

ВЫЯВЛЕНИЕ ШИРОКОГО СПЕКТРА МУТАЦИЙ ГЕНА *BRAF* ДЛЯ НАЗНАЧЕНИЯ ТАРГЕТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕЛАНОМЫ

А.Н. Тороповский¹, А.Г. Никитин², А.В. Соловьев², Р.М. Хузина², О.Н. Павлова^{2,3}

¹ООО «ЭС ДЖИ», Ульяновск

²ООО «ТЕСТГЕН», Ульяновск

³Самарский государственный медицинский университет, Самара

Резюме. Меланома – агрессивное злокачественное образование кожи и слизистых нейроэпителиальной природы, гетерогенное как по фенотипу, так и по молекулярно-генетическим характеристикам, с высоким риском прогрессирования и неуклонно растущей заболеваемостью примерно на 5 % в год. Развитие меланомы обусловлено как внешними (ультрафиолетовым облучением), так и внутренними факторами, основными среди которых являются мутации в онкогенах и генах-супрессорах опухолей. В 75 % случаев меланомы кожи наблюдается гиперактивация сигнального пути *RAS/RAF/MEK/ERK*, и одним из его ключевых факторов является серин-треониновая киназа, кодируемая геном *BRAF*. Онкогенные мутации *BRAF* имитируют фосфорилирование активационной петли белка, что приводит к нахождению *BRAF* в постоянно активированном состоянии. Последующая работа *MAPK* сигнального пути в безостановочном режиме и потеря отрицательной обратной связи *BRAF* приводят к неконтролируемому росту и пролиферации клеток. Наиболее часто встречающимися мутациями в гене *BRAF* являются p.V600E (замена валина на глутаминовую кислоту), на чью долю приходится до 95 % случаев всех *BRAF*-мутантных меланом, и p.V600K (замена валина на лизин), которая может составлять до 20 % случаев и более. Разработка неселективных и селективных ингибиторов мутантного белка *BRAF* делают мутацию в данном гене предиктивным маркером ответа и эффективности применяемой таргетной терапии.

Ключевые слова: меланома, *BRAF*, таргетные препараты.

Для цитирования: Тороповский А.Н., Никитин А.Г., Соловьев А.В., Хузина Р.М., Павлова О.Н. Выявление широкого спектра мутаций гена *BRAF* для назначения таргетных препаратов для лечения меланомы. *Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье.* 2023;13(1):71–76. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2023.1.CLIN.4>

IDENTIFYING A WIDE RANGE OF MUTATIONS IN THE *BRAF* GENE FOR PRESCRIBING TARGETED DRUGS FOR MELANOMA TREATMENT

A.N. Toropovskii¹, A.G. Nikitin², A.V. Solovyev², R.M. Khuzina², O.N. Pavlova^{2,3}

¹"SJI", Ulyanovsk

²TESTGEN, Ulyanovsk

³Samara State Medical University, Samara

Abstract. Melanoma is an aggressive malignancy of the skin and mucosa of neuroepithelial nature, heterogeneous both in phenotype and molecular genetic characteristics, with a high risk of progression and a steadily increasing incidence of about 5% a year. The development of melanoma is due to both external (UV exposure) and internal factors, the main ones being mutations in oncogenes and tumour suppressor genes. Hyperactivation of *RAS/RAF/MEK/ERK* signalling pathway is observed in 75% of skin melanoma cases, and one of its key factors is serine threonine kinase encoded by *BRAF* gene. Oncogenic mutations of *BRAF* mimic the phosphorylation of the activation loop of the protein, which results in *BRAF* being in a permanently activated state. Subsequent operation of the *MAPK* signalling pathway in a non-stop mode and loss of *BRAF* negative feedback leads to uncontrolled cell growth and proliferation. The most common mutations in the *BRAF* gene are p.V600E (valine replacement for glutamic acid), which accounts for up to 95% of all *BRAF*-mutant melanomas, and p.V600K (valine replacement for lysine), which can account for up to 20% of cases or more. Development of non-selective and selective inhibitors of mutant *BRAF* protein make mutation in this gene a predictive marker of response and efficacy of targeted therapy.

Key words: melanoma, *BRAF*, targeted drugs.

Cite as: Toropovskii A.N., Nikitin A.G., Solovyev A.V., Khuzina R.M., Pavlova O.N. Identifying a wide range of mutations in the *BRAF* gene for prescribing targeted drugs for melanoma treatment. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ". Rehabilitation, Doctor and Health.* 2023;13(1):71–76. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2023.1.CLIN.4>



Меланома – агрессивное злокачественное образование кожи и слизистых нейроэпителиальной природы, гетерогенное как по фенотипу, так и по молекулярно-генетическим характеристикам, с высоким риском прогрессирования и неуклонно растущей заболеваемостью примерно на 5 % в год [1, 2]. Однако, одновременно с этим наблюдается существенное увеличение общей пятилетней выживаемости пациентов с меланомой, что обусловлено развитием способов диагностики и, соответственно, выявлением заболевания на ранних стадиях [3].

На территории Российской Федерации, по данным за 2018 год, ведущей локализацией меланомы у обоих полов является кожа [4]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения в структуре злокачественных новообразований кожи меланома занимает не более 10 %, будучи ответственной за 80 % летальных исходов среди пациентов этой группы [2], причем смертность от меланомы растёт гораздо быстрее, чем от других злокачественных образований [5].

Большому успеху в области лечения метастатической меланомы мы обязаны разработанным за последние десятилетия таргетным препаратам, первый из которых – ипилимумаб – был разработан более 10 лет назад [6]. За прошедшие десять лет список препаратов, применяемых для лечения меланомы, как запущенных стадий, так и применяемых у пациентов с высоким риском прогрессирования после хирургического лечения, был существенно расширен, что обуславливает необходимость практикующего онколога ориентироваться в принципах их назначения.

Развитие меланомы обусловлено как внешними (ультрафиолетовым облучением), так и внутренними факторами, основными среди которых являются мутации в онкогенах и генах-супрессорах опухолей. В 75 % случаев меланомы кожи наблюдается гиперактивация сигнального пути *RAS/RAF/MEK/ERK* (рис. 1). Одним из его ключевых факторов является серин-треониновая киназа, кодируемая геном *BRAF*. Мутации в гене *BRAF* становятся основополагающими в 40–80 % случаев меланомы кожи. На сегодняшний день известно около 40 соматических мутаций в гене *BRAF* [7]. В 80 % случаев выявляется нуклеотидная замена *T1799A* в 15-м экзоне *BRAF*, приводя-

щая к замене валина на глутаминовую кислоту в 600-м кодоне (*V600E*) [8]. В 20 % случаев мутации кодона-600 представлены заменой *V600K*, редко встречаются замены *V600R/D/M*. Частота мутации *V600K* может достигать 5–10 %, а мутации *V600D* и *V600R* встречаются значительно реже [9].

Учитывая важность этого гиперактивированного пути в развитии меланомы, было разработано несколько ингибиторов *MAPK* для целенаправленного лечения опухолей с мутацией *V600 BRAF*, включая ингибиторы *BRAF* (*BRAFⁱ*; вемурафениб, дабрафениб и энкорафениб) и ингибиторы *MEK* (*MEKⁱ*; кобиметиниб, траметиниб и биниметиниб). Было показано, что применение *BRAFⁱ* и *MEKⁱ* в качестве отдельных агентов или в комбинации улучшает выживаемость при меланоме и немелкоклеточном раке легкого (НМРЛК).

Данные крупномасштабного секвенирования выявили множество дополнительных «горячих точек» мутаций *BRAF*, существующих за пределами кодона *V600*. Онкогенные мутации *BRAF* имитируют фосфорилирование активационной петли белка, что приводит к нахождению *BRAF* в постоянно активированном состоянии. Последующая работа *MAPK* сигнального пути в безостановочном режиме и потеря отрицательной обратной связи *BRAF* приводят к неконтролируемому росту и пролиферации клеток. Также для мутаций *BRAF* было установлено влияние на способность к тканевой инвазии. В связи с этим появление мутации *BRAF* рассматривается не только как событие, инициирующее неопластическую трансформацию, но и как способствующий дальнейшему прогрессированию механизм биологической адаптации опухолевой клетки.

Недавно была предложена новая система классификации мутаций *BRAF*. Мутации *V600* относятся к классу I мутаций *BRAF* и представляют собой *RAS*-независимые мономеры. Мутации класса II также являются *BRAF*-активирующими, но *RAS*-независимыми димерами. Существует различие между мутациями класса II *BRAF* на основе их местоположения; мутации класса IIa происходят в активационном сегменте (т.е. L597, K601), а мутации класса IIb – в р-петле, богатой глицином (т.е. G464, G469). Класс III состоит из мутаций *BRAF* с «низкой активностью» или подавляющих киназную активность [10].

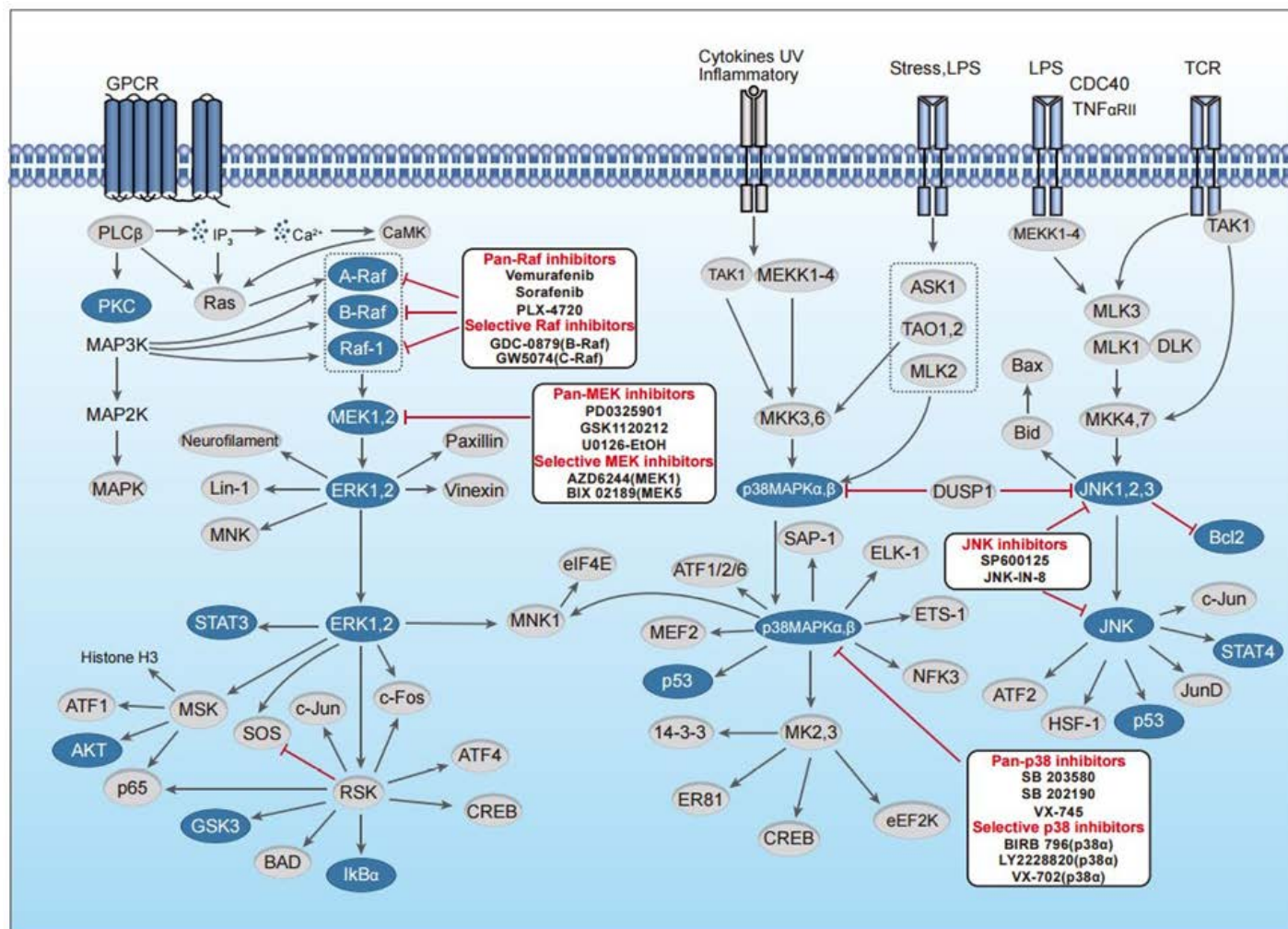


Рисунок 1. Путь MAPK. Источник: <https://www.cancertreatmentsresearch.com/intracellular-pathways-relevant-in-cancer/>
Figure 1. MAPK pathway. Source: <https://www.cancertreatmentsresearch.com/intracellular-pathways-relevant-in-cancer/>

BRAF-мутантная меланома ассоциируется с более молодым возрастом пациентов, отсутствием связи с ультрафиолетовым облучением, локализацией на туловище и высоким числом невусов на теле [11].

Высокая частота мутаций при меланоме может быть связана с особенностями биологии меланоцитов. Наличие данных драйверных мутаций в этих клетках определяет потенциальную чувствительность опухолей к таргетной терапии. А-меланоцитстимулирующий гормон и другие родственные проопиомеланокортин-производные пептиды являются важнейшими регуляторами биологии меланоцитов, которые связываются с рецептором меланокортина I, повышая уровень циклического АМФ, что приводит к увеличению пролиферации и меланогенеза в ответ на УФ-излучение. Этот цАМФ-зависимый сигнальный каскад активирует *BRAF* и

впоследствии *ERK9*. Это основной специфический для меланоцитов сигнальный путь, контролирующий пролиферацию и дифференцировку [12].

Наиболее часто встречающимися мутациями в гене *BRAF* являются p.V600E (замена валина на глутаминовую кислоту), на чью долю приходится до 95 % случаев всех *BRAF*-мутантных меланом, и p.V600K (замена валина на лизин), которая может составлять до 20 % случаев и более. Согласно исследованию, проведенному в Институте меланомы (Австралия) A. Menzies, M. S. Carlino и соавт. в 2012 г., мутантные V600E меланомы имели более высокую долю локализации на конечностях, а мутантные меланомы V600K более часто встречались на коже головы и шеи. Также было установлено, что распространённость мутации *BRAF* обратно пропорциональна возрасту: так, молодые

пациенты с метастатической меланомой имели более высокую распространённость мутации **BRAF** с преобладанием **V600E** генотипа, тогда как у пациентов пожилого возраста отмечалась меньшая распространённость мутации **BRAF** с большей долей генотипов, отличных от **V600E** (преимущественно **V600K**). Кроме того, ряд исследований показывает наличие связи между **V600K** генотипом и наличием хронического солнечного повреждения: возможно, что этиология меланомы **V600K** отличается от меланомы **V600E**, и, в отличие от последней, хроническое солнечное повреждение может играть важную роль в её патогенезе [13].

Разработка неселективных и селективных ингибиторов мутантного белка **BRAF** делают мутацию в данном гене предиктивным маркером ответа и эффективности применяемой таргетной терапии.

Однако практически у всех пациентов, получающих лечение ингибиторами **B-RAF**, развивается лекарственная устойчивость, приводящая к клиническим рецидивам. Выявленные до сих пор гетерогенные механизмы приобретенной устойчивости к **BRAF** относятся к общим **MAPK**-редуцирующим, **AKT**-зависимым (Serine/threonine protein kinase) или **MAPK**-реактивирующим путям. Вопреки ожиданиям, вторичные мутации **V600E B-RAF** не были обнаружены для объяснения приобретенной устойчивости к **B-RAF**, что позволяет предположить, что механизмы обхода **V600E BRAF** являются основным способом реактивации пути **ERK** (extracellular signal-regulated kinase) [14].

Однако комбинация кобиметиниба с вемурафенибом улучшает выживаемость без прогрессирования по сравнению с плацебо и вемурафенибом у ранее не леченных пациентов с **BRAF(V600)**-мутантной распространённой меланомой. Исследование, проведенное Hoffmann-La Roche, показало, что у взрослых пациентов с гистологически подтверждённой **BRAF (V600)** мутацией неоперабельной меланомой IIIС или IV стадии одновременное применение ингибиторов **BRAF** и ингибиторов **MEK** увеличивает безрецидивную выживаемость до 12–3 месяцев для комбинации кобиметиниб и вемурафениб по сравнению с 7–2 месяцами для плацебо и вемурафениба. Это же исследование показывает увеличение до 22–3 месяцев для группы пациентов, получавшей кобиметиниб и вемурафениб, против 17–4 месяцев для плацебо и вемурафениба [15].

У 5–10 % пациентов с **BRAF**-мутацией обнаруживаются варианты, отличные от **p.V600E/K**. Несмотря на то, что большинство из них сопровождаются активацией **MAPK**, их прогностическая и предиктивная роли в настоящее время до конца не выяснены (табл. 1) [14–16]. Редкие мутации, затрагивающие кодоны 600 или 601 гена **BRAF**, а также мутация **p.L597R** потенциально чувствительны к комбинации **BRAF** + **MEK** или к монотерапии **MEK**-ингибиторами [16].

Таблица 1. Список мутаций 600 кодона гена **BRAF**, определяемый с помощью набора **BRAF** Ryro Kit (Qiagen, Германия)

Table 1. List of 600 codon **BRAF** mutations determined using the **BRAF** Ryro Kit (Qiagen, Germany)

Мутация	Замена нуклеотидов	Замена валина	COSMIC ID
V600E	1799T > A	Глутаминовая кислота	476
V600K	1798_1799 GT > AA	Лизин	473
V600M	1798G > A	Метионин	1130
V600D	1799_1800 TG > AT	Аспарагиновая кислота	477
V600R	1798_1799 GT > AG	Аргинин	474
V600E complex	1799_1800 TG > AA	Глутаминовая кислота	475
V600A	1799T > C	Аланин	18443
V600G	1799T > G	Глицин	6137

Обращает на себя внимание тот факт, что примерно 5 % пациентов имеют редкие мутации в 600 кодоне, и это важно учитывать при выборе тест-системы, с помощью которой тестируются образцы, поскольку во многих коммерческих наборах возможна детекция лишь двух наиболее частых мутаций. Тем не менее эти мутации патогенетические и также отвечают на терапию ингибиторами киназ. Таким образом, очевидна потребность клинического внедрения и расширения возможностей технологии молекулярно-генетического тестирования для эф-

фективного принятия решений о назначении молекулярно-направленной терапии онкологических больных. При этом необходима оптимизация подходов на основе учёта популяционной специфики, объективных условий, связанных с наличием внутриопухолевой гетерогенности, а также организационно-технических возможностей. Всё это внесет значимый вклад в совершенствование молекулярно-генетической диагностики в онкологии.

Литература/References

- 1 Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer*. 2013;132:385–400. <https://doi.org/10.1002/ijc.2761>
- 2 Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica*. 2013;635203.
- 3 Thomas L., Tranchand P., Berard F. et al. Semiological value of ABCDEcriteria in the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. *Dermatology (Basel)*. 1998; 197: 11–17. <https://doi.org/10.1159/000017969>
- 4 Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2019 г. (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. 2020:252. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2019 (morbidity and mortality). Moscow: Herzen Scientific Research Institute of Radiology, branch of NMRC of Radiology, Ministry of Health of Russia. 2020:252. (In Russ)]
- 5 Lens M.B., Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol*. 2004;150:179–185
- 6 Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B. et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- 7 Davies MA, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 2010;29(41):5545–5555.
- 8 Davies H., Bignell G. R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949–954.
- 9 Кит О.И., Водолажский Д.И., Златник Е.Ю., Ефимова И.Ю., Кочуев С.С., Пржедецкий Ю.В. Ассоциация мутационного статуса гена BRAF и клинико-морфологических особенностей меланомы кожи. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2016;3. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Zlatnik E.Yu., Efimova I.Yu., Kochuev S.S., Przhedetsky Y.V. Association of mutation status of BRAF gene and clinical and morphological features of skin melanoma. *Kuban Scientific Medical Bulletin*. 2016;3. (In Russ)]. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/assotsiatsiya-mutatsionnogo-statusa-gena-braf-i-kliniko-morfologicheskikh-osobennostey-melanomy-kozhi>
- 10 Dankner M., Lajoie M., Moldoveanu D., Nguyen T.T., Savage P., Rajkumar S. et al. Dual MAPK Inhibition Is an Effective Therapeutic Strategy for a Subset of Class II BRAF Mutant Melanomas. *Clin Cancer Res*. 2018;24(24):6483–6494. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3384>
- 11 Menzies A.M., Haydu L.E., Visintin L., Carlino M.S., Howle J.R., Thompson J.F. et al. Distinguishing Clinicopathologic Features of Patients with V600E and V600K BRAF-Mutant Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3242–3249. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0052>
- 12 Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S. et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- 13 Menzies A.M., Haydu L.E., Visintin L., Carlino M.S., Howle J.R., Thompson J.F. et al. Distinguishing Clinicopathologic Features of Patients with V600E and V600K BRAF-Mutant Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3242–3249. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0052>
- 14 Shi, H., Moriceau, G., Kong, X., Lee, M., Lee, H., Koya, R., Ng, C., Chodon, T., Scolyer, R.A., Dahlan, K.B., Sosman, J.A., Kefford, R.F., Long, G.V., Nelson, S.F., Ribas, A., & Lo, R.S. Melanoma whole exome sequencing identifies V600EB-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nature communications*. 2012;3:724–724.
- 15 Ascierto P.A., McArthur G.A., Dréno B., Atkinson V., Liszczak G., Di Giacomo A.M. et al. Cobimetinib Combined with Vemurafenib in Advanced BRAF(V600)-Mutant Melanoma (coBRIM): Updated Efficacy Results from a Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol*. 2016;17(9):1248–1260. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30122-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30122-X)
- 16 Зарецкий А.Р., Демидов Л.В., Самойленко И.В. Биомаркеры при метастатической меланоме кожи: можем ли мы точнее выбирать тактику лечения наших пациентов? *Медицинский совет*. 2021;9:48–63. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-9-48-63> [Zaretsky A.R., Demidov L.V., Samoilenko I.V. Biomarkers in metastatic skin melanoma: can we choose treatment tactics more accurately for our patients? *Medical Advice*. 2021;9:48–63. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-9-48-63> (In Russ)]

Конфликт интересов. Автор О.Н. Павлова является заведующей редакции журнала. В рецензировании данной работы участия не принимала.

Competing interests. Author O.N. Pavlova is the head of the editorial office of the magazine. She did not participate in the review of this work.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Funding. This research received no external funding.

Авторская справка

Тороповский Андрей Николаевич кандидат медицинских наук, генеральный директор, ООО «ЭС ДЖИ», Ульяновск, Россия
E-mail: director@testgen.ru

ORCID 0000-0001-9779-5708

Вклад в статью 20 % – определение задач и дизайна исследования

Никитин Алексей Георгиевич кандидат биологических наук, советник по науке ООО «ТестГен», Ульяновск, Россия
ORCID 0000-0001-9762-3383

Вклад в статью 20 % – анализ данных литературы

Соловьев Алексей Вячеславович руководитель отдела ПЦР-разработок ООО «ТестГен», Ульяновск, Россия
ORCID 0000-0002-4837-2554

Вклад в статью 20 % – анализ данных литературы

Хузина Рузалия Маратовна младший научный сотрудник ООО «ТестГен», Ульяновск, Россия
ORCID 0000-0003-2993-4045

Вклад в статью 20 % – анализ данных литературы

Павлова Ольга Николаевна доктор биологических наук, доцент научный сотрудник ООО «ТестГен», Ульяновск, Россия
заведующая кафедрой физиологии с курсом безопасности жизнедеятельности и медицины катастроф, Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

E-mail: casiopeya13@mail.ru

ORCID 0000-0002-8055-1958

Вклад в статью 20 % – подведение итогов исследования, формулирование выводов

Статья поступила 25.12.2022

Одобрена после рецензирования 02.02.2023

Принята в печать 06.02.2023

Received December, 24th 2022

Approved after reviewing February, 2th 2023

Accepted for publication February, 6th 2023