Rubin SD, Little SM, Schadendorf D (2015) Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N Eng J Med* 372: 30–39
46. Cebollero A, Puértolas T, Pajares I, Calera L, Antón A (2016) Comparative safety of BRAF and MEK inhibitors (vemurafenib, dabrafenib and trametinib) in first-line therapy for BRAF-mutated metastatic melanoma. *Mol Clin Oncol* 5: 458–462
47. Qian T, Zhu S, Hoshida Y (2019) Use of big data in drug development for precision medicine: an update. *Expert Rev Precis Med Drug Dev* 4: 189–200
48. Arnold C (2023) Inside the nascent industry of AI-designed drugs. *Nat Med* 29: 1292–1295
49. Vamathevan J, Clark D, Czodrowski P, Dunham I, Ferran E, Lee G, Li B, Madabhushi A, Shah P, Spitzer M, Zhao S (2019) Applications of machine learning in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 18: 463–477

# From a mutation to a drug

Jan Wnuk, Tomasz Wilanowski✉

Faculty of Biology, University of Warsaw

✉corresponding author: t.wilanowski@uw.edu.pl

**Key words:** BRAF V600E; cancer; clinical trials; malignant melanoma; drug design; vemurafenib

## ABSTRACT

Malignant melanoma is a dangerous skin cancer, accounting for the majority of skin cancer-related deaths. Many patients with this cancer have the V600E mutation in the BRAF gene. This mutation causes constitutive activation of the MAPK/ERK signaling pathway, significantly contributing to the process of carcinogenesis. We discuss the drug design process on the example of a specific BRAF V600E inhibitor, vemurafenib. We begin with the most commonly used drug design methods. The second part of the article focuses on vemurafenib. We analyze the invention of this BRAF V600E inhibitor and its analogue as well as the course of three stages of clinical trials. Then we provide information about other popular drugs for malignant melanoma, i.e. dacarbazine and dabrafenib, and about the advantages of therapy with the simultaneous use of two inhibitors. Finally, we briefly discuss the role of artificial intelligence in the future of drug design.

