

BRAF és NRAS mutáció klinikai értéke melanomában

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Czirbesz Kata

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Doktori iskola vezetője: Prof.Dr. Bogár Lajos

Programvezető: Prof.Dr. Kiss István

Témavezető: Prof.Dr. med.habil. Liszkay Gabriella PhD.

Pécs, 2022

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke.....	4
2	Absztrakt.....	7
3	Bevezetés.....	9
3.1	Epidemiológiai, mortalitási jellemzők.....	9
3.2	A melanoma kialakulásának rizikófaktorai.....	10
3.3	Klinikai és szövettani osztályozás.....	11
3.4	A melanoma szövettani jellemzői, molekuláris háttere és a legfontosabb mutációk prognosztikai szerepe.....	13
3.5	A melanoma immunológiai háttere.....	15
3.6	A melanoma TNM stádiumbeosztása.....	16
3.7	A melanoma terápiája.....	16
3.7.1	A melanoma sebészi kezelése.....	17
3.7.2	A melanoma sugárterápiája.....	18
3.7.3	A melanoma gyógyszeres terápiája.....	19
4	Célkitűzések.....	26
5	Anyag és Módszer.....	27
5.1	A BRAF gátló vemurafenib monoterápia klinikai hatékonyságának és biztonságosságának vizsgálata.....	27
5.1.1	A betegbevonás kritériumai, a vizsgálat kivitelezése, értékelése.....	27
5.1.2	Molekuláris patológiai vizsgálat.....	28
5.1.3	Statisztikai elemzés.....	28
5.2	A BRAF-MEK gátló kombinációs célzott terápia klinikai hatékonyságának és biztonságosságának vizsgálata.....	29
5.2.1	A betegbevonás kritériumai, vizsgálat kivitelezése, értékelése.....	29
5.2.2	Molekuláris patológiai vizsgálat.....	31
5.2.3	Statisztikai elemzés.....	31
5.3	A BRAF és NRAS mutáció prognosztikai és prediktív értékének megállapítása.....	31
5.3.1	A betegbevonás kritériumai és a vizsgálatok kivitelezése, értékelése.....	31
5.3.2	Molekuláris patológiai vizsgálat.....	32
5.3.3	Statisztikai elemzés.....	33
6	Eredmények.....	34

6.1	BRAF gátló monoterápiával elért eredményeink metasztatikus melanomában szenvedő betegeinknél	34
6.2	BRAF-MEK gátló kombinációs célzott terápiával elért eredményeink	40
6.3	A primer melanoma BRAF és NRAS mutációjának prediktív és prognosztikai értéke a sentinel nyirokcsomó státusszal összefüggésben	48
7	Megbeszélés	59
8	Új megállapításaink, következtetéseink	67
9	Irodalomjegyzék	69
10	Köszönetnyilvánítás	77
11	Publikációk jegyzéke	79
11.1	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	79
11.2	Egyéb közlemények	79
11.3	Idézhető elsőszerzős absztraktok	80

1 Rövidítések jegyzéke

AE:	Adverse event (mellékhatás)
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
ALM:	Acral Lentiginous Melanoma (akrolentiginózis melanoma)
ASCO:	American Society of Clinical Oncology
BRAF:	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CDKN2A:	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (Ciklin dependens kináz gátló 2A)
CDK4:	Cyclin-dependent kinase 4
CI:	confidence interval
CR:	Complete Remission (komplett remisszió)
CT:	Computed Tomography
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTLA-4:	cytotoxikus T-limfocita asszociált antigén-4
DCR	Disease Control Rate (betegség kontroll ráta)
DMFS:	Distant Metastasis-free Survival (távoli metasztázis mentes túlélés)
DNS:	Dezoxiribonukleinsav
DSS:	Disease Specific Survival (betegség specifikus túlélés)
ECOG:	Eastern Cooperative Oncology Group
EMA:	European Medicines Agency (Európai Gyógyszerügynökség)
ESMO:	European Society for Medical Oncology
ERK:	extracellular-signal-regulated kinase (extracelluláris szignál regulált kináz)
FDA:	Food and Drug Administration (Amerikai Élelmiszer és Gyógyszerfelügyeleti Hivatal)
GDP:	guanozin-difoszfát
GNA11	Guanine Nucleotide-Binding Protein, Alpha-11
GNAQ	G protein subunit alpha q (G fehérje alfa q alegység)
GTP:	guanozin-trifoszfát
Gy:	Gray, egységnyi tömeg által elnyelt energia mértékegysége
HIF-1 α :	Hypoxia-inducible factor 1-alpha (Hypoxia indukálta faktor 1)
HMB-45:	Human Melanoma Black-45
HR:	Hazard Ratio (kockázati arány)

IL-2:	Interleukin-2
iRECIST:	immune Response Evaluation Criteria in Solid Tumours immunválasz szerinti kiértékelés szolid tumorokban
LDH:	laktát-dehidrogenáz
LMM:	Lentigo Maligna Melanoma
MAPK:	mitogen-activated protein kinase (mitogén aktivált protein kináz)
MC1R:	melanocortin 1 receptor (melanokortin 1 receptor)
MEK:	MAPK/ERK kináz
NCCN:	National Comprehensive Cancer Network
NER:	nukleotid excíziós repair
NF1	neurofibromin-1
NM:	nodular melanoma (noduláris melanoma)
NRAS:	neuroblastoma ras
OS:	Overall Survival (teljes túlélés)
ORR:	Objective Response Rate (objektív terápiás válasz)
PCR:	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PD:	progressive disease (progresszív betegség)
PD-1:	programmed cell death protein 1 (programozott sejthalál fehérje-1)
PD-L1:	programmed cell death-ligand 1 (programozott sejthalál ligandum-1)
PFS:	Progression free survival (progressziómentes túlélés)
PR:	partial remission (részleges remisszió)
PTEN:	Phosphatase and Tensin Homolog
RECIST:	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
RR:	Risk Ratio (relative rizikó) Response Rate (terápiás válaszarány)
SD:	Stabile disease (stabil betegség)
SF:	Surviving Fraction (túlélő sejtek száma)
SLN:	Sentinel Lymph Node (őrszem nyirokcsomó)
SLNB:	sentinel lymph node biopsy (őrszem nyirokcsomó biopszia)
SSM:	superficial spreading melanoma (felszínesen terjedő melanoma)
TCR:	T-cell receptor
TIL:	tumor-infiltrating lymphocytes (tumort infiltráló limfociták)
TLR:	T-lymphocyte receptor (T-limfocita receptor)

TNM: TNM Classification of malignant tumors
(a malignus tumorok TNM osztályozása)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
(vaszkuláris endoteliális növekedési faktor)

UV: ultraviolet (ultraibolya)

2 Absztrakt

Háttér és célkitűzések

A melanoma immunológiájának és molekuláris patológiájának a fejlődése innovatív gyógyszerek megjelenéséhez vezetett, amelyek forradalmasították a melanoma terápiáját, illetve az új molekuláris ismeretek bővítik a prognosztikus faktorok palettáját is. Vizsgálatunkban a BRAF pozitív melanoma BRAF kináz gátló vemurafenib monoterápia és a BRAF-MEK gátló (dabrafenib+trametinib, vemurafenib+cobimetinib) kombinációs terápia „real-life” adatait (RR, PFS, OS, gyógyszerhez köthető nemkívánatos események) elemezzük retrospektív analízisben. Primer melanomák prognosztikai paramétereit, köztük azok BRAF és NRAS mutációs státuszát vetjük össze a sentinel nyirokcsomó státusszal és a betegség kimenetelével.

Módszer:

- 43 előrehaladott melanomában szenvedő BRAF pozitív vemurafenib terápiában részesített 2012 novembere és 2015 októbere között beválasztott betegnél elemeztük a hatékonyságot és a biztonságosságot.
- 118, 2015 novembere és 2018 decembere között alkalmazott BRAF-MEK inhibitor (80 dabrafenib+trametinib, 38 vemurafenib+cobimetinib) terápiánál vizsgáltuk a fenti paramétereket.
- 2011 októbere és 2015 júliusa között operált 159 betegnél vizsgáltuk a primer melanoma ismert prognosztikai faktorait, valamint a BRAF és NRAS mutációs státuszát az őrszem nyirokcsomók állapotával és a betegség kimenetelével összefüggésben.

Eredmények:

- Vemurafenib monoterápiával 51,1%-os objektív tumorválaszt értünk el (11,6% CR). A medián progressziómentes túlélés 6,5 hónap, a teljes túlélés 11,5 hónap volt. Többváltozós analízisben a túlélés legfontosabb prediktorának a terápia kezdetekor mért LDH szint bizonyult ($p=0,017$). Gyógyszermellékhatás szinte valamennyi betegnél előfordult, leggyakrabban bőrtünet jelentkezett. Grade 3-as mellékhatást 17%-ban észleltünk, Grade 4-es nem fordult elő.
- Dabrafenib+trametinib terápiánál 82%-ban, vemurafenib+cobimetinibnél 76%-ban jelentkezett terápiás válasz (ORR). A medián PFS 8,5 és 8 hónap, a medián teljes túlélés (OS) 12 és 18 hónap volt. Agyi metasztázis jelenléte a túlélés negatív

prediktorának bizonyult. Grade 3-4 fokozatú mellékhatás vemurafenib+cobimetinib esetén 34%-ban, dabrafenib+trametinib mellett 10%-ban jelentkezett.

- A primer tumor mutációs státusza és az SLNB eredménye között nem találtunk szignifikáns összefüggést. Az NRAS mutáció a progressziómentes túlélés negatív prediktorának bizonyult többváltozós analízissel ($p=0,047$) és közel szignifikánsnak a távoli metasztázismentes túléléssel ($p=0,06$).

Következtetések:

- A vemurafenib monoterápiával elért eredményeink hasonlóak a BRIM-3 törzskönyvezési vizsgálatéhoz.
- A célzott kombinációs terápia hatékonysága betegeinknél elmarad a törzskönyvezéshez vezető tanulmányokétól (coBRIM, COMBI-d, COMBI-v), amit a betegek rosszabb prognosztikai paramétereivel magyarázhatunk.
- A sentinel nyirokcsomó státusztól függetlenül a primer tumor NRAS mutációja a melanoma független prognosztikai tényezőjének bizonyult. A BRAF mutáció és a sentinel nyirokcsomó státusz (SLN), illetve a betegség kimenete között nem találtunk szignifikáns összefüggést.

3 Bevezetés

A melanoma malignum incidenciája a fehér bőrű populációban az elmúlt évtizedekben folyamatosan növekvő tendenciát mutat. Magas metasztatizáló hajlama miatt, bár az összes bőrdaganat kevesebb, mint 5%-át teszi ki, a bőrdaganatok okozta halálozás mintegy 90%-áért felelős.¹

Újabb hazai tanulmány alapján, a melanoma incidenciájának csökkenése a korai diagnosztika eredményeképpen, valamint a tumor molekuláris patológiai háttérének felismerésével a célzott, valamint az immunterápiák bevezetésével az elmúlt években a mortalitási mutatók lassú csökkenő tendenciája is észlelhető.²

Az elmúlt évtizedben klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy az innovatív terápiák az előrehaladott melanómában szenvedő betegek túlélését szignifikánsan meghosszabbították. Tanulmányunkban az Országos Onkológiai Intézet Dermatoonkológiai osztályán kezelt, célzott terápiában részesült betegeink „real-life” túlélési adatait, valamint mellékhatás profiljukat összegezzük a szakirodalmi adatokat is értékelve, valamint a BRAF és NRAS mutáció prediktív és prognosztikai értékét elemeztük a sentinel nyirokcsomó státusszal összefüggésben.

3.1 Epidemiológiai, mortalitási jellemzők

A melanoma 90%-ban a bőr melanocytaiból kiinduló, ektodermális eredetű rosszindulatú daganat. Az esetek csupán 4-5%-ában jelentkezik extracutan lokalizációban intraocularisan (a chorioideából, a corpus ciliaréből, vagy az irisből), nyálkahártyákon, illetve leptomeningealisan. Az intraocularis melanoma a szemészeti daganatok közül a leggyakoribb típus. A melanoma incidenciája a kaukázusi populációban az elmúlt évtizedekben növekvő tendenciát mutat, 2018-ban világszerte mintegy 300.000 új esetet regisztráltak. Európában 100.000 lakosra 12-25, az Egyesült Államokban 25-30, Ausztráliában 50-60 új melanomás beteget diagnosztizálnak. A cutan melanoma incidenciájának éves szintű becsült növekedése populációtól függően 3-7,7%.³ Magyarországon 2018-ban a Nemzeti Rákregiszter adatai alapján a 2778 új esetet diagnosztizáltak, 1443 nő és 1335 férfi megbetegedést regisztráltak.⁴ A betegek átlagéletkora a hatodik évtizedre esik, azonban az utóbbi évtizedben növekvő tendenciát észlelhetünk a fiatalabb betegpopulációban, ahol az egyik leggyakoribb daganat a melanoma. A 20-39 éves korosztályban az Egyesült Államokban a 3. leggyakoribb

daganattípusként említik mindkét nemben.⁵ Gyermekkori melanoma előfordulása igen ritka. A 14 éves kor alatti megbetegedések száma 2013-ban nem érte el az összes megbetegedés 1 ezrelékét. Bár a melanoma a bőrdaganatok csupán kevesebb, mint 5%-át képezi, a bőrdaganatok okozta mortalitás 90%-áért felelős.¹ A mortalitási mutatók az incidenciával nem párhuzamosan, de növekedést mutattak az elmúlt évtizedekben. Egy hazai adatokat feldolgozó, 2021-ben publikált tanulmány alapján mind az incidencia, mind a mortalitás növekvő tendenciája kismértékben csökkenni kezdett 2015-től. 2011 és 2018 közötti periódusban 16,55%-os mortalitásbeli csökkenés észlelhető. Mindezek háttérében a melanoma sikeres primer- és szekunder prevenciója, populáció szintű edukáció és modern terápiák megjelenése állhat.²

3.2 A melanoma kialakulásának rizikófaktorai

A melanoma kialakulásában több tényező is szerepet játszhat, legfontosabb környezeti hatásként a nap elektromágneses UVA, UVB nem ionizáló sugárzásai, bizonyos genetikai tényezők, bőrtípus, valamint a szervezet immunológiai státusza szerepelnek. Legfontosabb etiológiai tényező az UV nem ionizáló sugárzás. Az ózonréteg elvékonyodása, valamint a Föld pólusai fölött jelentkező elvékonyodott atmoszféra, ún. „ózonlyukak” következtében az UV sugarak kisebb hányada nyelődik el a sztratoszférában, az UVB (280-315 nm) sugarak nagyobb arányban jutnak a légkörbe, ezzel a bőrdaganatok kialakulásának rizikóját növelve. Az 1990-es évektől ismert, hogy az UVA (315-400 nm) sugaraknak is daganatkeltő hatásuk van, az arteficialis UV fény rákkeltő hatásának szerepe szintén kiemelendő a melanoma etiológiájában. Az UVB fotonok legjelentősebb hatása, hogy a DNS-ben elnyelődve ciklobután pirimidin dimer (CPD), és (6-4)-pirimidin fotoproduktumokat indukálnak. Ezeket a fototermékeket az ép sejtekben a nukleotid excíziós repair (NER) észleli és javítja ki. Az UVA döntően reaktív gyökök keletkezésén keresztül okoz génmutációkat. Az UV sugarak direkt DNS károsodás és onkogénaktiváció mellett a repair mechanizmusban szerepet játszó p53 tumorszupresszor gén apoptózisregulátor funkcióbeli károsodását is okozzák. Emellett immunszuprimáló hatásuk van, reaktív szabadgyökök képződésével további mutációkat hoznak létre.⁶⁻⁹

A cutan melanoma kialakulásában tehát az UV sugárzás szempontjából a kumulatív UV expozíció, az intermittáló intenzív napfény behatás, illetve az arteficialis UVA expozíció kiemelendő. A gyermekkori, különösen 10 év alatti exponált UV sugárzás, valamint a gyermekkori hólyagos napégések száma bizonyított rizikótényező.¹⁰⁻¹³ Mindezek mellett

rizikótényező lehet a neonatális korban alkalmazott kékfény terápia, mely a melanocyter naevusok számát növelheti.^{14,15} Genetikai rizikótényezők a CDKN2A és CDK4 tumorszupresszor gének, a melanocortin 1-receptor gén (MC1R), valamint bizonyos repair gének mutációi, melyek a melanomában szenvedő betegek 10%-ában vannak jelen.¹⁶⁻¹⁸ A repair mechanizmus súlyos genetikailag meghatározott hibája, a xeroderma pigmentosum szintén bőrtumorok magas rizikójával jár.¹⁹ Rizikófaktor az I-II-es bőrtípus, fenotípus jegyek szempontjából a fehér bőr mellett a vörös, szőke hajszín és kék szem. A nagyszámú, 100-nál több anyajegy jelenléte, az atypusos naevusok, valamint a diszplasztikus naevus syndroma rizikócsoportha sorolják az egyént.¹⁰ Mindezek mellett fokozott rizikót jelent az anamnézisben szereplő primer melanoma, mely esetén nagyobb rizikó áll fenn szekunder melanoma kialakulására, valamint a kórtörténetben szereplő egyéb bőrtumor is. Immunszupresszióval járó állapotokban, így a szervtranszplantációban részesült betegeknél is magasabb rizikót észleltek melanoma kialakulására.^{20,21}

3.3 Klinikai és szövettani osztályozás

A melanomának különböző típusai ismertek, amelyek jellegzetes szövettani eltérésekkel, klinikai megjelenéssel járnak.

Az **in situ** melanoma a legjobb prognózisú típus, ahol igen felszínesen, csupán az epidermiszt infiltrálva találhatóak a daganatsejtek. Metasztatikus potenciálja nincs, csak 1-1 esetben számol be a szakirodalom metasztázis kialakulásáról.¹ Amennyiben nem kerül excízióra, idővel metasztatizáló invazív daganattá fejlődhet.

A szuperficialisan terjedő melanoma (**SSM**) a leggyakrabban, az esetek kb 70%-ában előforduló melanomatípus. Jellegzetesen lassan növekszik radiális növekedési szakaszban, ilyenkor a daganatsejteknek nincs metastatikus képességük. Ezt követően vertikális növekedési fázisba kerül a daganat, ekkor áttétképző jellege megnövekszik. Férfiakon jellemzően a hát felső részén, nőknél az alsó végtagon jelentkeznek. Klinikailag a környezettől élesen elhatárolt, szabálytalan alakú, laposan kiemelkedő plakk. Gyakran regressziós résszel találkozhatunk a dermatoszkópos vizsgálat során, mely kezdetben lehet livid-erythemás, majd szürkés, későbbiekben fehér atrophias megjelenésű. Szövettani képét az intraepidermálisan proliferáló pagetoid infiltráció jellemzi.

A noduláris melanoma (**NM**) a melanoma második leggyakoribb szövettani altípusa, mintegy 15-25%-ban fordul elő. A bőr vertikális irányú infiltrációjával kezdődik, a

vertikálisan proliferáló sejtekre a magasabb metasztatizáló potenciál is jellemző. Klinikailag előfordul a polypoid, nyeles megjelenés, gyakran homogén, kékesfekete színű, de lehet amelanotikus is. Szövettanilag jellemző, hogy az invazív tumort környező hám alig érintett, legfeljebb három papilla fordulhat elő a legnagyobb tumortömeg mellett az epidermisben.

A lentigo maligna melanoma (**LMM**) a primer melanomák mintegy 4-15%-ában fordul elő, általában idősebb korban jelentkezik, leggyakrabban az arcon, nyakon, kézfejen, lábszáron. Előzménye a lentigo maligna, mely csupán a basalmembránt respektáló in situ melanocytá prolifерáció. Preinvazív formában évekig fennállhat, lassan alakul ki az invazív átalakulás. Klinikailag bizarr alakú, éles szélű egyenetlenül pigmentált folt.

Az acrolentiginosus melanoma (**ALM**) az acralis területeken, főleg a tenyéren, talpon vagy a körömlemez alatt alakul ki. Kaukázusi populációban 2-8% az előfordulása, az ázsiaiaknál 30-46%, az afrikai populációban 60-72%-ban található forma. Gyakran amelanotikus, sebre emlékeztető tumor, mely lehet hyperkeratotikus is. A subungualis tumor kezdetben a körömlemez elszíneződését okozza, ez megjelenhet longitudinálisan, vagy szabálytalan formában.¹

A **ritkább klinikai formákhoz** tartozik a nyálkahártyai, az ocularis, dezmozepitális, a spitzoid, a kongenitális és a kék naevusból kialakuló melanoma.

Az **extracutan melanomák** közül az ocularis melanoma az összes melanoma 2-5%-a. Leggyakrabban az uveából, annak hátsó részén található choroideából, ritkábban a corpus ciliáreből, vagy irisből, illetve a conjunctívából indul ki. Az esetek nagy részében látásromlás miatti, vagy rutin szemvizsgálat során derül ki, rosszabb prognózisúak, mint a cutan melanoma. Az elsőként kialakuló metasztázis leggyakrabban a heparban van.

A másik csoport a nyálkahártyai melanoma, amely az anális, vaginális nyálkahártyán, illetve a szájüreg-orrüreg, orrmelléküregek nyálkahártyáján fordulhat elő, ismert a leptomeningeális primer melanoma is. Diagnózisuk idején az esetek többségében már a kiterjedt tumor okozta tünetek miatt kerül felfedezésre.²²

3.4 A melanoma szövettani jellemzői, molekuláris háttere és a legfontosabb mutációk prognosztikai szerepe

A primer melanoma diagnózisának és prognosztikai tényezőinek megállapítása a szövettani vizsgálattal történik, amely során meghatározására kerül a szövettani típus mellett a Breslow szerinti tumorvastagság, mely a tumor milliméterben megadott legnagyobb vertikális vastagságát jelenti a stratum granulosumtól a tumor legmélyebb pontjáig, emellett az invázió, a tumor dermisbe hatolásának szintje (Clark-érték) és a főbb prognosztikai hisztológiai paraméterek: a tumor növekedési típusa (horizontális vagy vertikális), exulceráció megléte, vagy hiánya, mitózis index (az oszló alakok száma 1mm²-es területen), regresszió, szatelliták, nyirok-és vérinvázió jelenléte, perineurális terjedés, tumort infiltráló limfociták (TIL) a dermisben, nyirok-és vérinvázió jelenléte. Mindezek mellett leírásra kerül az eltávolítás laterális és mélységi ép szegélye is. A szövettani diagnózis kiegészítéseként szükség lehet immunhisztokémiai vizsgálatokra, amelyek esetén a melanoma asszociált antigének kerülnek meghatározásra, leggyakrabban az S-100, HMB-45 antitesttel kimutatható gp100 antigén.¹

A melanoma molekuláris patológiai hátterének megismerésével bebizonyosodott, hogy hasonlóképpen a melanoma tradicionális szövettani beosztásához, molekulárisan is különböző csoportok állíthatók fel; jelenleg BRAF, NRAS, NF1 (neurofibromin-1) és hármas vad típusú molekuláris kategóriák különböztethetők meg. (*Cancer Genom Atlas Network*) A terápiában legfontosabb szerepe a BRAF mutációnak van, valamelyest felhasználható az NRAS mutáció ismerete is, illetve másodvonalon szerepe lehet a c-KIT mutációnak is.

A daganatsejtek proliferációjában, az apoptózisra való rezisztencia kialakulásában a RAS-RAF mitogén aktivált proteinkináz (MAPK) intracelluláris jelátviteli kaszkád játszik kiemelt szerepet. A BRAF enzim egy szerin-treonin protein kináz, mely a 7q34-es kromoszómán kódolt és extracelluláris növekedési faktor által vezényelt MAP kináz/ERK szignáltranszdukciós kaszkád aktiválásában játszik szerepet. A receptorszintű aktiválás hatására a RAS GTP-áz enzim a GDP foszforilációját katalizálja, GTP-t eredményezve. Ezt követően a RAS aktiválja a RAF kinázt, mely a MEK-et aktiválja, ami az ERK kinázt, melynek transzkripciós, transzlációs folyamatokban van szerepe. Az ERK közvetve és közvetlenül is szabályozhatja a transzkripciós faktorokat. Onkogén BRAF esetén kontrollálatlan sejtosztódás alakul ki a sejtben, hiszen az apoptózisra, sejt differenciációra és sejtproliferációra való hatásuk megváltozik. A BRAF gén V600 szomatikus missense mutációja (90% V600E, 8% V600K) a RAS-RAF jelátviteli út

extracelluláris faktoroktól független konstitutív aktivációját idézi elő, mely nagymértékű sejtproliferációhoz, illetve az apoptózisra való rezisztenciához, HIF-1alpha, VEGF MEK-dependens aktivációján keresztül a tumor angiogenezisének aktiválásához, valamint a szöveti invázió fokozásához (migrációban szerepet játszó proteinek upregulációjával, IL-8, illetve intergrinek által) vezet. Az onkogén BRAF a betegek 40-60%-ban van jelen, leggyakrabban cutan melanomában, ritkábban, 15-20%-ban előfordulhat acrolentiginosus melanomában, illetve igen ritkán, 0-0,9%-ban nyálkahártya melanomában is. Uveális melanomában a BRAF mutáció nincs jelen. BRAF mutáció azonban egyéb tumorokban is megjelenhet, például papilláris pajzsmirigyrákokban 40%-ban, serosus ovarium tumorokban 30%-ban, colorectalis rákoknál 10%-ban, prosztatata tumoroknál 10%-ban, Hajas-sejtes leukémiában, valamint Langerhans sejtes hisztiocitózis esetén 40-70%-ban.²³⁻²⁶

Az NRAS mutáció a daganatok 15-20%-ában mutatható ki és a BRAF mutációhoz hasonlóan sokan a túlélés negatív prediktorának tartják. A BRAF és NRAS mutáció prognosztikai értékének megítélésében a szakirodalomban nincs egységes álláspont. Egyes tanulmányok jobb, míg mások rosszabb prognózisról számolnak be BRAF mutáció esetén,²⁷⁻²⁹ bár egy csaknem 10.000 beteget magában foglaló analízis szignifikánsan rosszabb túlélést mutatott BRAF pozitív betegeknél.³⁰ Az NRAS mutáns melanomákat általában agresszívabb biológiai viselkedésűnek tartják, mint a BRAF, illetve a kettős vad típust.³¹⁻³³

C-KIT mutáció nyálkahártyai melanoma esetén 20-39%-ban mutatható ki, krónikus UV irtalom esetén cutan melanomában 15-28%-ban jelentkezik.

Az uveális melanoma eddig ismert mutációi mintegy 80-90%-ban vannak jelen, ezek a GNAQ és a GNA11, a betegség kimenetelét befolyásoló prognosztikai értékük nem egyértelmű.

Ismert, hogy a krónikus UV-sugárzás következtében kialakult melanomák hordozzák a legnagyobb számú mutációs spektrumot, gyakran NF1, NRAS és BRAF V600K mutációkat, míg BRAF V600E mutációt igen ritkán detektálunk ezeknél a típusoknál.

Az intermittáló napfényirtalom következtében kialakult melanomák esetén a különböző mutációk spektruma szűkebb, BRAF V600E (50%), NRAS (15-20%). Mucosalis, acralis és uveális melanomákban szignifikánsabban alacsonyabb a mutációk számának divergenciája. A mutációk típusa az életkorral is korrelál, 40 év alatti életkorban kialakult melanomában gyakrabban találkozunk BRAF V600E mutációval.³⁴⁻³⁶ A driver mutációk

és az NF1 (15%) mutáció között átfedés lehetséges, az NF1 mutáció idősebb korban mutatható ki gyakrabban, és rosszabb prognózissal jár.

3.5 A melanoma immunológiai háttere

Az immunrendszer szerepe a daganatok kialakulásában valamint terjedésében ismert, a tumor ellenes immunválaszban elsődleges celluláris reakció központi sejtjei a T-sejtek. A T-sejtek közül a T_H (helper), a T_C (citotoxikus), valamint a T_{REG} (regulátor) sejteknek van kiemelkedő szerepük. Az immunrendszer alapvető fontosságú szerepet tölt be a daganatok elleni védekezésben, azonban a mechanizmus komplex. A daganatsejtek hatására az immunrendszer sejtjes elemei segíthetik az érújdonképződést, a daganatsejtek növekedését, differenciálódását, genomiakai instabilitását és a tumorsejteket körülvevő fibroblasztok és endothelsejtek funkcióját. A tumorsejtek gyulladáshoz vezető mediátorokon, a citokineken, matrix metalloproteinázokon keresztül elősegíthetik a daganat növekedését. Mindezek mellett a daganatok T-sejteket blokkoló transzmembrán proteinek is expresszálnak, ezek közül is napjainkban legfontosabb terápiás jelentősége a PD-L1 glikoproteinnek van, mely a T-sejten elhelyezkedő PD-1 receptorhoz kötődve fejt ki az immunrendszert gátló hatását, az IL-2 képződés T-sejt receptor (TCR) mediált aktivációját, és ezáltal a T-sejtek proliferációjának gátlását. Másik fontos terápiás jelentősége a citotoxikus T-limfocita asszociált antigén-4-nek (CTLA-4) van, aktiváció hatására jelenik meg a T limfocitákon és következményes T-sejt mediált immunválasz gátlással jár.³⁷⁻³⁹ A melanoma klinikai viselkedése, valamint a kutatások alapján is immunogén daganattípusok közé tartozik. Ezt a tény bizonyítja a primer tumor, valamint a metasztázisok regressziója, remissziója, a betegség melletti vitiligo gyakori megjelenése, valamint az is, hogy a primer daganatot övező limfocitás infiltráció a túlélés pozitív prediktora.³⁷ Fontos megemlíteni, hogy egyes klinikai kutatások alapján a célzott terápiák is rendelkeznek immunológiai hatással. Frederick és munkatársai igazolták mind kombinációs BRAF-MEK (dabrafenib+trametinib), mind célzott BRAF gátló monoterápia (vemurafenib) mellett, hogy melanoma antigén expresszió és ezáltal emelkedett számú CD8+ T-sejt infiltráció észlelhető BRAF pozitív betegeknél; valamint az immunszuppresszív interleukin 6 (IL6) és interleukin 8 (IL8) csökkenését, és a T-sejtés cytotoxikus válasz növekedését írták le.^{40,41}

3.6 A melanoma TNM stádiumbeosztása

A melanoma American Joint Committee on Cancer (AJCC) klasszifikációja alapján nagyszámú beteg adatainak elemzését követően pontosabb információt nyerhetünk a várható prognózisról, mely elengedhetetlen többek között a megfelelő terápia, betegellátás megválasztásához. A primer tumor szövettani elemzése mellett a pontos stádium meghatározásához az őrszem nyirokcsomó standardizált szövettani vizsgálata, a regionális nyirokcsomók státusza, valamint az egyéb távoli disszeminációk feltérképezése is szükséges, az LDH szint ismerete mellett. A melanoma pT klasszifikációja a primer tumor szövettani paraméterei, Breslow tumorvastagság alapján történik.

Az N klasszifikáció megállapításához a lokoregionális nyirokcsomók státusza, valamint szatelliták, in tranzit metasztázisok ismerete szükséges. Makro-mikro-szubmikro metasztázis kimutatása sentinel nyirokcsomó biopszia elvégzésével történik. A melanoma M klasszifikációja a daganat távoli metasztázisainak ismerete alapján kerül meghatározásra. A TNM stádiumbeosztás legújabb, 8. kiadása 2017-ben született meg. Primer melanoma esetén a pT1a stádiumot <0,8 mm-es tumorvastagság alatti, exulceráció nélküli melanoma jelenti; 0,8 mm alatti, de exulcerált, vagy 0,8 mm feletti, (vagy azzal azonos vastagságú) és 1 mm alatti, (vagy vele azonos Breslow tumorvastagság) exulcerációval, vagy anélkül T1b stádiumot jelent. IV-es stádium esetén külön meghatározásra került a központi idegrendszer érintettsége M1d jelöléssel, ezen belül is elkülönítünk M1d0 stádiumot, ha az LDH szint normál tartományban van, valamint M1d1 stádiumot emelkedett LDH-szint mellett.⁴²

3.7 A melanoma terápiája

Míg a melanomás betegek többsége korai stádiumban sebészi excízióval meggyógyítható, előrehaladottabb primer tumorok esetében a betegek egy jelentős hányadánál progresszió jelentkezik, és távoli metasztázisok alakulnak ki. 2011-et követően a melanoma immunológiai és molekuláris patológiai hátterének megismerésével megjelentek a túlélést meghosszabbító célzott- és immunterápiák, amelyek a melanoma sebészi kezelése és sugárterápiája mellett biztosítják a magas szintű, sikeres és komplex onkológiai ellátást.

3.7.1 A melanoma sebészi kezelése

A primer melanoma terápiájának elsődleges ellátása a sebészi excízió. Jelenleg a korábbi radikális sebészi megoldásokkal ellentétben a primer tumor eltávolításának biztonsági zónáját a Breslow tumorvastagság alapján határozzuk meg. Ennek háttérében az a felismerés áll, miszerint a maximális (5 cm-es) ép zónával történt radikalitás nem javította a túlélést. Jelenleg alkalmazott irányelveknek megfelelően in situ melanoma esetén 5-8 mm-es biztonsági zónát alkalmazunk, <1mm-es melanoma esetén 1 cm-es biztonsági szegélyt, 1-2 mm-es Breslow tumorvastagságnál 1 cm, illetve >2 mm feletti tumorvastagság esetén 2 cm-es biztonsági zóna javallt.⁴³ 1 mm feletti tumorvastagság esetén, illetve ennél vékonyabb tumoroknál is, ha a limfogén invázió lehetősége felmerül, a pontos stádium meghatározása és a nyirokrégió ellátása céljából sentinel nyirokcsomó vizsgálat elvégzése indokolt. A primer tumor excíziója két lépcsőben történik, klinikai gyanú esetén 5 mm-es biztonsági zónával excindáljuk a primer tumort, majd a szövettani lelet függvényében szükség esetén sentinel nyirokcsomó biopsziával együlésben végezzük el a reoperációt a tumorvastagságnak megfelelő biztonsági zónával.

Ha fizikális vizsgálattal, képalkotó diagnosztikával, valamint cytológiai mintavétel során igazolt kóros nyirokcsomó van jelen, regionális blokkdisszekció végzendő. A melanoma bármely szervbe képezhet áttétet, leggyakrabban a tüdő, máj, valamint az agyi áttét megjelenése jellemző. A melanoma távoli metasztázisainak sebészete ellentmondásos. Indikációja nincs pontosan meghatározva, általánosságban elmondható, hogy amennyiben egyszervi lokalizációjú metasztázis van jelen, illetve lassú a progresszió, stabil betegség áll fenn, a műtét mérlegelendő. Cerebrális, illetve vertebrális áttét esetén a metasztazektómia kiemelt jelentőségű. A szakirodalmi adatok szerint metasztazektómia során csak jól megválasztott betegpopuláció esetén várható a túlélés javulása, mivel soliter metasztázis megjelenését követően az adott szervben multiplex disszemináció kialakulása gyakori.

Újabban klinikai vizsgálatok születtek a célzott-, valamint immunterápiára jól reagáló betegek metasztazektómiáját követő túléléséről, melyek megfelelő indikáció esetén jobb túlélésről számolnak be, azonban további vizsgálatok szükségesek nagyobb betegszámmal.^{44,45}

3.7.1.1 *Sentinel nyirokcsomó biopszia*

A nyirokrégiók érintettsége esetén a melanomás betegeknél mintegy 65%-ban számíthatunk távoli áttét megjelenésére. A sentinel nyirokcsomó (SLN) biopszia elengedhetetlen a melanoma pontos stádiumának meghatározásához.

Szelektív blokkdisszekciónak vizsgálatok alapján a regionális metasztázismentes túlélésre intermedier tumorvastagságban bizonyított pozitív hatása van,⁴⁶ nem került azonban igazolásra, hogy meghosszabbítja a teljes túlélést.

Az őrszem nyirokcsomó azon nyirokcsomó, melyet a primer melanomából kiinduló nyirokerek először elérnek. Őrszem nyirokcsomó biopszia elvégzésével a korábban alkalmazott felesleges profilaktikus blokkdisszekció elkerülhető. Terápiás jelentősége a pontos stádium megállapításával elengedhetlené vált az adjuváns kezelések indikációjának meghatározásához.

A sentinel nyirokcsomó biopszia elvégzése limfoszcintigráfiával kezdődik, amikor intradermálisan a primer melanoma környező területére gamma-sugárzó izotóppal jelölt anyagot juttatnak, ennek áramlását gamma-kamerával detektálják. Limfoszcintigráfias képek alapján kerül leggyakrabban egy, azonban akár több nyirokcsomó megjelölésre. Ezt követően eltávolításra kerül a kijelölt sentinel nyirokcsomó, valamint a primer tumor reoperációja történik a meghatározott biztonsági zónával. Az AJCC ajánlása alapján Hematoxilin-eozin festéssel, vagy immunhisztokémiai vizsgálattal detektálható metasztázis esetén igazolt a nyirokcsomó pozitivitás. Megjegyzendő, hogy már egy kimutatott melanoma tumorsejt is micrometasztázisnak, N1a stádiumnak tekinthető.

Pozitív sentinel nyirokcsomó esetén korábban a regionális nyirokrégió blokkdisszekcióját végeztük, ennek jelentősége az utóbbi időben visszaszorult, tekintettel arra, hogy túlélést meghosszabbító hatása nem bizonyított.

A őrszem nyirokcsomó státusz a szakirodalmi adatok alapján, illetve a későbbiekben ismertetett tanulmányunkban is a melanoma egyik legfontosabb prognosztikai faktorának bizonyult.⁴⁷⁻⁴⁹

3.7.2 **A melanoma sugárterápiája**

A sugárérzékenysége jellemző, hogy a vesedaganathoz, valamint a glioblastomához hasonlatosan 2 Gy irradiációt követően nagy a túlélő sejtek száma (surviving fraction). Lokalizációtól függően egyedileg javasolt a frakció dózisének meghatározása, hiszen a

konvencionális frakcionálással a sejtek jó repair mechanizmusai miatt csupán egyszerre kevés daganatsejtet lehet károsítani.

Primer tumor sugárterápiája nagy kiterjedésű in situ daganat, főleg lentigo maligna esetén javasolható. Irreszekábilis primer tumor esetén, illetve, ha a primer tumor már metasztatizált, indikálható palliatív irradiáció. Ocularis melanománál a Ruténium applikátorral végzett sugárterápia 5 mm vastagság alatti daganatoknál javasolt a bulbus megtartása céljából.

Postoperatív irradiáció alkalmazható a primer tumor eltávolítását követően indikálható, és a nyirokrégió sebészeti ellátása után. A primer tumor eltávolítását követően, amennyiben a primer tumor reoperációja a lokalizációból adódóan nem kivitelezhető, elégtelen biztonsági zóna esetén; valamint mérlegelendő mikroszatellita, recidíva eltávolítás, nyálkahártya melanoma, illetve desmoplastikus melanoma eltávolítását követően. Regionalis nyirokcsomók disszekciója után, ha tokáttörés igazolódott a hisztológiai vizsgálat során, illetve a nyirokrégióban szövettanilag diagnosztizált nyirokcsomók számát és méretét figyelembe véve az aktuális NCCN guideline ajánlásai alapján.

Palliatív irradiáció a tumor méretének csökkentése, valamint a tumorterjedés lassítása, fájdalomcsillapítás céljából fontos terápiás modalitás. Cerebrális, vagy soliter metasztázis esetén alkalmazhatunk Cyber-knife, illetve stereotaxiás célzott sugárterápiát, ami a sebészi eltávolítással egyenértékű terápia. Fájdalomcsillapítás, valamint inoperábilis esetben, harántlaesio veszélyekor a gerinc területére a beteg állapotának függvényében alkalmazunk palliatív irradiációt. Multiplex agyi metasztázisok kialakulásakor teljes agyi besugárzás jó általános állapotú betegeknél szóba jön.^{43,50}

3.7.3 A melanoma gyógyszeres terápiája

A metasztatikus melanoma gyógyszeres kezelésében mérföldkő volt a melanoma molekuláris patológiai, valamint immunológiai hátterének felismerése, mely lehetővé tette a célzott és immunterápiás modalitások kifejlesztését, ezzel szignifikánsan hosszabb progressziómentes és teljes túlélést biztosítva a metasztatikus melanomában szenvedő betegek számára.

2011 előtt csupán citosztatikus kezelések álltak rendelkezésre, igen alacsony, mintegy 15%-os 2 éves túlélési rátát adva a betegeknél. A metasztatikus betegség prognózisa igen

rossz volt, a medián túlélés csupán 6-10 hónapra volt tehető, míg az 5 éves túlélés 5% volt.⁵¹

2011-ben a vemurafenib BRAF gátló monoterápiát és az anti-CTLA4 ipilimumab immunterápiát az amerikai Élelmiszer és Gyógyszerfelügyeleti Hivatala (FDA), majd az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) törzskönyvezte metasztatikus melanoma kezelésében.^{52,53} Ezt követték újabb terápiás modalitások mind az immunterápia, mind a célzott terápia terén.

3.7.3.1 Kemoterápia

A kemoterápiás lehetőségeket a metasztatikus melanoma terápiájában napjainkban csak palliatív indikációban, az esetek többségében többedvonalban alkalmazzuk. Monoterápiában az 1975-ben, az FDA által törzskönyvezett dakarbazin (DTIC, imidazol-carboxamid) a befogadott citosztatikum, mellyel mintegy 10-15%-os terápiás választ érhetünk el. Túlélést meghosszabító hatása klinikai vizsgálatok alapján nem bizonyított. Cerebrális metasztázis esetén, valamint többedvonalbeli kezelésként temozolomid (3,4 dihidro-3-metil-4-oxoimidazo-1,2,3,5 tetrazin-8-karboxamid) az agyállományba való 33%-os penetrációjára való tekintettel, bizonyos indikációkban platinaszármazékok (carboplatin, cisplatin), nitrozoureák (fotemosztin, BiCNU), a taxán származék paclitaxel adhatók. Polikemoterápiában is alkalmazhatjuk a citosztatikumokat többedvonalban, leggyakrabban BOLD séma (bleomycin, Carmustine, Dakarbazin, vinkrisztin), DTIC-cisplatin, PBD séma (Platidiam, BiCNU, Dakarbazin). Mind mono-, mind polikemoterápia esetén csupán kevesebb, mint 15%-os válaszadási arányt érhetünk el, tehát a remissziós ráta kombinációk esetén sem javul, csupán a toxicitás növekedhet.⁵⁴

Szelektív kemoterápia, intraarteriális kemoperfúzió is alkalmazható egyes esetekben, legfőképp vétagi lokalizációban, in tranzit metasztázisok esetén, vagy izolált májmetasztázisoknál oculáris melanomában.^{55,56}

Az elektrokemoterápia újabban alkalmazott, hatékony eljárás nemcsak melanomában, de egyéb tumoroknál is, leggyakrabban bőrre lokalizált manifesztumok esetén. Cutan/subcutan, in tranzit metasztázis esetén bólusban intravénásan adott bleomycinnel, vagy cisplatinnal alkalmazható módszer, mely során a tumorba helyezett elektródákon leadott elektromos impulzus hatására a tumorsejtek permeabilitását növelve a (bleomycin esetén 8000-szeresére, cisplatin esetén 80-szorosára) citosztatikum daganatsejtbe való

penetrációja és ezáltal a citotoxicitása fokozható, mintegy 80%-os remissziós ráta érhető el.^{57,58}

3.7.3.2 Célzott terápia

2011-ben a BRAF gén V600 szomatikus missense mutációjának megismerésével (90% V600E, 8% V600K) az FDA, majd 2012-ben az EMA által törzskönyvezésre került az első BRAF kináz inhibitor, a vemurafenib, BRAF V600 mutációt hordozó, metasztatikus melanoma kezelésében. A BRAF gén mutációja a mitogén aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli út extracelluláris növekedési faktoroktól független konstitutív aktivációját idézi elő, mely nagymértékű sejtproliferációhoz, illetve az apoptózisra való rezisztenciához vezet. Az onkogén BRAF a betegek 40-60%-ban van jelen, leggyakrabban intermittáló UV expozíció következtében kialakuló cutan melanomában. A BRIM-3, törzskönyvezési III-as fázisú, 2 karú klinikai vizsgálatban Chapman és munkatársai dakarbazinnal hasonlították össze a vemurafenib hatékonyságát 675 terápia naiv, metasztatikus melanomában szenvedő betegnél. A progressziómentes túlélés (PFS) 5,3 hónapnak bizonyult a kemoterápiás kar 1,6 hónapjához képest, a medián teljes túlélés (mOS) pedig 13,2 hónapnak a 9,7 hónappal szemben. Az objektív tumorválasz célzott vemurafenib terápia mellett 48%, dakarbazinnal 5,5%-nak bizonyult. Összességében dakarbazinnal összehasonlítva a halálozás rizikójának 60%-os, a progresszió, vagy halál bekövetkeztének 74%-os csökkenését eredményezte ($p < 0,0001$).⁵³

2013-ban a BREAK-2, illetve BREAK-3 klinikai vizsgálatok eredményei alapján újabb BRAF kináz inhibitor, a dabrafenib került az FDA, majd az EMA által befogadásra, mely mind BRAF V600E, mind V600K mutációban hatékonynak bizonyult. Az objektív válaszadási arány a törzskönyvezési vizsgálatok alapján 7-ről 50%-ra nőtt dabrafenib terápiaiban részesült betegeknél, dakarbazinhoz képest. A medián PFS 5,1 hónapnak bizonyult.⁵⁷

Bár a BRAF inhibitor monoterápiák mintegy kilencszeresére növelték az objektív választ a kemoterápiához képest, a terápia hatékonyságának időtartama 6 hónap volt. A daganatsejtekben bypass jelátviteli utak aktiválódásával és a túlélési mechanizmusaik indukálásával, medián 6 hónap BRAF gátló monoterápiát követően rezisztencia és tumor progresszió következik be. A mechanizmus hátterében elsősorban a MAPK útvonal reaktivációja áll, így a daganatsejtben szerzett rezisztenciája alakul ki⁵⁸, de egyéb jelátviteli utak aktivációja is szerepet játszhat.

A rezisztencia késleltetése céljából a BRAF és MEK inhibitor terápia bizonyult hatékonynak, ami 2015-ben törzskönyvezésre került. 2 kombináció, a vemurafenib+cobimetinib és a dabrafenib+trametinib vált elérhetővé a BRAF pozitív metasztatikus melanomában szenvedő betegek részére, eredményes klinikai vizsgálatokat követően. A coBRIM 3-as fázisú klinikai vizsgálat célja a célzott kombinációs terápia hosszabb túlélésének igazolása volt vemurafenib monoterápiához képest. 495 beteg került a 2 karú vizsgálatban randomizálásra, az egyik vizsgálati karon vemurafenib+cobimetinib, a másik karon vemurafenib monoterápiában részesültek. A progressziómentes túlélés a kombinációs karon 9,9 hónap, míg a vemurafenib monoterápiás csoportban 6,2 hónap volt, a medián OS-t nem érték el a kombinációs karon a 2014-ben közölt adatok alapján.

Kombinációval 70%-os objektív tumorválaszt értek el a vizsgálatban, míg vemurafenib monoterápiával csak 50%-os válaszarányt. A coBRIM vizsgálat hosszabb követése során 22,3 hónapos medián teljes túlélést értek el, illetve 12,3 hónapos medián progressziómentes túlélést, a betegek 30,8%-a volt életben 5 év elteltével és 14%-ban nem történt ez idő alatt progresszió.^{59,60} A COMBI-d 3-as fázisú klinikai vizsgálatban a dabrafenib+trametinib kombinációval 9,3 hónapos medián progressziómentes túlélést értek el, míg hosszabb követési idővel 11 hónapot, a 8,8 hónapos dabrafenib monoterápiával elért medián progressziómentes túléléssel szemben. A medián teljes túlélés a hosszabb követési idővel 26,7 hónapnak bizonyult a kombinációban részesült betegeknél. Az 5 éves teljes túlélési adatok is elérhetővé váltak 2019-ben, mely szerint a teljes túlélés 34%, az 5 éves progressziómentes túlélés 19%.^{61,62}

A harmadik BRAF-MEK kombinációs terápia, az encorafenib+binimetinib a COLUMBUS vizsgálatban bizonyította hatékonyságát a leghosszabb, 14,9 hónapos progressziómentes túlélést elérve a kombinációs kezelésekben, kedvező mellékhatásprofilal. Magyarországon ez a kombináció jelenleg nem elérhető, klinikai vizsgálatokban azonban részesülhettek betegeink a terápiában.⁶³

A célzott terápia mellékhatás spektruma eltér az egyéb korábban ismert metasztatikus melanomában alkalmazott kezelésektől; időben való felismerésük esetén jól kezelhetőek, terápia felfüggesztéssel, vagy dózismodifikációval reverzibilisek. Monoterápiával leggyakrabban bőrkürités, follicularis hyperkeratosis, fényérzékenység, arthralgia, diarrhoea, láz, QT szakasz megnyúlása, ritkán másodlagos precarcinosisok, vagy bőrtumorok (keratosisok, verruca vulgaris, keratoacanthoma, laphámrák, melanoma) képezik a leglényegesebb mellékhatásokat. Megemlítendő, hogy nagyon

ritkán szekunder belszervi karcinómák is kialakulhatnak. Dabrafenib mellett a láz gyakori előfordulása, míg vemurafenib mellett a gyakrabban megjelenő fotoszenzitivitás a jellemző mellékhatás.

Lényeges kiemelni, hogy a BRAF gátló terápiák mellett a kóros sugárreakció fokozódhat, emiatt parallel alkalmazott sugárterápia esetén a célzott terápia felfüggesztése javasolt. Célzott kombinációs terápiák mellett az említett mellékhatásokon kívül előfordulhat serosus retinopathia, valamint az ejectiós frakció csökkenése, egyéb laboratóriumi eltérések is. A kombinációs terápia mellett viszont csökken a másodlagos tumorok (laphámcarcinoma, keratoacanthoma) megjelenési gyakorisága a monoterápiához képest.⁶⁴

3.7.3.3 Immunterápia

Az első úgynevezett immunellenőrzőpont-gátló (checkpoint-inhibitor) terápia metasztatikus melanoma kezelésében 2011-ben került befogadásra, mely a CTLA4 receptorra ható monoklonális antitest, az ipilimumab volt. Így BRAF negatív betegek számára is elérhetővé vált a citosztatikum helyett új terápiás modalitás. Ipilimumab hatására a gátolt T-sejtek aktivációjának feloldásával, a negatív hatás megszüntetésével a melanoma specifikus cytotoxikus T-sejtek száma és aktivitása fokozódik. A törzskönyvezési III-as fázisú, 3 karú vizsgálatban az ipilimumab monoterápiát (3 hetente 4 alkalommal 3 mg/ttkg), illetve gp100 vakcinával kombinálva a második karon, a harmadik vizsgálati karon pedig a gp100 vakcinát monoterápiában alkalmazták. Az ipilimumab terápiás csoportokban mintegy 10 hónapos medián túlélést értek el, a gp100 csoport 6,4 hónapos túléléséhez képest ($p=0,003$). A hosszútávú követési adatok alapján 3 évnél plató jelentkezik a túlélési görbén, ezek a betegek pedig, mintegy 20%-ban hosszú túlélők. Mellékhatás szempontjából autoimmun mellékhatások kialakulása gyakori, a két ipilimumab karon 10-15%-ban jelentkeztek Grade 3-4 fokú mellékhatások, leggyakrabban colitis, a bőr maculo-papulosus kiütései, hypophysitis, thyreoditis.⁶⁵

2015-ben a szintén checkpoint-gátló nivolumab és pembrolizumab is törzskönyvezésre került az FDA, majd az EMA által metasztatikus melanoma kezelésében. A programozott sejthalál gátló receptor (PD-1) és annak ligandjával való kapcsolódás felszabadítása révén (PD-L1, PD-L2) a T-sejtek funkciója helyreáll, terápiás hatékonyságukat számos klinikai vizsgálat igazolta metasztatikus melanoma kezelésében.

A nivolumab teljesen humán monoklonális PD-1-gátló antitest, ami hatékonynak bizonyult metasztatikus melanomában. A CheckMate-066 vizsgálatban dakarbazinnal összehasonlítva szignifikáns terápiás hatékonyságot, 1 évnél mintegy 75%-os túlélést értek el a 42%-os dakarbazin karhoz képest. A terápiás válasz 40%, illetve 14% volt.⁶⁶

A másik metasztatikus melanomában hatékony PD-1 gátló antitest a pembrolizumab. A KEYNOTE-006 III-as fázisú tanulmányban a pembrolizumab és az ipilimumab került összehasonlításra terápiás hatékonyság szempontjából. A betegek 66%-a első vonalban kapta a kezelést. A pembrolizumab karon az 1 éves túlélés elérte a 68-74%-ot, mely szignifikánsan többnek bizonyult az ipilimumab terápiával elért 55%-hoz képest. Az 5,5 hónapos medián progressziómentes túlélést szignifikánsan hosszabbnak találták az ipilimumab 2,8 hónapjához képest. Mellékhatásprofil szempontjából megállapították, hogy Grade 3-5 fokozatú autoimmun mellékhatás mintegy 10-13%-ban volt pembrolizumabnál jelen, míg 20%-ban ipilimumab mellett. A mellékhatásként jelentkezett autoimmun gyulladások enyhébbek anti-PD-1 terápia esetén, mint a CTLA-4 gátló terápia mellett.^{67,68} A KEYNOTE-001-es vizsgálatban a 3 hetente alkalmazott 2 mm/ttkg dózist hasonlították össze 10mg/ttkg mennyiséggel, előzetesen kezelt vagy terápia naiv betegeknél. A medián OS 23,8 hónap, illetve 38,6 hónap volt, a becsült 5 éves PFS 21%, ill. 29%-nak bizonyult. A pembrolizumab leggyakoribb autoimmun mellékhatásának a hypo-hyperthyreosis és a colitis volt.⁶⁹

Mivel a CTLA-4 inhibitor és a PD-1 gátló terápia a daganat ellenes immunválasz más stádiumában fejti ki hatékonyságát, így egymás hatását felerősíthetik. Ezt bizonyította a CheckMate-067 klinikai vizsgálat, ennek eredményei alapján a nivolumab-ipilimumab kombinált immunterápia is törzskönyvezésre került 2016-ban. A vizsgálatban 3 csoportba randomizálták a betegeket: az egyik karon ipilimumab 3 mg/ttkg+nivolumab 1 mg/ttkg három hetente 4 dózisban, majd a betegek 3 mg/ttkg nivolumabot kaptak kéthetente; a második karon nivolumabot 3 mg/ttkg kéthetente, a harmadik karon ipilimumabot 3 mg/ttkg négy dózisban három hetente. 36 hónapos követési idővel megállapított adatai szerint kombináció mellett a betegek 58%-a volt életben 3 év elteltével, míg nivolumab terápiával 52%, ipilimumab terápiával 34%. A 2021-es ASCO-n közölt 6,5 év utánkövetés eredménye 72 hónapos medián OS értéket mutatott ipilimumab+nivolumab kombinációban. Mellékhatásprofil szempontjából kombináció esetén 59%-ban fordult elő Grade 3-4 erősségű mellékhatás a monoterápiák 28, ill. 21%-ához képest.⁷⁰

A 2 éves túlélés mind a BRAF-MEK gátló, mind a PD-1/PD-L1 gátló terápiákkal metasztatikus melanoma kezelésében körülbelül 60%-ra tehető, mely nagyfokú túlélési előny a korábban elérhető kemoterápiák 15%-os 2 éves túlélési adataihoz képest.

III-as fázisú klinikai vizsgálatok jelenleg is zajlanak BRAF pozitív betegeknél alkalmazott hármas kombinációs terápiákkal, ahol BRAF-MEK gátlókat kombinálnak PD-1/PD-L1 inhibítorokkal. Az IMspire150 (Trilogy) vizsgálatban BRAF-MEK gátló célzott terápiát adtak az egyik vizsgálati karon atezolizumab, PD-L1 gátló immunterápiával, a másik csoportban pedig immunterápia nélkül. Az első eredményeket 2020-ban publikálták, szignifikáns 15 hónapos progressziómentes túlélést értek el a korai elemzések szerint a 3-as kombinációs karon, a vemurafenib+cobimetinib kezelésben részesülő csoport 10,6 hónapos PFS értékéhez képest. A hármas kombináció tolerálható és biztonságos volt a mellékhatások elemzése alapján.⁷¹ A vemurafenib+cobimetinib+atezolizumab kombináció 2020-ban FDA befogadást nyert.

4 Célkitűzések

Multicentrikus klinikai vizsgálatokat követően, amelyekben az Országos Onkológiai Intézet Dermatoonkológiai Osztálya nagy betegszámmal részt vehetett FDA és EMA befogadás után Magyarországon is elérhetővé váltak az innovatív terápiák. Target kezelésként elsőként BRAF inhibitor monoterápia, majd 2015-től BRAF-MEK inhibitor kombinációs terápia jelent meg a klinikai gyakorlatban.

Célkitűzésünk a „real-life” adatok elemzése célzott terápiában részesült betegeinknél, összehasonlításban a klinikai vizsgálatokkal. A molekuláris patológiai háttér feltérképezése nem csak a terápia megválasztásában, hanem a melanoma prognóziásának pontosabb meghatározásában is segítséget nyújthat a sentinel nyirokcsomó státusz és egyéb prognosztikai paraméterek mellett.

Célkitűzéseink a következők:

1. A BRAF gátló vemurafenib monoterápia 43 betegnél került alkalmazásra; ennek hatékonyságát és biztonságosságát kívánjuk vizsgálni klinikai gyakorlatunkban.
2. BRAF-MEK gátló kombinációs kezeléseinket (38 betegnél vemurafenib+cobimetinib, 80 betegnél dabrafenib+trametinib), a terápiával elért eredményeket, a hatékonyságot és biztonságosságot vizsgáltuk.
3. 159 primer tumor BRAF és NRAS mutációjának prediktív és prognosztikai értékét elemeztük a sentinel nyirokcsomó státusszal és a betegség kimenetelével összefüggésben.

5 Anyag és Módszer

5.1 A BRAF gátló vemurafenib monoterápia klinikai hatékonyságának és biztonságosságának vizsgálata

5.1.1 A betegbevonás kritériumai, a vizsgálat kivitelezése, értékelése

A vemurafenib monoterápia 2012-től egyedi méltányossági kérelem keretein belül OEP-finanszírozással is elérhetővé vált Magyarországon. Retrospektív vizsgálatunkban 43 disszemínált melanomában szenvedő, BRAF mutációt hordozó betegnél alkalmazott onkogén BRAF kináz-gátló, vemurafenib (Zelboraf) terápiával szerzett klinikai tapasztalatainkat összegeztük. 2012 novembere és 2015 októbere között az Országos Onkológiai Intézet Onkodermatológiai Osztályán célzott monoterápiában részesült betegeink adatait vizsgáltuk. A 18 év feletti betegek tumoros stádiuma TNM klasszifikáció alapján, az American Joint Committee on Cancer (AJCC) 7. verziója alapján került meghatározásra, betegpopulációnkban IIIc vagy IV-es stádiumban lévő (M1a, M1b vagy M1c) betegek voltak.⁷² A betegpopulációs adatban meghatározásra került: életkor, nem, ECOG performance státusz (Eastern Cooperative Oncology Group), Breslow tumorvastagság, a betegség stádiuma, a szérum laktát dehidrogenáz szintje (LDH) a terápia kezdetekor, hányadvonalban alkalmaztuk a terápiát, valamint a BRAF mutáció genotípusa (BRAF V600E, V600K, egyéb). Cerebrális metasztázis esetén a betegek onkoteam döntés alapján beválasztásra kerülhettek. A betegek vemurafenib terápiában az alkalmazási előírat alapján részesültek napi 2-szer 960 mg dózisban (2x4 tabletta), tolerálhatatlan toxicitásig, vagy a betegség progressziójáig. Betegeinket 4 hetente kontrolláltuk Osztályunkon, az ambuláns vizit alkalmával minden alkalommal fizikális vizsgálatot, bőrgyógyászati vizsgálatot, elektrokardiográfiát, laborvizsgálatot (vérkép, nagyrutin, máj, vesefunkció, ionok, LDH, vizeletvizsgálat) végeztünk. A mellékhatásokat minden vizit alkalmával monitorizáltuk, fennállás esetén rögzítettük a Nacional Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) 4.03 verziója alapján.⁷³ Képalkotó vizsgálatok, koponya-nyak-mellkas-has-kismedence CT, illetve cerebrális metasztázis esetén koponya MR a terápia megkezdését követő 9 hét múlva, majd 12 hetente készültek. Tumorkontroll, terápiás válasz értékelése a RECIST 1.1 verzióknak megfelelően történt, komplett (CR), parciális regresszióként (PR), stabil (SD), vagy progresszív betegségként (PD) értékeltük. Terápia megszakítást, illetve dózis modifikációt a vemurafenib alkalmazási előírata alapján, tolerálhatatlan Grade 2 vagy

magasabb fokozatú, a gyógyszerrel összefüggő mellékhatásnál végeztünk. Amennyiben mellékhatás jelentkezett, felfüggesztettük a kezelést, míg a mellékhatás Grade 1, vagy 0 fokozatra nem csökkent. Ezt követően a terápiát 1-es szintű dóziscsökkentéssel (2x720 mg) kapta vissza a beteg, a mellékhatás újbóli jelentkezése esetén 2-es szintű dózismodifikáció (2x480 mg) történt. Szekunder bőrdaganat megjelenése esetén dózismódosítást nem végeztünk, a bőrdaganat sebészetünkön eltávolításra került. Vizsgálatunk célja a terápiás válasz, a progressziómentes, a teljes túlélés megállapítása, illetve a mellékhatások felmérése volt.

A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozat irányelveinek megfelelően, a Tudományos és Kutatásetikai bizottság engedélyének birtokában (engedélyszám: 15140-/2017/EKU) végeztük.

5.1.2 Molekuláris patológiai vizsgálat

A mutáció analízist cobas® BRAF V600 teszttel végeztük az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Patológiai Osztályán, primer tumorból vagy metasztázisból. A mintákat a cobas® DNS minta előkészítő készletével dolgoztuk fel, majd izoláltuk a DNS-t formalinba fixált, paraffinba ágyazott szövettani mintákból. A vizsgált DNS, valamint a mutáció detektálása a cobas z 480 Analyzer PCR analízisével történt, a BRAF-NRAS Mutation Test (LSR) kit által biztosított reagens használatával.^{74,75}

A polimeráz láncreakció (PCR: polymerase chain reaction) segítségével a BRAF, NRAS géneknek megfelelő szakaszok amplifikálódnak az enzimatis reakció révén. A reakció során amplifikált DNS-szakasz mérete jellemzően a 100 bázispár és 10 kilobázispár közötti tartományba esik. A BRAF szekvenciák 101 és 120 bázispár között mozognak. Az NRAS szekvenciák 94 és 121 bázispár között mozognak. A vizsgálat célja a következő mutációk (n = 36) kimutatása százalékos mutációval 5% vagy több:

- V600E, V600E2, V600D, V600K, V600R, és K601E a BRAF exon 15-ben
- G466A, G466V, G469A, G469R, és G469V a BRAF exon 11-ben

5.1.3 Statisztikai elemzés

A betegpopulációs jellemzők, valamint a terápiás válasz értékeit leíró statisztikával (százalék, medián, terjedelem) határoztuk meg. A túlélési vizsgálatokban a progressziómentes túlélést (PFS) a terápia kezdete és az első detektált progresszió ideje vagy bármely okból bekövetkezett halál közötti időtartam meghatározásával. A teljes

túlélés (OS) a terápia kezdetétől a bármely okból bekövetkező elhalálozás időpontjáig került meghatározásra. Azokban az esetekben, ahol a betegkövetésünk során a vizsgált beteg az analízisből különböző okokból elmaradt, az utolsó vizit időpontjával számoltunk. A progressziómentes túlélés és teljes túlélés statisztikai elemzéséhez Kaplan-Meier analízist használtunk szignifikanciáját log-rank teszttel állapítottuk meg. A betegpopulációs paraméterek (nem, életkor, Breslow tumorvastagság, Clark inváziós szint, exulceráció, LDH szint a terápia kezdetekor, ECOG státusz, stádium, BRAF mutáció típusa, terápia naív vagy nem) és a túlélés közötti összefüggést Cox regressziós egyváltozós és többváltozós analízissel elemeztük. A p érték <0,05 határ alatt jelzett szignifikanciát. Elemzéseinket R statisztikai szoftverrel végeztük (R Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria; version 3.0.3).

5.2 A BRAF-MEK gátló kombinációs célzott terápia klinikai hatékonyságának és biztonságosságának vizsgálata

5.2.1 A betegbevonás kritériumai, vizsgálat kivitelezése, értékelése

2015-től OEP/NEAK finanszírozással elérhetővé vált Magyarországon kétfajta kombinációs terápia, a vemurafenib+cobimetinib és a dabrafenib+trametinib. Retrospektív vizsgálatunkban 118, BRAF mutációt hordozó, disszeminált melanómában szenvedő betegnél alkalmazott onkogén BRAF kináz-gátló, vemurafenib (Zelboraf), dabrafenib (Tafinlar), valamint MEK-gátló cobimetinib (Cotellic), trametinib (Mekinist) terápiával szerzett klinikai tapasztalatainkat összegeztük. 2015 novembere és 2018 decembere között az Országos Onkológiai Intézet Onkodermatológiai Osztályán 118 célzott BRAF-MEK gátló kombinációs terápiában részesült betegek adatait vizsgáltuk retrospektív elemzésben.

38 betegünk vemurafenib+cobimetinib, 80 betegünk dabrafenib+trametinib kombinációs célzott terápiában részesült.

39 betegnél a terápia kezdetekor jelen volt cerebrális metasztázis (33%), a disszemináció részeként, ezen esetben a klinikai vizsgálatok eredményeinek megfelelően Tafinlar-Mekinist terápiát választottuk.

A 18 év feletti betegek stádium beosztása a TNM klasszifikáció alapján, az American Joint Committee on Cancer (AJCC) alapján kerültek meghatározásra; a vizsgált betegpopulációunkban IIIc vagy IV-es stádiumú (M1a, M1b vagy M1c) betegeknek adtunk kezelést.⁷² A betegpopulációs adatokban értékelésre került: életkor, nem, ECOG

performance státusz, Breslow tumorvastagság, a primer tumor exulcerációja, a stádium, az LDH szint a terápia kezdetekor, hányadvonalban alkalmaztuk a terápiát (első-, vagy többedvonal). A betegek folyamatosan részesültek BRAF-MEK gátló kezelésben, 38 betegünk (32%) vemurafenib+cobimetinib terápiában az alkalmazási előírat alapján, napi 2-szer 960 mg dózisban vemurafenib (2x4 tabletta) mellé 21 napig 1-szer 3 tabletta, napi 60 mg dózisban cobimetinib terápiát kapott, majd 7 nap szünetet tartottak a cobimetinib szedésében. A terápiát tolerálhatatlan toxicitásig, vagy a betegség progressziójáig kapták. 80 betegünk (68%) dabrafenib+trametinib terápiában részesült az alkalmazási előírat alapján, napi 2-szer 150 mg dózisban dabrafenib (2x2 tabletta) mellé folyamatosan napi 1x2 mg trametinib terápiát kaptak, tolerálhatatlan toxicitásig, vagy a betegség progressziójáig.

A dabrafenib+trametinib csoportban 39 betegnél cerebrális metasztázis volt jelen (48%) a terápia kezdetekor. Betegeinket 4 hetente kontrolláltuk osztályunkon, az ambuláns vizit alkalmával minden alkalommal fizikális, bőrgyógyászati és laborvizsgálatot (vérkép, nagyrutin, máj, vesefunkció, ionok, LDH, vizeletvizsgálat) végeztünk. A terápia megkezdése előtt, valamint 3 havonta kardiológiai és szemészeti vizsgálat történt, csökkent ejekciós frakció és QTc megnyúlás, illetve szemészeti vizsgálat a serous rethinopathia, vagy retina véna okklúzió, illetve egyéb szemészeti mellékhatás kizárása céljából. A mellékhatásokat minden vizit alkalmával monitorizáltuk, fennállás esetén rögzítettük, a CTCAE 4.03 verziója alapján történt az erősségi fokozat meghatározása (Grade)⁷³. Képkötő vizsgálatok, koponya-nyak-mellkas-has-kismedence CT, illetve cerebrális metasztázis esetén koponya MR a terápia megkezdésekor, valamint azt követően 12 hetente készültek. A tumorkontroll értékelése a RECIST 1.1 verziónak megfelelően történt.⁷² Terápia megszakítást, illetve dózismodifikációt az alkalmazási előírat alapján, tolerálhatatlan Grade 2, Grade 3 vagy magasabb fokozatú, a gyógyszerrel összefüggő toxikus mellékhatásnál végeztünk; felfüggesztettük a kezelést, míg a mellékhatás Grade 1, vagy 0 fokozatra nem csökkent. Ezt követően a terápiát 1-es szintű dóziscsökkentéssel vemurafenib esetén (2x720 mg) kapta vissza a beteg, dabrafenib esetén (2x100 mg), cobimetinibnél 1x40mg, trametinibnél 1,5 mg. A mellékhatás ismételt jelentkezésekor 2-es szintű dózismodifikáció történt.

Vizsgálatunk célja a progressziómentes (PFS), teljes túlélés (OS), objektív tumorválasz (ORR) megállapítása, illetve a mellékhatások felmérése volt. Tumorkontroll, terápiás válasz értékelése a RECIST 1.1 verziónak megfelelően történt, komplett (CR), parciális regresszióként (PR), stabil (SD), vagy progresszív betegségként (PD) értékeltük a terápiás

választ. Az objektív válaszarányt (ORR) a parcialis, és komplett remissziót elért betegek százalékos arányának összegzésével kaptuk, a betegség kontroll rátát (DCR), pedig a stabil betegséget elérő, a parcialis, valamint komplett remisszióba kerülő betegek százalékos értékének összegzéséből kaptuk.⁷⁶

A retrospektív vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozat irányelveinek megfelelően, a Tudományos és Kutatásetikai bizottság engedélyének birtokában (engedélyszám: IV/1838-1/2021/EKU) végeztük.

5.2.2 Molekuláris patológiai vizsgálat

Lásd: 5.1.2 fejezet

5.2.3 Statisztikai elemzés

Lásd: 5.1.3. fejezet

5.3 A BRAF és NRAS mutáció prognosztikai és prediktív értékének megállapítása

5.3.1 A betegbevonás kritériumai és a vizsgálatok kivitelezése, értékelése

A harmadik tanulmányunkban a primer tumor BRAF és NRAS mutációjának értékét elemezzük az ismert prognosztikai tényezők mellett a sentinel nyirokcsomó státusszal, valamint a túléléssel összefüggésben az Országos Onkológiai Intézet Dermatoonkológiai Osztályán kezelt betegeknél. Retrospektív vizsgálatunkban 2011 októbere és 2015 júliusa közt 159, sentinel nyirokcsomó biopszián átesett betegünk életkorát, nemét, primer tumor lokalizációját, Breslow-értékét, exulcerációját, szövettani típusát, a tumorban észlelt mitózisszámot, limfovaszkuláris és perineurális inváziót, a tumort infiltráló limfocitát jelenlétét, regressziós jeleket, valamint a primer tumor BRAF és NRAS mutációját vetettük össze a sentinel nyirokcsomó státusszal, valamint a különböző túlélési paraméterekkel. A SLN biopsziára intermedier, Breslow 1-4 mm-es tumorvastagságú primer melanomák esetén került sor, illetve <1 mm alatti tumorvastagságnál, ha a daganat exulcerált volt, illetve Clark >IV inváziós szint esetén, valamint limfovaszkuláris invázió, vagy magas mitótikus index mellett. 4 mm feletti Breslow tumorvastagságnál, ha a daganat nem volt exulcerált. A sentinel nyirokcsomó biopszia kettős jelöléses módszerrel történt a primer tumor eltávolítását követő 4-8 hétben. Pozitív nyirokcsomó esetén komplettáló regionális blokkdisszekcióra került sor. Szövettani vizsgálat során hematoxilin-eozin festéssel, illetve HMB45, S100, Melan-A immunhisztokémiai vizsgálattal kerültek a tumorsejtek kimutatásra.⁷⁷

Amennyiben a SLN-ban nem igazolódott metasztázis, a betegek alacsony dózisú Interferon-alpha immunterápiában részesültek 18 hónapig. Pozitív nyirokcsomó metasztázis esetén regionális blokkdiszekció történt, ezt követően a betegek közepes vagy magas dózisú interferon terápiát kaptak. Onkoteam döntésének megfelelően amennyiben távoli metasztázis is igazolódott, a betegek célzott-, immun-, vagy kemoterápiát kaptak.

A primer tumor regressziós jellemzője a nemzetközi ajánlásnak megfelelően 75% alatt, illetve 75% feletti, korai, vagy késői stádiumként került meghatározásra.⁷⁸

A túlélési adatokat a Nemzeti Rákregiszter adatait is felhasználva összegeztük. 2019 októberéig követtük betegeinket.

A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozat irányelvei szerint, a Tudományos és Kutatásetikai bizottság engedélyének birtokában (engedélyszám: 15140/2017) végeztük.

5.3.2 Molekuláris patológiai vizsgálat

A mutáció analízist cobas® BRAF V600 teszttel végeztük az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Patológiai Osztályán, primer tumorból vagy metasztázisból. A mintákat a cobas® DNS minta előkészítő készletével dolgoztuk fel, majd izoláltuk a DNS-t formalinba fixált, paraffinba ágyazott szövettani mintákból. A vizsgált DNS, valamint a mutáció detektálása a cobas z 480 Analyzer PCR analízisével történt, a BRAF-NRAS Mutation Test (LSR) kit által biztosított reagens használatával.^{74,75}

A polimeráz láncreakció (PCR: polymerase chain reaction) segítségével a BRAF, NRAS géneknek megfelelő szakaszok amplifikálódnak az enzimatis reakció révén. A reakció során amplifikált DNS-szakasz mérete jellemzően a 100 bázispár és 10 kilobázispár közötti tartományba esik. A BRAF szekvenciák 101 és 120 bázispár között mozognak. Az NRAS szekvenciák 94 és 121 bázispár között mozognak. A vizsgálat célja a következő mutációk (n = 36) kimutatása százalékos mutációval 5% vagy több:

- V600E, V600E2, V600D, V600K, V600R, és K601E a BRAF exon 15-ben
- G466A, G466V, G469A, G469R, és G469V a BRAF exon 11-ben
- G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V, és A18T az NRAS exon 2-ben
- A59D, A59T, Q61Ht, Q61Hc, Q61K, Q61L, Q61P, és Q61R az NRAS exon 3-ban
- K117Nc, K117Nt, A146T, és A146V az NRAS exon 4-ben

5.3.3 Statisztikai elemzés

Statisztikai elemzéshez a Statistica 13.4 (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA) programot használtuk. A numerikus paraméterek összehasonlításához post hoc analízist végeztünk a Mann-Whitney U-teszttel és Kruskal-Wallis teszttel. A kategorikus változók esetében khi-négyzet tesztet, vagy Fisher-egzakt tesztet alkalmaztunk. A túlélési periódusokat a SLNB időpontjától az utolsó megjelenés időpontjáig, a progresszió bekövetkeztéig, a melanoma specifikus és az attól függetlenül is bekövetkező halál időpontjáig, illetve távoli áttét megjelenéséig mértük. Ennek megfelelően a teljes túlélés (OS), betegség-specifikus túlélés (DSS), progressziómentes túlélés (PFS) és a távoli metasztázismentes túlélés került meghatározásra (DMFS). A betegek túlélését Kaplan-Meier analízissel és log-rank teszttel értékeltük. A lehetséges prognosztikai faktorok és a túlélés közötti összefüggést COX regressziós egyváltozós és többváltozós analízissel elemeztük. A SLN biopszia pozitivitásának valószínűségét a prognosztikus paraméterekkel összefüggésben bináris logisztikus regressziós modellel értékeltük. A statisztikai próbák eredményét $p < 0,05$ érték alatt tekintettük szignifikánsnak.

6 Eredmények

6.1 BRAF gátló monoterápiával elért eredményeink metasztatikus melanomában szenvedő betegeinknél

43 metasztatikus melanomában szenvedő BRAF pozitív betegünk részesült vemurafenib monoterápiában. A medián követési idő 15,9 hónap volt. A vizsgálatban 22 nő (52,2%) és 21 férfi (48,8%) adatait értékeltük. A betegek átlagéletkora 57 év volt (27-77), 91% ECOG 0-1 performance státuszú volt. Az AJCC TNM stádium beosztás szerint 70% M1c státuszú volt, 6 betegnél stabil cerebrális metasztázis is jelen volt. A betegek 49%-ánál a terápia kezdetekor mért LDH szint normál tartományban volt, 72,1%-ban vemurafenib terápiát másod-, vagy harmadvonalban kapták. 39 beteg BRAF V600E mutációt hordozott, 2 betegnél V600K BRAF mutáció volt jelen, 2 betegnél a mutáció típusa nem került pontos meghatározásra. (1. táblázat)

1. táblázat: Betegpopulációs adatok vemurafenib terápiában

<i>Betegpopulációs adatok</i>	n (%)
Életkor, év (megoszlás)	57 (27-77)
Nem	
Nő	22 (48,8%)
Férfi	21 (51,2%)
Breslow tumorvastagság mm, átlag (megoszlás)	4,9 (1-15)
Exulceráció	19 (59,4%)
ECOG performance status	
0	21 (49%)
1	18 (42%)
2	4 (9%)
Metasztázis	
Inoperábilis IIIC	5 (11%)
M1a	3 (7%)
M1b	5 (12%)
M1c	30 (70%)
LDH	
Normál	21 (49%)
Emelkedett	22 (51%)
Hanyadvonalban alkalmazott kezelés	
Első vonalban	12 (27,9%)
Másodvonálban	19 (44,2%)
Harmadvonalban	8 (18,6%)
Negyed- vagy többedvonálban	4 (9,3%)
Az anamnézisben agyi áttét jelenléte szerepelt	6 (13,9%)
BRAF mutáció típusa	
V600E	39 (90,6%)
V600K	2 (4,7%)
Nem került meghatározásra	2 (4,7%)

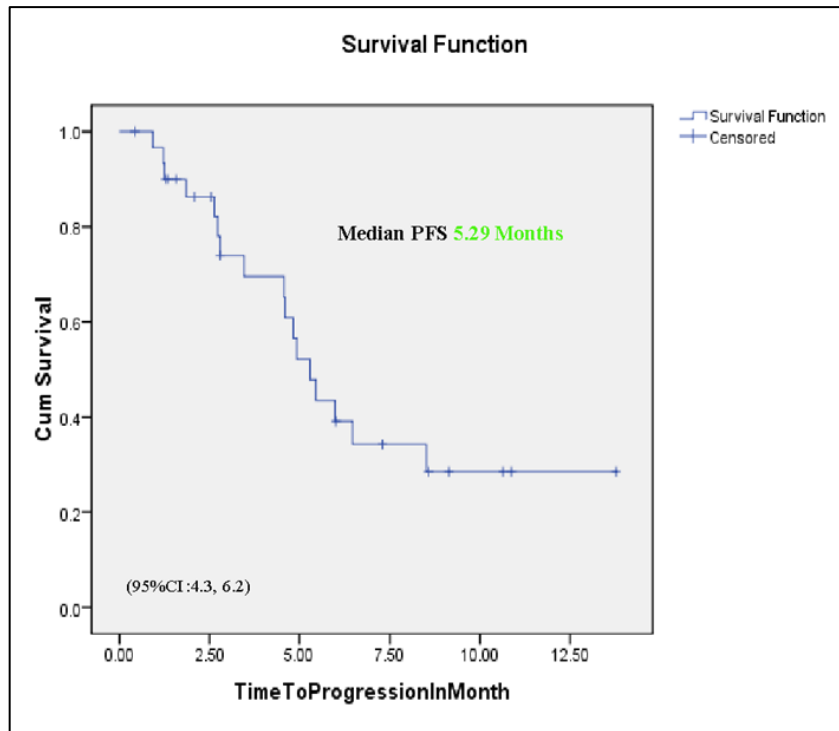
A terápia hatékonyságát vizsgálva, 22 (51,1%) betegnél objektív tumorválaszt észleltünk a vemurafenib terápia mellett, ebből 5 beteg (11,6%) komplett remisszióba került, 17

beteg parciális remisszióba (39,5%). Stabil betegséget 27,9%-ban mutattuk ki a terápia mellett. A betegségkontroll arány (DCR) 88,4% volt. 5 beteg esetén progresszív betegséget, primer rezisztenciát tapasztaltunk (11,6%). **(1. kép)**

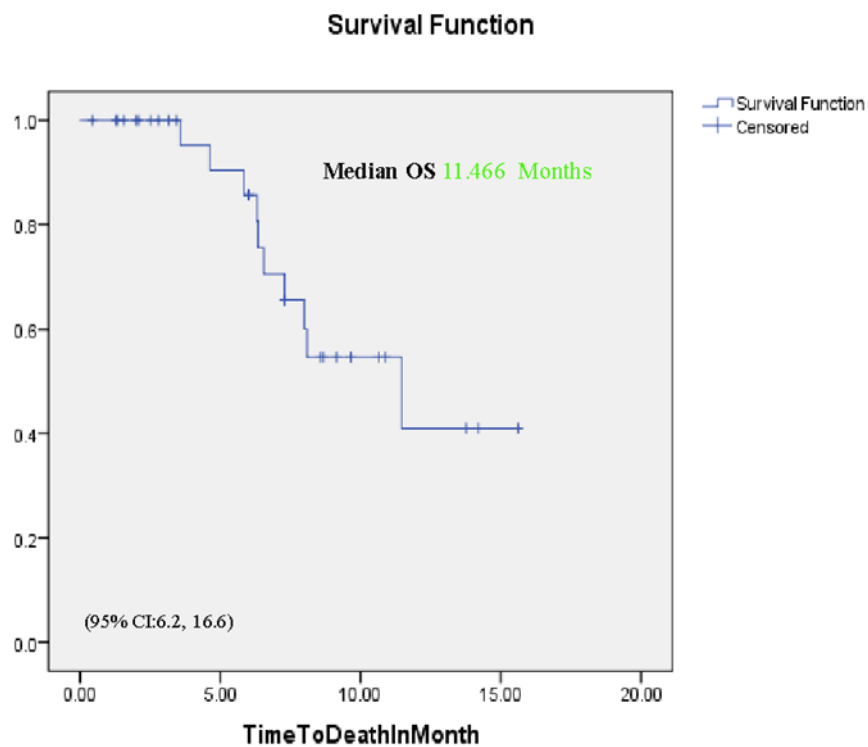


1. kép: Vemurafenib monoterápiával elért eredményeink fotódokumentációja. Cutan tumorok csaknem komplett remissziója.

A medián progressziómentes túlélés 6,48 hónapnak (95% CI: 4,8-15,0), a medián teljes túlélés 11,47 hónapnak bizonyult (95% CI:8,08-NA). **(1-2. diagram)**



1. diagram: Vemurafenib terápia melletti PFS túlélés Kaplan-Meier görbéje. (Medián PFS: 5,29 hónap)



2. diagram: Vemurafenib terápia melletti OS Kaplan-Meier görbéje. (Medián teljes túlélés 11,46 hónap).

Kiemeljük, hogy betegpopuláciánkban a vizsgált populációban a betegek 72%-a másod-harmad-negyed vonalban kapta a kezelést, tekintettel arra, hogy disszeminációjuk kezdetekor a BRAF inhibitor terápia még nem volt elérhető.

A betegek 46%-a az adatok zárásakor még életben volt. A leghosszabb ideig vemurafenib terápiában részesült beteg 26 hónapja progressziómentesnek bizonyult a vizsgálat lezárásának idejében. A cerebrális metasztázisú alcsoport túlélési adatait vizsgálva (6 beteg) 50%-os remissziós rátát igazoltunk (3 beteg), ezen belül 1 betegünk cerebrális metasztázis mellett komplett remisszióba került (16,6%), 2 beteg parciális remisszióba (23,3%). 3 agyi metasztázissal kezelésbe vett betegnél (50%) progresszív betegséget észleltünk. A medián PFS cerebrális metasztázis esetén 4,5 hónap volt, a medián OS 6,8 hónap.

Cox regressziós modellben vizsgálva, egyváltozós analízissel a teljes túlélést szignifikánsan meghatározó tényezőnek a terápia kezdetekor mért LDH szint bizonyult (HR: 4.89, CI: 1,97-12,13, p=0,000613). Az egyéb vizsgált változók tekintetében nem találtunk szignifikanciát. Az LDH szint többváltozós elemzéssel is szignifikáns összefüggésben maradt a teljes túléléssel, így a túlélés legerősebb prediktív faktorának bizonyult ebben a vizsgálatunkban (HR:4,65, CI: 1,32-16,38, p=0,0168).

A leggyakrabban jelentkező gyógyszerrel összefüggő mellékhatások (AEs) a follicularis hyperkeratosis, fotoszenzitivitás, maculopapulosus rash, arthralgia voltak. A mellékhatások 52%-a a bőrrel összefüggő mellékhatás volt, **Grade 3 mellékhatást** (maculopapulosus rash, laphám cc. kialakulása, arthralgia, QTcB emelkedés) 7 esetben észleltünk (16,3%). **Grade 4 mellékhatás** nem fordult elő, secunder melanoma nem jelent meg a vizsgált betegpopulációban. 2 esetben (6%) a betegeknek herpes zostert diagnosztizáltunk a terápia alatt, ennek kialakulása mindkét esetben a terápia 6. hónapján történt. 1 betegnél a szakirodalomban ekkor még ritka mellékhatásként értékelt vemurafenib asszociált panniculitis jelentkezett, melyet szövettani mintavétellel igazoltunk. 1 esetben palmo-plantaris erythrodysaesthesia syndroma jelentkezett. Keratoacanthomát és cutan laphámrákot 5 betegnél diagnosztizáltunk (12%). Medián kialakulási idejük 8 hét volt (7-32 hét). Ezen 5 betegnél 1 esetben a laphám carcinoma keratoacanthomával kevert szövettani típus volt. **(2. táblázat) (2.,3.,4.,5. kép)**

2. táblázat: Mellékhatások vemurafenib monoterápia mellett Gr1-2 és Gr3 megoszlásban

Mellékhatások (AEs)	Gr1-2, betegszám (%)	Gr3, betegszám (%)
Folliculáris hyperkeratózis	17 (39%)	0
Fotoszenzitivitás	14 (33%)	0
Maculo-papuláris kiütések	7 (16%)	2 (5%)
Ízületi fájdalom	10 (23%)	1 (2%)
Diarrhoea	5 (12%)	0
Fáradtság	4 (9%)	0
Alopecia	5 (12%)	0
Verruca vulgaris	4 (9%)	0
Keratoacanthoma	3 (7%)	0
Pruritus	2 (5%)	0
QTcB idő megnyúlása	0	2 (5%)
Total bilirubin szint emelkedés	1 (2%)	0
Palmo-plantaris hyperkeratosis	2 (5%)	0
Dysgeusia	1(2%)	0
Squamocelluláris cc.	0	2 (5%)
Panniculitis	1 (2%)	0



2. kép: Vemurafenib monoterápia mellett kialakult folliculáris hyperkeratosis



3. kép: Vemurafenib monoterápia mellett kialakult neutrofil panniculitis képe



4. kép: Vemurafenib monoterápia mellett kialakult palmo-plantaris hyperkeratosis



5. kép: Vemurafenib monoterápia mellett kialakult fotoszenzitivitási reakció

A vizsgált betegeinknél nem kényszerültünk a terápia végleges abbahagyására egy esetben sem. 13 (30,2%) betegnél a kialakult terápiával összefüggést mutató mellékhatások miatt dózisredukció történt, 8 betegnél 1-es szintű (75%), 5 betegnél 2-es szintű dózismodifikáció történt (50%). A terápia felfüggesztése leggyakrabban arthralgia és maculo-papulosus kiütés miatt történt.

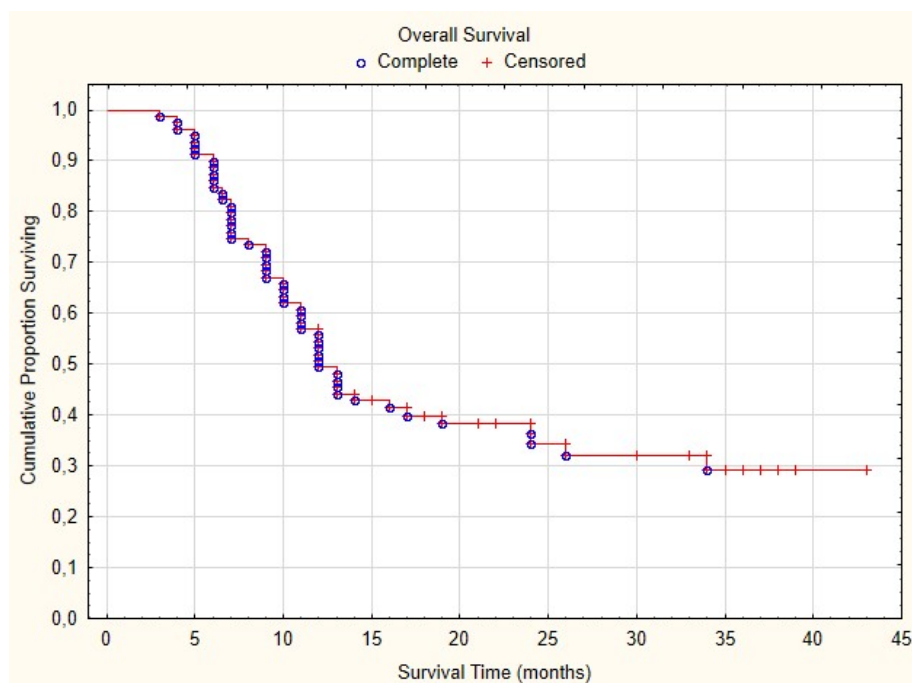
6.2 BRAF-MEK gátló kombinációs célzott terápiával elért eredményeink

Második vizsgálatunkban 118 BRAF pozitív, metasztatikus melanomában szenvedő, OEP/NEAK finanszírozás keretein belül BRAF-MEK gátló kezelésben részesült betegeinkkel szerzett klinikai tapasztalatainkat összegeztük. Célunk a terápia hatékonyságának megállapítása, valamint a mellékhatások feltérképezése volt. 2015 novembere és 2018 decembere között 118 betegünkönél alkalmaztunk kombinációs kezelést. 80 beteg kapott dabrafenib+trametinib kezelést, 38 beteg vemurafenib+cobimetinib terápiát. A betegpopulációs adatokat a **3. táblázatban** részletezzük.

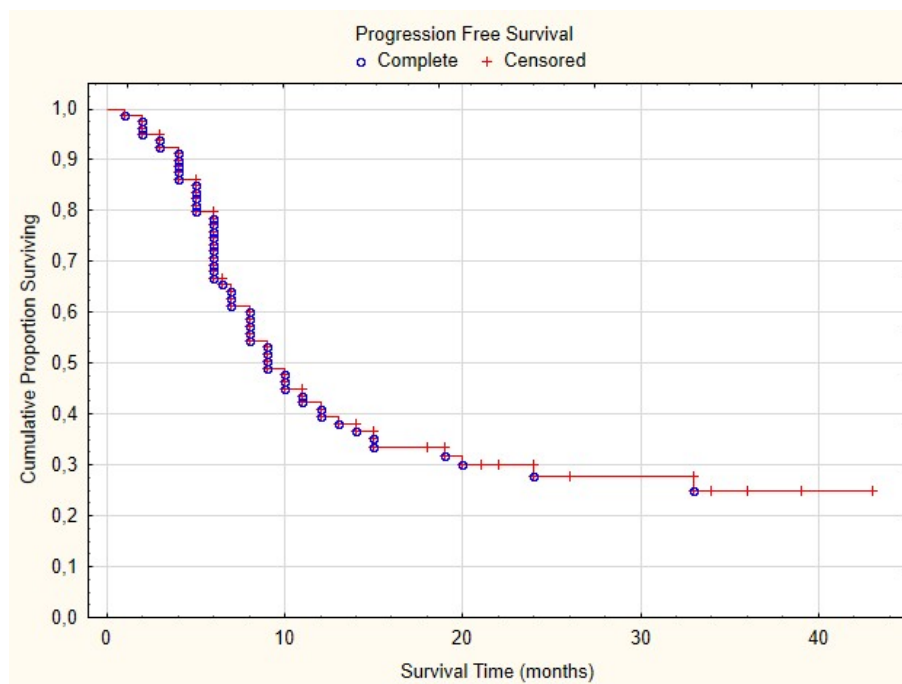
3. táblázat: Vemurafenib+cobimetinib és dabrafenib+trametinib terápiában részesített betegeink prognosztikus paraméterei

	vemurafenib + cobimetinib	dabrafenib+trametinib
Paraméterek	n (%)	n (%)
Összes	38 (100%)	80 (100%)
Kor átlag (min-max)	60,7 (26-81)	58,8 (29-92)
Nem		
Férfi	18 (47,4%)	42 (52,5%)
Nő	20 (52,6%)	38 (47,5%)
Breslow érték (mm) átlag (megoszlás)	6,3 (0,01-26,0)	4,5 (0,36-33,0)
ECOG státusz		
0	28 (73,7%)	72 (90%)
1	10 (26,3%)	7 (8,7%)
2	0 (0%)	2 (2,3%)
Stádium		
Inoperábilis IIIC	4 (10,5%)	4 (5%)
M1a	4 (10,5%)	3 (3,8%)
M1b	14 (36,8%)	6 (7,5%)
M1c	16 (12,2%)	67 (83,7%)
Emelkedett LDH érték	17 (45%)	29 (36%)
Terápia		
Első vonal	31 (81,6%)	79 (98,8%)
Többed vonal	7 (18,4%)	1 (1,2%)
Agyi metasztázis n (%)	0 (0%)	31 (39%)

A betegek nembeli eloszlása: 60 férfi (51%) és 58 nő (49%) volt a vizsgálatban. Az átlagéletkoruk dabrafenib+trametinib esetén 58,8 év volt, míg vemurafenib+cobimetinibnél 60,7 év. Az átlagos Breslow tumorvastagság 6,3 mm a vemurafenib+cobimetinib csoportban és 4,5 mm a dabrafenib+trametinib esetén. A terápia kezdetekor mért LDH szint 45%-ban emelkedett volt vemurafenib+cobimetinibnél, és 36%-ban dabrafenib+trametinibnél. Az AJCC stádiumbeosztása alapján a betegek 72%-a M1c stádiumú volt, melyből 39 esetben (49%), a dabrafenib+trametinib csoportban cerebrális metasztázis is jelen volt a terápia megkezdésekor. A vemurafenib+cobimetinib alcsoport betegeinél cerebrális metasztázis nem volt a terápia megkezdésekor. A medián követési idő a dabrafenib+trametinib terápiában részesülő csoportban 12 hónap (3-43), a vemurafenib+cobimetinib terápiában részesülő csoportban 18 hónap volt (3-43). A terápia eredményességét vizsgálva objektív választ dabrafenib+trametinib terápia esetén a betegek 82%-ában (7% komplett remisszió, 75% parciális remisszió), értünk el. 8%-ban stabil betegséget, 10%-ban progresszív betegséget észleltünk. A medián PFS 8,5 hónapnak, a medián OS 12 hónapnak bizonyult. (3-4. diagram)

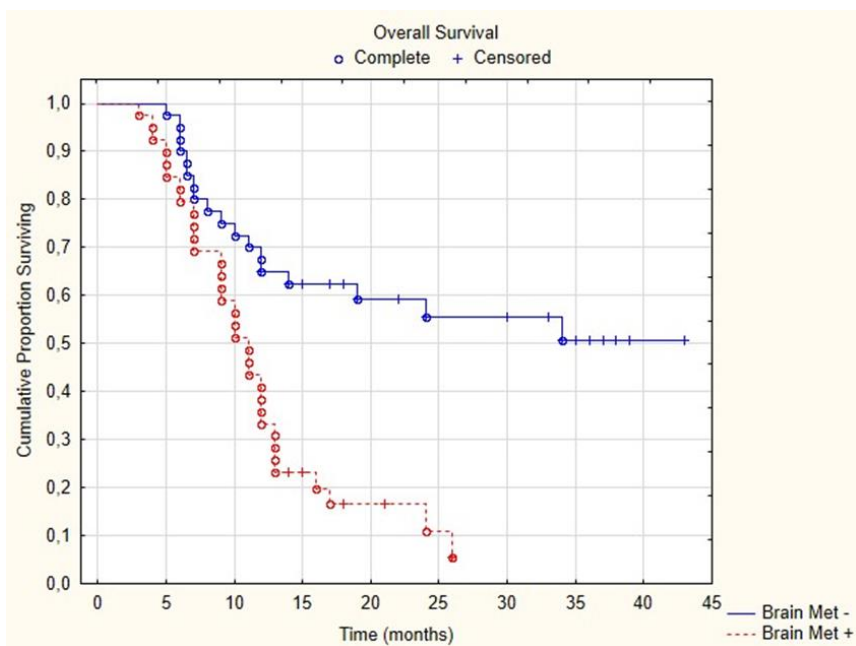


3. diagram: Az OS Kaplan-Meier görbéje dabrafenib+trametinib terápiával. Medián OS:12 hónap.

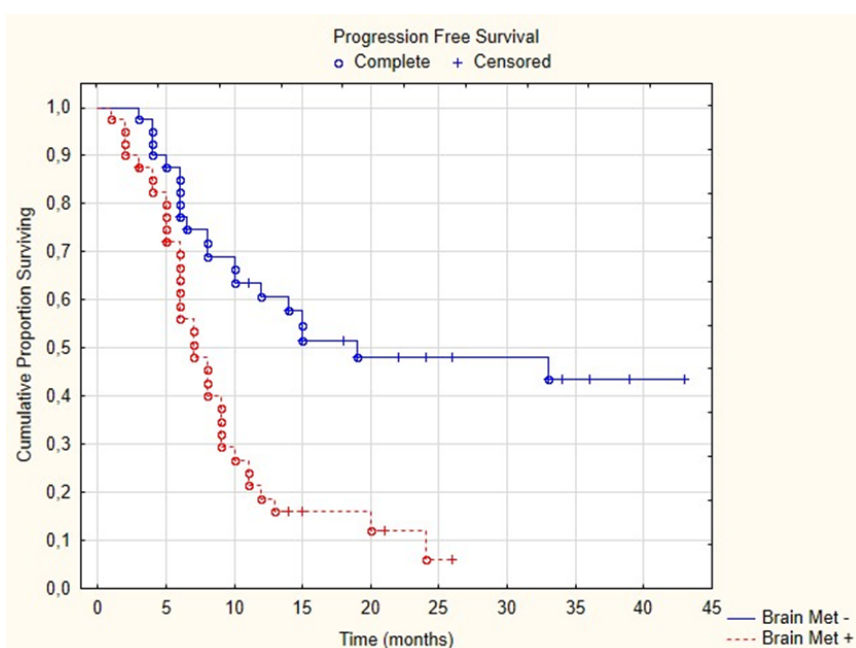


4. diagram: A PFS Kaplan-Meier görbéje dabrafenib+trametinib terápiával. Medián PFS: 8,5 hónap.

A dabrafenib+trametinib terápiában részesülő betegeket 2 csoportra osztottuk túlélési mutatóik elemzése céljából, a cerebrális metasztázisú és az agyi áttétől mentes csoportra. A szelektált, terápia kezdetekor agyi metasztázisú alcsoportot vizsgálva szignifikáns összefüggést észleltünk a medián PFS ($p \leq 0,0002$), valamint a medián OS ($p \leq 0,0001$) vonatkozásában a két alcsoport között. A cerebrális metasztázisú alcsoportban 11 hónapos medián OS (3-26), valamint 7 hónapos (1-26) medián PFS értékeket értünk el. A dabrafenib+trametinib terápiában részesülő cerebrális metasztázisban nem szenvedő betegeknél jelentősen jobb mutatókat detektáltunk: medián OS 18,5 hónap (5-43), medián PFS 14 hónap (3-43). **(5-6. diagram)**

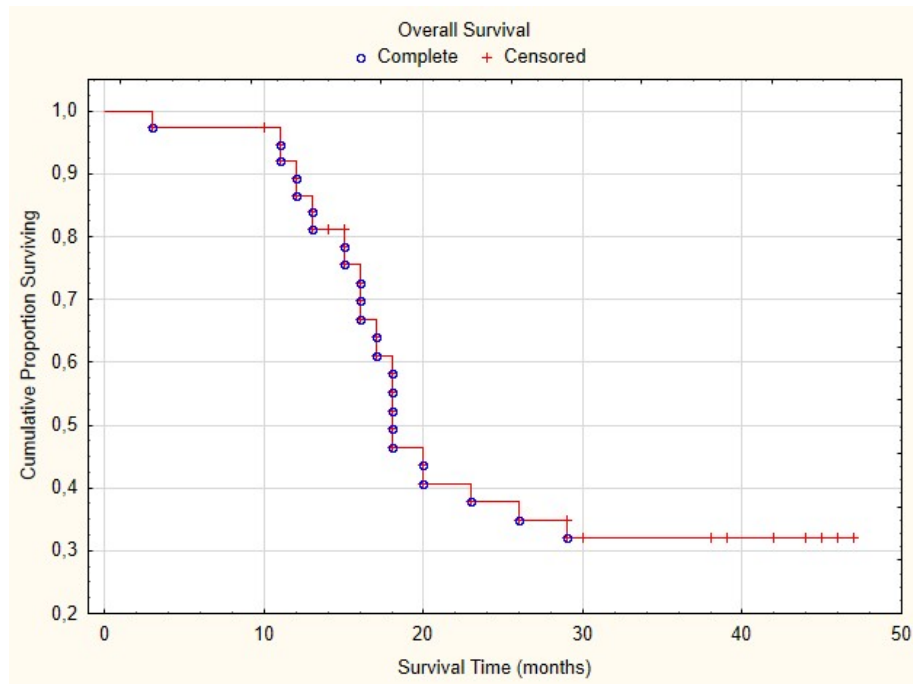


5. diagram: Kaplan-Meier OS görbék cerebrális metasztázis vs. attól mentes betegeknél dabrafenib+trametinib terápia mellett. Az agyi metasztázis jelenléte a terápia kezdetekor szignifikáns összefüggést mutatott a teljes túléléssel $p < 0,0001$.

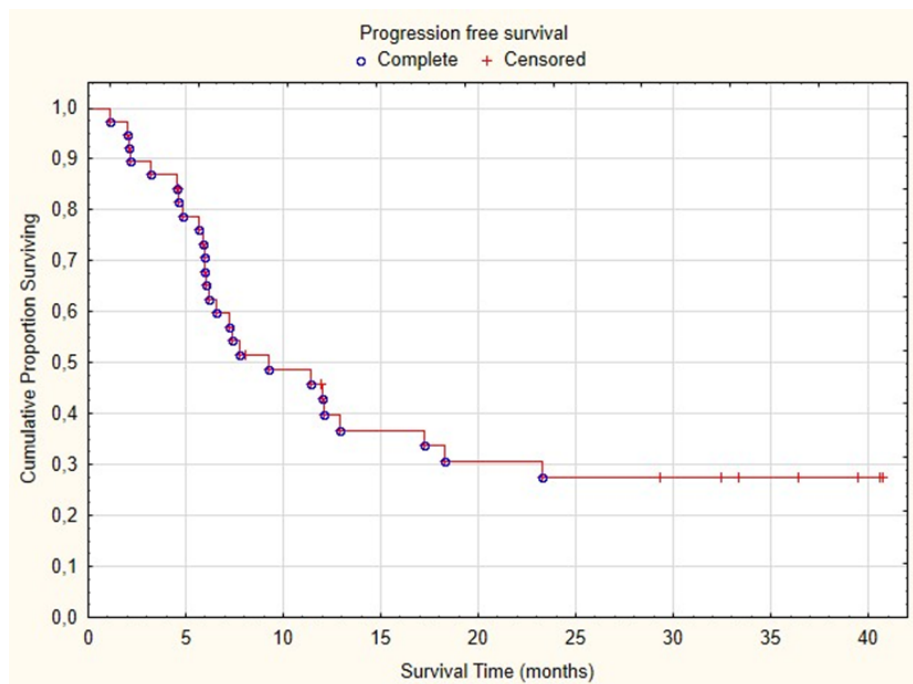


6. diagram: Kaplan-Meier PFS görbék cerebrális metasztázis vs. attól mentes betegeknél dabrafenib+trametinib terápia mellett. Az agyi metasztázis jelenléte a terápia kezdetekor szignifikáns összefüggést mutatott a progresszió-mentes túléléssel $p = 0,0002$.

Vemurafenib+cobimetinib terápia esetén a betegek 76%-ában találtunk objektív választ (15% komplett remisszió, 61% parciális remisszió). A betegek 14%-ánál stabil betegséget értünk el, 10%-nál progressziót észleltünk. A medián PFS 8 hónapnak, a medián OS 18 hónapnak bizonyult. **(7-8. diagram)**



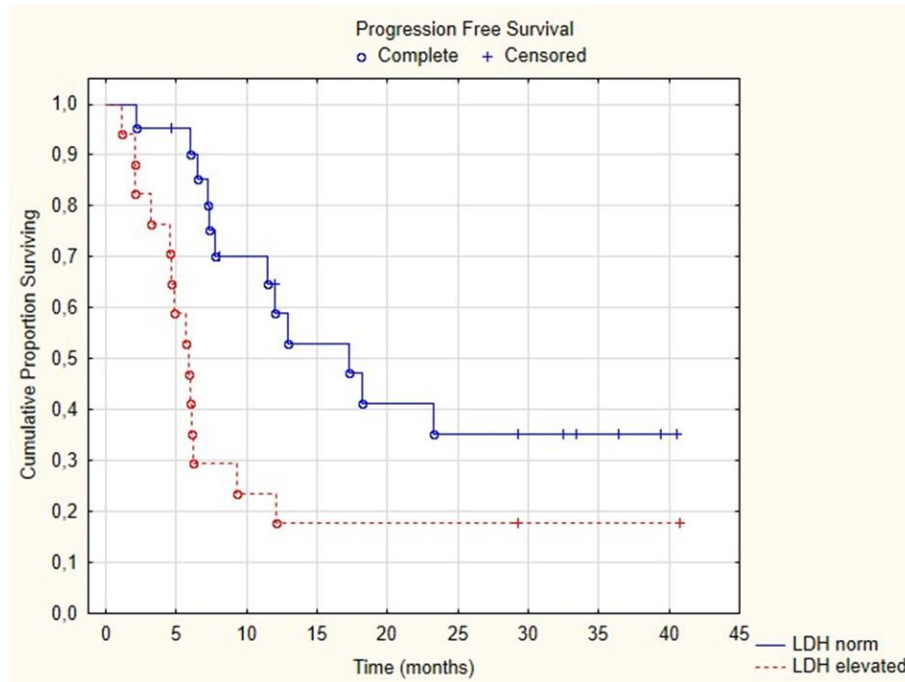
7. diagram: Az OS Kaplan-Meier görbje vemurafenib+cobimetinib csoportban, medián OS:18 hónap.



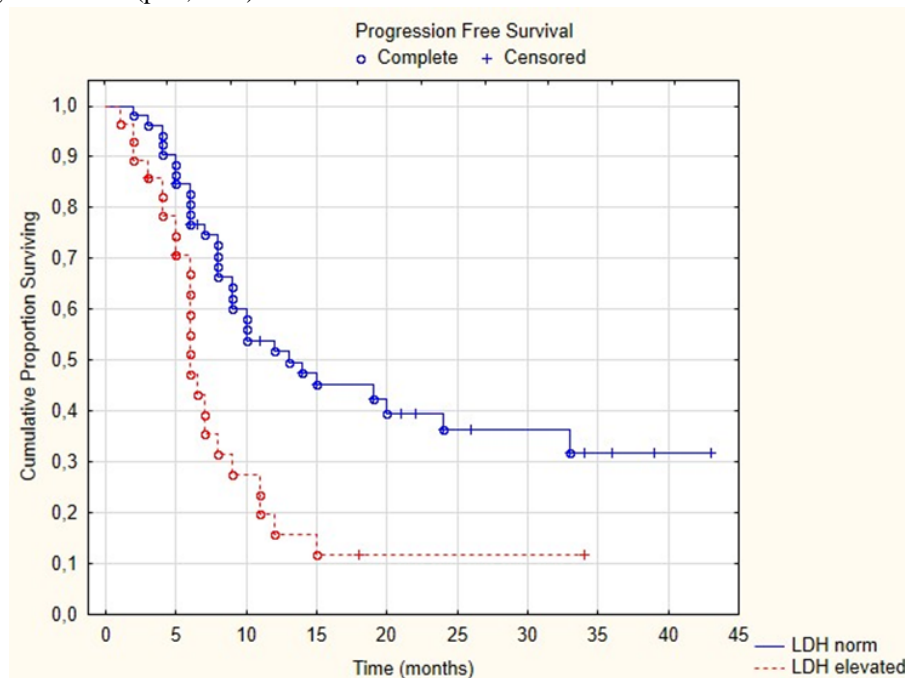
8. diagram: A PFS Kaplan-Meier görbje vemurafenib+cobimetinib csoportban medián PFS: 8 hónap

Mindkét kombinációs terápiával 90%-os betegségkontroll rátát értünk el. Komplet remissziót 6-6 beteg esetében (15% vemurafenib+cobimetinib kombinációval, 7% darafenib-trametinib kombinációval) mutattunk ki. A terápia kezdetekor mért LDH szint és a progresszió-mentes túlélés között a vemurafenib+cobimetinib csoportban ($p=0,0184$), valamint a dabrafenib+trametinib csoportban ($p=0,0042$) is szignifikanciát

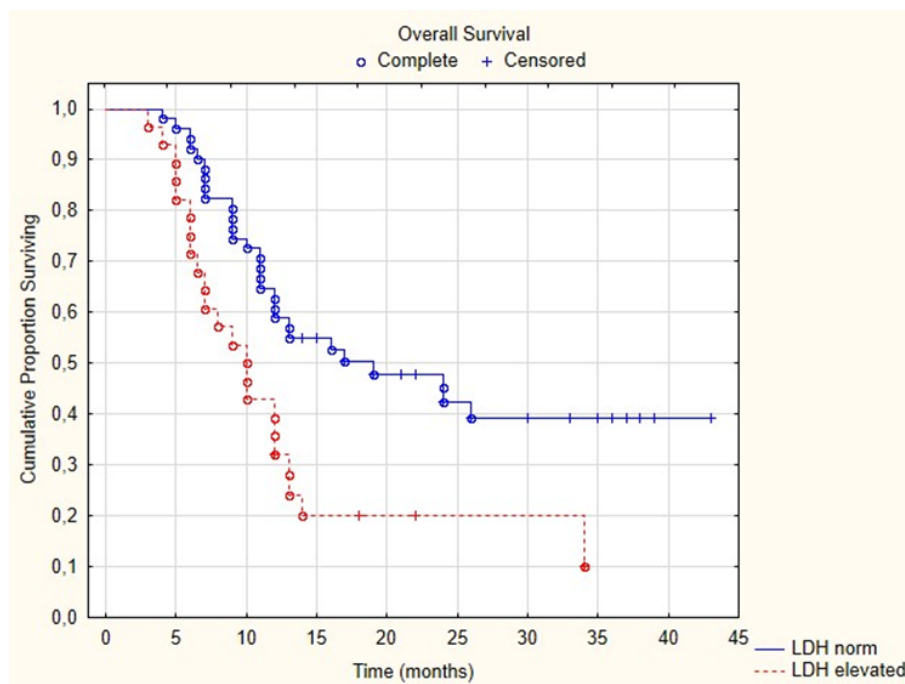
mutattunk ki, a teljes túléléssel az LDH szint csupán a dabrafenib+trametinib csoportban bizonyult szignifikánsan összefüggőnek ($p=0,0056$). (9-11. diagram)



9. diagram: A PFS Kaplan-Meier görbái vemurafenib+cobimetinib terápia mellett normál és emelkedett LDH szintnél. A terápia kezdetekor mért LDH szint a progressziómentes túléléssel szignifikáns összefüggést mutatott ($p=0,0184$).



10. diagram: A PFS túlélés Kaplan-Meier görbái dabrafenib+trametinib terápia mellett normál és emelkedett LDH szintnél. A terápia kezdetekor mért LDH szint a progressziómentes túléléssel szignifikáns összefüggést mutatott ($p=0,0042$).



11. diagram: A túlélés (OS) Kaplan-Meier görbéi normál és emelkedett LDH szint mellett. A terápia kezdetekor mért LDH szint a teljes túléléssel szignifikáns összefüggést mutatott dabrafenib+trametinib terápiában részesült betegek esetén ($p=0,0056$).

A terápiák a klinikai vizsgálatoknak megfelelően jól tolerálhatóak voltak. A mellékhatásokat CTCAE 4.03 terminológia alapján osztályoztuk. Vemurafenib+cobimetinib terápiával leggyakrabban emelkedett májenzim értékeket (50%), maculopapulózus, illetve papulo-pustulózus kiütés jelenlétét (34%), hasmenést (39%), emelkedett CPK szintet (32%), fényérzékenységet (29%) észleltünk. A betegek 13%-ában cobimetinib mellékhatásaként serosus rethinopathia jelentkezett. Neutrofil panniculitist 3 betegnél észleltünk (8%). Második primer melanoma ebben a betegcsoportban 1 betegnél jelentkezett a terápia alatt, keratoacanthoma, cutan laphám carcinoma pedig 1-1 esetben (5%). Grade 3-4 fokozatú mellékhatást 34%-ban detektáltunk. Dózismodifikációra 11 betegnél volt szükség, 9 betegnél (24%) 1-es szintű dózismodifikáció történt vemurafenibbel, valamint cobimetinibbel (75%), 2 betegnél 2-es szintű vemurafenib (50%) dózismodifikációra kényszerültünk.

Terápia felfüggesztés 42%-ban történt, 16 betegnél vemurafenib okozta mellékhatás miatt és 14 betegnél, 37%-ban cobimetinib okozta mellékhatás miatt. **(4. táblázat)**

6 betegnél a cobimetinib terápia (16%), 2 betegnél a vemurafenib (5%) terápia végleges abbahagyására kényszerültünk.

4. táblázat: Vemurafenib+cobimetinib terápiával észlelt mellékhatások összefoglaló táblázata

Mellékhatások	Minden Grade n(%)	Gr1-2 n(%)	Gr3 n(%)	Gr4 n(%)
Májfunkciós eltérések	19 (50%)	13 (34%)	6 (16%)	-
Diarrhoea	15 (39%)	12 (31%)	3 (8%)	-
Rash	13 (34%)	12 (31%)	5 (13%)	-
CPK emelkedés	12 (32%)	8 (21%)	2 (5%)	2 (5%)
Fotoszenzitivitás	11 (29%)	11 (29%)	-	-
Arthralgia	11 (29%)	11 (29%)	-	-
Látászavar	9 (24%)	9 (24%)	-	-
Follicularis hyperkeratosis	6 (16%)	6 (16%)	-	-
Serosus rethinopathia	5 (13%)	5 (13%)	-	-
Leukocytopenia	4 (10%)	4(10%)	-	-
Panniculitis	3 (8%)	3 (8%)	-	-
Szájúregi aphta	2 (5%)	2 (5%)	-	-
QTcB emelkedés	1 (2,5%)	-	1 (2,5%)	-
Laphám karcinoma	1 (2,5%)	-	1 (2,5%)	-
Keratoacanthoma	1 (2,5%)	1 (2,5%)	-	-

A dabrafenib+trametinib csoportban leggyakrabban emelkedett CPK enzim értéket (24%), májenzim értékeket (13%), lázat (13%), hasmenést (8%), papulo-pustulosus kiütéseket (9%), és leukocytopeniát (6%) észleltünk. A betegek 2%-ában a trametinib mellékhatásaként serosus rethinopathia jelentkezett. Grade 3-4 fokozatú mellékhatást az esetek csupán 10%-ában detektáltunk. **(5. táblázat)** Dózismodifikációra 20%-ban volt szükség, viszont egy betegnél sem kellett dabrafenib+trametinib kombinációval a terápiát véglegesen abbahagynunk. A mellékhatások nagy hányada a terápia első 2 hónapjában jelentkezett. Terápia felfüggesztés dabrafenib okozta mellékhatás miatt 24%-ban történt, trametinib okozta mellékhatás miatt 19%-ban. 11 betegnél (14%) 1-es szintű (75%) dózismodifikáció történt a dabrafenib terápiában, illetve 3-3%-ban 1-es és 2-es szintű dóziscsökkentés trametinib terápiában.

5. táblázat: Dabrafenib+trametinib terápiánál észlelt mellékhatások összefoglaló táblázata

Mellékhatások	Minden Grade n(%)	Gr1-2 n(%)	Gr3 n(%)	Gr4 n(%)
CPK emelkedés	19 (24%)	14 (18%)	5 (6%)	-
Májfunkciós eltérések	10 (13%)	6 (8%)	4 (5%)	-
Láz	10 (13%)	10 (13%)	-	-
Rash	8 (10%)	7 (9%)	1 (1%)	-
Diarrhoea	6 (8%)	6 (8%)	-	-
Leukocytopenia	5 (6%)	5 (6%)	-	-
Hypertonia	2 (3%)	2 (3%)	-	-
Serosus retinopathia	2 (3%)	2 (3%)	-	-
Arthralgia	2 (3%)	2 (3%)	-	-
Köhögés	2 (3%)	2 (3%)	-	-
Hypertonia	2 (3%)	2 (3%)	-	-
Vasculitis	1 (1%)	-	1 (1%)	-
Panniculitis	1 (1%)	1 (1%)	-	-

A mellékhatások nagy hányada a terápia első 2 hónapjában jelentkezett betegeinknél mindkét kombinációs terápia esetén.

6.3 A primer melanoma BRAF és NRAS mutációjának prediktív és prognosztikai értéke a sentinel nyirokcsomó státusszal összefüggésben

A harmadik retrospektív vizsgálatunkban 159 betegünk medián követési ideje 61 hónap volt (1-96). A betegek átlagéletkora 59 év (18-83). A betegek nembeli eloszlása: 71 férfi (44,7%) és 88 (55,3%) nő adatait elemeztük. A primer tumor elhelyezkedése szempontjából a törzs volt a leggyakoribb lokalizáció (77; 48,8%), majd az alsó végtag (47; 29,6%), végül a felső végtag (35; 22%). A medián Breslow tumorvastagság 1,8 mm volt (0,51-20 mm). A primer tumorok 30,8%-a volt exulcerált. Szöveti típusok közül leggyakrabban superficiálisan terjedő melanoma került diagnosztizálásra (SSM,124; 78%), 31 esetben (19,5%) nodularis típust, 4 esetben (2,5%), egyéb hisztológiai típust került meghatározásra. A medián mitóziusszám 4/mm² (0-31) volt. 86 esetben (54,1%) tumort infiltráló limfociták (TIL) voltak jelen. A primer tumorban korai regressziót 9 betegnél észleltünk (5,7%), késői, kevesebb, mint 75%-os regressziót 50 (31,4%) esetben, több, mint 75%-os késői regressziót 21 beteg primer tumorában (13,2%) találtunk. A primer tumor 90 beteg esetén hordozott BRAF mutációt (56,6%), mely 87%-ban V600E, 10%-ban V600K és 3%-ban V600R volt. 29 primer tumorban NRAS mutációt

detektáltunk (18,2%), az esetek többségében az exon 3-as codon 61 (97%) lokalizációban, exon 2 codon 13 lokalizációban csupán 3%-ban. 28 beteg dupla vad típusú csoportba tartozott (17,6%), 12 beteg genotípusának meghatározása sikertelen volt (7,5%). A SLN status 130 esetben negatívnak bizonyult (81,8%), 29 beteg SLN biopsziája során igazolódott nyirokcsomó metasztázis (18,2%) (6. táblázat).

6. táblázat: A vizsgált betegek jellemzői

Paraméterek	n (%)
Összes beteg	159
Kor (év) (medián, min; max)	59 (18; 83)
Követési idő (hónap) (medián, min; max)	61 (1; 96)
Nem	
férfi	71 (44,7%)
nő	88 (55,3)
Lokalizáció	
felső végtag	35 (22%)
alsó végtag	47 (29,6%)
törzs	77 (48,4%)
Breslow (mm) (medián, min; max)	1.8 (0,51; 20)
Breslow kategóriák	
I (≤ 1 mm)	21 (13,2%)
II (1.01–2.00 mm)	65 (40,9%)
III (2.01–4.00 mm)	62 (39%)
IV (>4 mm)	11 (6,9%)
Exulceráció	
nem	110 (69,2%)
igen	49 (30,8%)
Szövetani altípus	
SSM	124 (78%)
NM	31 (19,5%)
LMM	1 (0,6%)
ALM	1 (0,6%)
egyéb	2 (1,3%)
Mitosis szám (/mm²) (medián, min; max)	4 (0; 31)

6. táblázat folytatás

Invázió	
nincs	132 (83%)
ér	11 (6,9%)
nyirokér	11 (6,9%)
ér és nyirokér	2 (1,3%)
perineuralis	2 (1,3%)
nincs adat	1 (0,6%)
TIL	
nem	73 (45,9%)
igen	86 (54,1)
Regresszió	
nincs	79 (49,7%)
korai	9 (5,7%)
késői, <75%	50 (31,4%)
késői, ≥75%	21 (13,2%)
Mutációk a primer tumorban	
kettős vad	28 (17,6%)
BRAF	90 (56,6%)
NRAS	29 (18,2%)
nem értékelhető	12 (7,5%)
Sentinel státusz	
negatív	130 (81,8%)
pozitív	29 (18,2)

SSM: szuperficiálisan terjedő melanoma; NM: noduláris melanoma; LMM: lentigo maligna melanoma; ALM: acrolentiginózus melanoma; TIL: tumort infiltráló limfociták

Egyváltozós vizsgálatban a SLN státusz pozitív korrelációt mutatott a Breslow tumorvastagsággal ($p=0,008$). A SLN negatív betegeknél a medián Breslow tumorvastagság 1,64 mm (0,51-20 mm), míg a pozitív betegeknél 2,45 mm (0,79-15 mm) volt. A sentinel nyirokcsomó státusz és a primer tumor exulcerációja szintén szignifikáns összefüggést mutatott ($p=0,007$). 26,6%-ban észleltünk exulcerált primer tumort negatív SLN státusz esetén, míg 51,7%-ban SLN pozitív betegeinknél volt kifekélyesedett a primer tumor. A primer tumor mitotikus aktivitása különbözött a SLN pozitív és negatív betegeket vizsgálva ($p=0,009$), amely szintén szignifikánsnak bizonyult, SLN negatív betegeknél median $3/\text{mm}^2$ (0-31), míg SLN pozitívitásnál $5/\text{mm}^2$ (1-30) volt a median mitózisszám. A primer tumor limfovaszkuláris/perineuralis inváziója korrelációt mutatott

a SLN státusszal ($p=0,004$), SLN pozitív betegek primer tumorában 34,5%-ban volt jelen, míg negatív esetben csupán 12,3%-ban. BRAF mutációt vizsgálva kismértékben nagyobb arányban detektáltuk SLN pozitív betegeink primer tumorában, a negatív esetekhez képest (65,5%, 54,6%), de ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Kiemelendő, hogy a primer tumor csak 6,9%-ban hordozott NRAS mutációt SLN pozitív tumoroknál, míg 20,8%-ban azon primer tumoroknál, mely SLN biopsziája negatív volt, azonban ez az eltérés sem mutatott statisztikailag szignifikanciát. (7. táblázat)

7.táblázat: A paraméterek megoszlása a sentinel nyirokcsomó státusznak megfelelően

Paraméterek	Sentinel negatív	Sentinel pozitív	p (alkalmazott statisztikai módszerek)
Összes beteg	130	29	
Kor (év) (medián, min; max)	59,5 (18; 82)	58 (32; 83)	0,81 (Mann–Whitney)
Nem			
férfi	55 (42.3%)	16 (55.2%)	0,208 (χ^2)
nő	75 (57.7%)	13 (44.8%)	
Lokalizáció			
felső végtag	32 (24.6%)	3 (10.3%)	0,211 (χ^2)
alsó végtag	36 (27.7%)	11 (37.9%)	
törzs	62 (47.7%)	15 (51.7%)	
Breslow (mm) (medián, min; max)	1.64 (0.51; 20)	2.45 (0.79; 15)	0,008 (Mann–Whitney)
Exulceráció			
nem	96 (73.8%)	14 (48.3%)	0,007 (χ^2)
igen	34 (26.2%)	15 (51.7%)	
Szöveti altípus			
SSM	104 (80%)	20 (69%)	0,177 (χ^2)
NM	24 (18.5%)	7 (24.1%)	
egyéb	2 (1.5%)	2 (6.9%)	
Mitosis szám (/mm ²) (medián, min; max)	3 (0; 31)	5 (1; 30)	0,009 (Mann–Whitney)
Invázió (minden típus)			
nem	113 (86.7%)	19 (65.5%)	0,004 (χ^2)
igen	16 (12.3%)	10 (34.5%)	
nincs adat	1 (0%)	0 (0%)	
TIL			
nem	62 (47.7%)	11 (37.9%)	0,34 (χ^2)
igen	68 (52.3%)	18 (62.1%)	

7. táblázat folytatása

Regresszió			
nincs	63 (48.5%)	16 (55.2%)	
korai	7 (5.4%)	2 (6.9%)	0,873 (χ^2)
késői, <75%	42 (32.3%)	8 (27.6%)	
késői, \geq 75%	18 (13.9%)	3 (10.3%)	
Mutációk a primer tumorban			
kettős vad	23 (17.7%)	5 (17.2%)	
BRAF	71 (54.6%)	19 (65.5%)	0,218 (χ^2)
NRAS	27 (20.8%)	2 (6.9%)	
nem értékelhető	9 (6.9%)	3 (10.3%)	

SSM: szuperficiálisan terjedő melanoma; NM: noduláris melanoma; TIL: tumort infiltráló limfociták

A vizsgált klinikopatológiai faktorok közül többváltozós analízissel egyedül a tumorvastagság növelte a SLN-pozitivitás kockázatát (OR:4,222; 95%; CI:1,201-14,873; p=0,0025), míg az egyéb klinikopatológiai paraméterek nem bizonyultak prediktív faktornak. (8. táblázat)

8. táblázat Többváltozós vizsgálat – a SLN státusz kapcsolata a vizsgált prognosztikus paraméterekkel

	OR (95% CI)	P
Életkor (\leq 59 vs. $>$ 59)	0,744 (0,268-2,065)	0,571
Nem (férfi, nő)	0,563 (0,213-1,492)	0,248
Lokalizáció (végtagok, törzs)	1,142 (0,402-3,236)	0,804
Breslow (I-II vs. III-IV)	4,222 (1,201-14,837)	0,025
Exulceráció (igen, nem)	1,203 (0,383-3,788)	0,751
Mitózis ($<$ 4 vs \geq 4)	1,904 (0,617-5,874)	0,263
Invázió (nem, igen)	1,759 (0,547-5,655)	0,343
TIL (nem, igen)	1,185 (0,442-3,175)	0,736
BRAF (vad típus, mutáns)	1,287 (0,35-4,73)	0,704
NRAS (vad típus, mutáns)	0,314 (0,046-2,145)	0,237

A vizsgált klinikopatológiai faktorok közül többváltozós analízissel egyedül a tumorvastagság növelte a SLN-pozitivitás kockázatát (OR: 4,222; 95%; CI:1,201-14,873; p=0,0025), míg az egyéb klinikopatológiai paraméterek nem növelték a SLN lehetséges pozitívását. OR: odds ratio; TIL: tumort infiltráló limfociták

A BRAF, NRAS, valamint a dupla vad primer tumorokat összehasonlítva az életkor (p=0,001) és a Breslow tumorvastagság (p=0,018) mutatott szignifikáns különbséget

egyváltozós vizsgálatban. A BRAF mutáns betegek fiatalabb életkorúak voltak, míg az NRAS pozitív primer tumorok Breslow tumorvastagsága szignifikánsan nagyobb volt, mint a BRAF pozitív, illetve a kettős vad csoportban. A törzsi lokalizáció kissé gyakrabban jelent meg NRAS mutációval társulva (58,6%), míg BRAF mutáció esetén (51,1%), kettős vad típusú tumoroknál (31,1%) a százalékos arány kisebb volt. Az NRAS mutáns tumorok 24,1%-a noduláris szövettani altípusba tartozott, míg BRAF mutáció esetén 16,7%-ban, kettős vad típusnál pedig 17,9 %-ban fordult elő nodularis primer melanoma. (9. táblázat)

9. táblázat: Molekuláris altípusok és a vizsgált prognosztikus paraméterek

Paraméterek	kettős vad	BRAF	NRAS	p (alk. stat. módszerek)
Összes beteg	28	90	29	
Kor (év) (medián, min; max)	68 (19; 82)	53 (23; 83)	66 (30; 81)	0,001 (Kruskal–Wallis)
Nem				
férfi	12 (42,9%)	40 (44,4%)	16 (55,2%)	0,555 (χ^2)
nő	16 (57,1%)	50 (55,6%)	13 (44,8%)	
Lokalizáció				
felső végtag	8 (28,6%)	16 (17,8%)	8 (27,6%)	0,116 (χ^2)
alsó végtag	11 (39,3%)	28 (31,1%)	4 (13,8%)	
törzs	9 (31,1%)	46 (51,1%)	17 (58,6%)	
Breslow (mm) (medián, min; max)	1,675 (0,73; 20)	1,64 (0,51; 15)	2,72 (0,84; 8)	0,018 (Kruskal–Wallis)
Exulceráció				
nem	21 (75%)	64 (71,1%)	18 (62,1%)	0,534 (χ^2)
igen	7 (25%)	26 (28,9%)	11 (37,9%)	
Szövettani altípus				
SSM	23 (82,1%)	72 (80%)	20 (69%)	0,244 (χ^2)
NM	5 (17,9%)	15 (16,7%)	9 (24,1%)	
egyéb	0 (0%)	3 (3,3%)	0 (0%)	
Mitosis szám (/mm ²) (medián min; max)	3,5 (0; 26)	3 (0; 24)	4 (0; 31)	0,319 (Kruskal–Wallis)
Invázió (minden típus)				
nem	18 (64,3%)	78 (86,7%)	27 (93,1%)	0,193 (χ^2)
igen	10 (35,7%)	12 (13,3%)	1 (3,4%)	
nincs adat	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,4%)	

9. táblázat folytatása

TIL				
nem	13 (46,4%)	38 (42,2%)	16 (55,2%)	0,474 (χ^2)
igen	15 (53,6%)	52 (67,8%)	13 (44,8%)	
Regresszió				
nincs	15 (53,6%)	42 (46,7%)	16 (55,2%)	0,873 (χ^2)
korai	2 (7,1%)	6 (6,7%)	0 (0%)	
késői <75%	8 (28,6%)	30 (33,3%)	10 (34,5%)	
késői \geq 75%	3 (10,7%)	12 (13,3%)	3 (10,3%)	
Sentinel státusz				
negatív	23 (82,1%)	71 (78,9%)	27 (93,1%)	0,218 (χ^2)
pozitív	5 (17,9%)	19 (21,1%)	2 (6,9%)	

SSM: szuperficiálisan terjedő melanoma, NM: nodularis melanoma; TIL: tumort infiltráló limfociták

A betegség kimenetele

Az adatok zárásakor 130 beteg volt a vizsgált betegpopulációból életben (81,8%), 29 beteg meghalt (18,2%). 123 beteg daganatmentes volt (77,4%), 7 beteg metasztázis miatt innovatív terápiában részesült (4,4%).

29 betegnél alakult ki progresszió (18,2%) lokoregionálisan 7 esetben (4,6%), távoli melanoma metasztázis pedig 22 esetben (13,8%), ebből 9 betegnek a távoli metasztázis megjelenése előtt lokoregionális progressziója is volt.

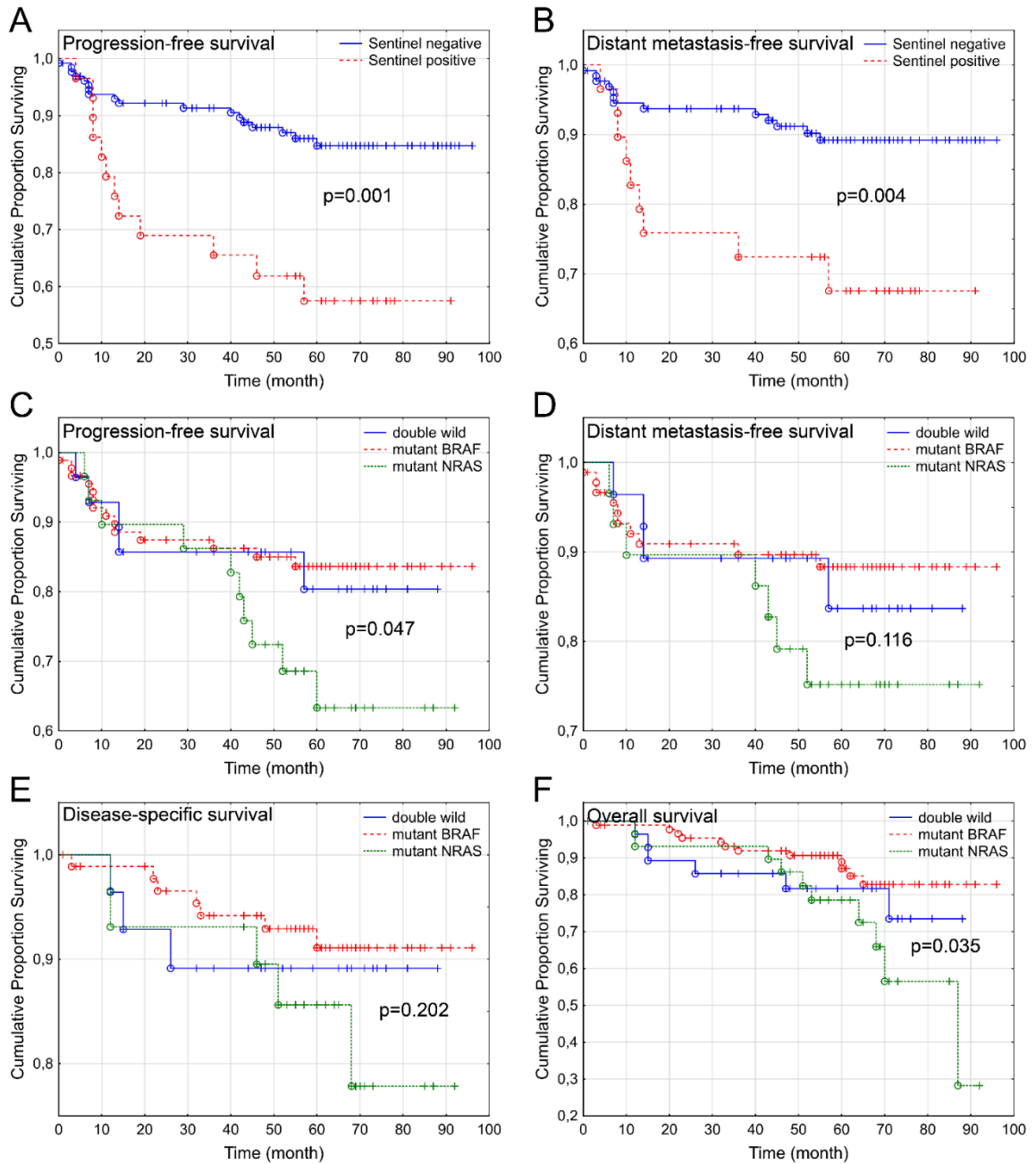
Egyváltozós Cox regressziós analízis azt mutatta, hogy a primer tumor *Breslow daganatvastagsága*, *exulcerációja*, *mitózis száma* és az *invázió* jelenléte szignifikáns összefüggést mutatott a PFS, a DMFS, a DSS valamint az OS kategóriákkal. **(10. táblázat)**

A betegek *életkora* összefüggést mutatott a DMFS és az OS kategóriákkal. A *SLN státusz* a PFS ($p=0,001$) és a DMFS ($p=0,006$) túlélési paraméterekkel is szignifikáns összefüggést mutatott. OS és DSS esetén nem észleltünk szignifikanciát, bár DSS esetén a szignifikancia szintet megközelítette az elemzés. Az *NRAS státusz* negatívan befolyásolta a túlélést: NRAS mutáció esetén szignifikánsan rövidebb PFS ($p=0,048$) és OS ($p=0,037$) értékeket mutattunk ki.

Egyváltozós modellben Kaplan-Meier görbék **(12. diagram)** statisztikai analízisével mind a PFS, mind a DMFS esetén szignifikanciát észleltünk a sentinel negatív és pozitív

betegcsoportok összehasonlításánál ($p=0,001$, $p=0,004$). A DSS szignifikancia határhoz közeli értéket mutatott ($p=0,052$): az 5 éves DSS túlélési arány SLN negativitás esetén 92,7%, míg pozitív esetben 77,5% volt. A teljes túléléssel nem igazoltunk szignifikáns összefüggést a SLN pozitív és negatív csoportot elemezve. A túlélést a BRAF, NRAS, és kettős vad típusú mutációkkal kapcsolatban vizsgálva, az NRAS mutáció esetén a túlélés rosszabb volt, a kettős vad és BRAF pozitív esetek kedvezőbb prognózisú, hasonló túlélési mintázatot mutattak. Ha a BRAF mutáns és a vad típusú csoportot összevonva vetettük össze a betegek túlélését az NRAS pozitív csoporttal, statisztikailag szignifikáns negatív összefüggést észleltünk mind a PFS ($p=0,047$), mind az OS ($p=0,035$) esetén. A DMFS és DSS nem bizonyult szignifikánsnak. Az 5 éves túlélés az összevont BRAF vad csoportban 82,9%, míg az NRAS pozitív csoportban 63,3% volt.

12. diagram: Kaplan-Meier görbék a sentinel nyirokcsomó pozitivitás és a molekuláris típusok vonatkozásában.



A sentinel nyirokcsomó pozitivitás szignifikáns kapcsolatban volt a progressziómentes (A) és a távoli metasztázismentes túléléssel (B). A mutációs státusz a primer tumorban került analízisre. Mivel a BRAF mutáns és a kettős vad alcsoportok hasonló túlélési mintázatot mutattak ezeket összevontuk statisztikai vizsgálat céljából. Összehasonlítva az NRAS szempontjából vad és az NRAS mutáns csoportot az utóbbinál kevésbé volt kedvező a progressziómentes túlélés (C) azonban a távoli metasztázismentes (D) és a betegség-specifikus (E) túlélés nem különbözött. A teljes túlélés (F) az NRAS mutáns betegeknél szignifikánsan rosszabb kimenetelű volt összehasonlítva a vad típusú NRAS csoporttal. (o: komplett esemény, +: cenzorált esemény).

10. táblázat: Prognosztikai paraméterek Cox egy- és többváltozós analízissel, a különböző túlélési végpontok szerint (PFS: progressziómentes túlélés; DMFS: távoli metasztázismentes túlélés; DSS: betegség-specifikus túlélés, OS: teljes túlélés).

Paraméterek	Egyváltozós analízis		Többváltozós analízis	
	RR (95% CI)	<i>p</i>	RR (95% CI)	<i>p</i>
PFS				
Kor	1,023 (0,996–1,051)	0,089	1,026 (0,995–1,058)	0,098
Nem (férfi vs. nő)	1,084 (0,526–2,232)	0,827	1,259 (0,577–2,743)	0,563
Lokalizáció (végtagok vs. törzs)	0,786 (0,382–1,618)	0,513	1,117 (0,702–1,778)	0,641
Breslow tumorvastagság	1,206 (1,11–1,311)	<10 ⁻³	1,141 (1,018–1,28)	0,024
Exulceráció (nem vs. igen)	2,883 (1,406–5,912)	0,004	1,082 (0,398–2,937)	0,877
Mitosis szám	1,081 (1,035–1,129)	<10 ⁻³	1,058 (0,997–1,123)	0,062
Invázió (nem vs. igen)	2,534 (1,157–5,549)	0,02	1,8 (0,713–4,543)	0,111
TIL (nem vs. igen)	1,018 (0,882–1,175)	0,812	1,07 (0,915–1,251)	0,213
NRAS (vad típus vs. mutáns)	1,479 (1,003–2,18)	0,048	1,887 (1,008–3,53)	0,047
BRAF (vad típus vs. mutáns)	0,577 (0,275–1,214)	0,148	0,719 (0,227–2,277)	0,575
Sentinel státusz (neg. vs. poz.)	3,315 (1,595–6,89)	0,001	3,301 (1,424–7,654)	0,005
DMFS				
Kor	1,04 (1,005–1,075)	0,023	1,047 (1,007–1,087)	0,019
Nem (férfi vs. nő)	1,197 (0,511–2,8)	0,679	1,39 (0,56–3,45)	0,477
Lokalizáció (végtagok vs. törzs)	0,873 (0,377–2,02)	0,75	0,979 (0,555–1,728)	0,942
Breslow tumorvastagság	1,223 (1,12–1,333)	<10 ⁻³	1,178 (1,039–1,336)	0,011
Exulceráció (nem vs. igen)	2,937 (1,268–6,802)	0,012	0,837 (0,236–2,964)	0,782
Mitosis szám	1,089 (1,037–1,423)	<10 ⁻³	1,07 (0,999–1,146)	0,054
Invázió (nem vs. igen)	4,143 (1,765–9,728)	0,001	3,255 (1,09–9,723)	0,034
TIL (nem vs. igen)	0,966 (0,815–1,145)	0,687	1,046 (0,864–1,265)	0,647
NRAS (vad típus vs. mutáns)	1,439 (0,911–2,274)	0,119	2,034 (0,97–4,265)	0,06
BRAF (vad típus vs. mutáns)	0,569 (0,239–1,356)	0,203	0,643 (0,174–2,379)	0,508
Sentinel státusz (neg. vs. poz.)	3,288 (1,404–7,698)	0,006	2,929 (1,087–7,892)	0,034
DSS				
Kor	1,041 (1–1,084)	0,051	1,047 (0,999–1,097)	0,056
Nem (férfi vs. nő)	1,785 (0,62–5,142)	0,283	2,055 (0,629–6,713)	0,233
Lokalizáció (végtagok vs. törzs)	0,802 (0,299–2,154)	0,662	0,789 (0,396–1,571)	0,499
Breslow tumorvastagság	1,283 (1,161–1,418)	<10 ⁻³	1,294 (1,127–1,485)	<10 ⁻³
Exulceráció (nem vs. igen)	3,089 (1,5–8,3)	0,025	0,577 (0,113–2,948)	0,509
Mitosis szám	1,108 (1,051–1,169)	<10 ⁻³	1,089 (1,006–1,177)	0,034
Invázió (nem vs. igen)	4,346 (1,613–11,708)	0,004	3,485 (0,918–13,232)	0,067
TIL (nem vs. igen)	1,032 (0,848–1,256)	0,751	1,086 (0,87–1,357)	0,466

10. táblázat folyt.

NRAS (vad típus vs. mutáns)	1,407 (0,821–2,41)	0,214	1,869 (0,757–4,615)	0,175
BRAF (vad típus vs. mutáns)	0,544 (0,196–1,508)	0,242	0,771 (0,146–4,077)	0,759
Sentinel státusz (neg. vs. poz.)	2,593 (0,942–7,136)	0,065	1,774 (0,538–5,85)	0,346
OS				
Kor	1,061 (1,026–1,097)	<10 ⁻³	1,068 (1,027–1,11)	<10 ⁻³
Nem (férfi vs. nő)	0,741 (0,357–1,536)	0,42	1,17 (0,523–2,614)	0,703
Lokalizáció (végtagok vs. törzs)	0,961 (0,464–1,992)	0,915	0,743 (0,445–1,241)	0,256
Breslow tumorvastagság	1,296 (1,889–1,413)	<10 ⁻³	1,246 (1,112–1,397)	<10 ⁻³
Exulceráció (nem vs. igen)	3,95 (1,865–8,366)	<10 ⁻³	1,558 (0,541–4,482)	0,411
Mitosis szám	1,098 (1,052–1,456)	<10 ⁻³	1,057 (0,995–1,123)	0,07
Invázió (nem vs. igen)	2,165 (0,961–4,875)	0,062	1,399 (0,518–3,782)	0,508
TIL (nem vs. igen)	1,012 (0,875–1,171)	0,87	1,06 (0,905–1,241)	0,472
NRAS (vad típus vs. mutáns)	1,52 (1,026–2,253)	0,037	1,327 (0,704–2,5)	0,382
BRAF (vad típus vs. mutáns)	0,456 (0,212–0,981)	0,045	1,068 (0,336–3,398)	0,911
Sentinel státusz (neg. vs. poz.)	1,72 (0,761–3,89)	0,193	1,594 (0,641–3,962)	0,315

RR: relatív kockázat; PFS: progressziómentes túlélés; DMFS: távoli metasztázismentes túlélés; DSS: betegség-specifikus túlélés; OS: teljes túlélés, TIL: tumort infiltráló limfociták. Vastag betűvel jelöltük a szignifikáns értékeket, $p < 0,05$

Az egyváltozós vizsgálat eredményeivel összehasonlítva az exulceráció, a mitózisszám és a limfovaszkuláris invázió gyengébb prediktív értékűnek bizonyult többváltozós vizsgálattal. (10. táblázat)

A Breslow tumorvastagság **többváltozós analízissel** is a túlélés legerősebb prediktorának bizonyult. Az egyváltozós analízishez hasonlóan a sentinel nyirokcsomó státusz továbbra is prediktív tényező volt a PFS ($p=0,005$) és a DMFS ($p=0,034$) vonatkozásában.

Az NRAS mutáció a PFS szignifikáns negatív prediktora volt többváltozós analízissel is ($p=0,047$) és közel szignifikánsnak találtuk a DMFS értékkel összefüggésben ($p=0,06$). Többváltozós elemzésben a primer tumor BRAF mutációja és a betegség kimenete között nem találtunk statisztikailag igazolható összefüggést.

A betegek életkora független prediktor volt az OS és a DSS vonatkozásában mind egy-, mind többváltozós analízisben.

7 Megbeszélés

2011-ig a metasztatikus melanomában szenvedő betegek számára igen szűk terápiás modalitások, csupán kemoterápia és annak kombinációi voltak elérhetőek világszerte, melyekkel alacsony, mintegy 6-10 hónapos volt a medián túlélés. Az 5 éves túlélés aránya 10%-nál kisebb volt. A melanoma molekuláris patológiai, valamint immunológiai hátterének felismerésével a disszeminált betegség kezelésében is megjelent a túlélést meghosszabbító célzott mono-, majd kombinációs terápia, illetve az immun-checkpoint gátló terápiák és azok kombinációi.

A klinikai vizsgálatok alapján 2011-ben a BRAF-inhibitor vemurafenib került először az FDA által befogadásra BRAF pozitív, irrezekábilis metasztatikus melanomában szenvedő betegeknél, majd 2013-ban a dabrafenib is törzskönyvezésre került.

A dabrafenib a BREAK-2, valamint a BREAK-3 vizsgálatokban bizonyította hatékonyságát.⁵⁷

A vemurafenib I-es fázisú vizsgálatában solid tumor miatt terápiára szoruló betegek kerültek beválasztásra, a dózismeghatározás során 55 beteget randomizáltak, majd a terápia dózismegtartó kohort vizsgálatában 32 beteget vontak a vizsgálatba metasztatikus melanomával. A 32 beteg BRAF mutációt hordozó metasztatikus melanomában szenvedett, és a 2x960 mg-ban alkalmazott BRAF gátló terápia hatékonysága elsőként bizonyította az onkogén MAPK jelátviteli út sikeres blokkolását metasztatikus melanomában. A medián PFS érték magasabb, mint 7 hónapnak bizonyult, 26 betegnél (81%) igazolta hatékonyságát, objektív tumorválasz elérésével a BRAF gátló terápia (2 betegnél CR, 24 betegnél PR).⁷⁹

A fázis II-es (BRIM-2) vizsgálatba 132 korábban terápiában részesült, metasztatikus melanomában szenvedő, BRAF pozitív beteg került bevonásra. A medián követési idő ebben a vizsgálatban 15,9 hónap volt, 53%-ban értek el objektív tumorválaszadási rátát (ORR), a betegek 6%-a komplett remisszióba került. A medián PFS 6,8 hónap, a medián OS 15,9 hónapnak bizonyult. Mellékhatások elsősorban a bőrrel kapcsolatban jelentkeztek, illetve keratoacanthoma, laphámrák megjelenését észlelték az első 8-12 hétben a terápia kezdetétől számítva.⁸⁰ A vemurafenib BRIM-3, 2 karú törzskönyvezési vizsgálata során vemurafenib került dakarbazinnal összehasonlításra, 675 kezeletlen, BRAF mutációt hordozó metasztatikus melanomában szenvedő betegnél. A vemurafenib karon lévő betegeknél szignifikánsabb hosszabb túlélést detektáltak a dakarbazinhoz

képeket (medián PFS 5,3 vs. 1,6 hónap, medián OS 13,2 vs. 9,7 hónap). 48%-os ORR-et értek el vemurafenib terápiával a dakarbazin 5,5%-ához viszonyítva. Mellékhatások tekintetében arthralgia, kiütések, fényérzékenység, fáradtság, viszketés, hyperkeratosis, hasmenés, alopecia jelentkeztek a leggyakrabban. 18%-ban észlelték laphámrák, vagy keratoacanthoma, vagy mindkettő megjelenését. A betegek 38%-ában kellett dózist módosítani a vemurafenib karon.⁵³

A BRIM-3-as vizsgálatban a vemurafenib növelte a progressziómentes túlélést a dakarbazinhoz képest V600E és V600K mutáció jelenléte esetén is.

Első vizsgálatunkban 43 egyedi méltányossági kérelem útján OEP finanszírozott betegünknel a progressziómentes túlélés 6,48 hónapnak, a teljes túlélés 11,47 hónapnak bizonyult, ami megközelíti a BRIM-3 vizsgálat 6,9, illetve 13,6 hónapos eredményeit. A BRIM-3 vizsgálatban 48%, míg saját beteganyagunkban 51,1% objektív tumorválaszt értünk el. Betegség kontrollt 79%-ban értünk el, az 5 beteg esetén elért (11,6%) komplett remisszió a BRIM-2 vizsgálat 6%-os értékét meghaladta.

Betegpopulációnk esetében többedvonalú kezelésekre is sor került, míg a BRIM-3-as klinikai vizsgálatban kezeletlen betegek kerültek randomizálásra. Az általunk tapasztalt 11,6%-os primer rezisztencia a nemzetközi irodalmi adatokhoz hasonlóan jelentkezett, mely alapján a betegek mintegy 10-15%-a nem reagál a kezelésre az intrinsic vagy primer rezisztencia miatt.^{81,82}

A teljes túlélést leginkább meghatározó tényezőnek mind egy-, mind többváltozós analízisben vizsgálatunkban a terápia kezdetekor mért az LDH szint bizonyult. Betegeinknel a vemurafenib terápia mellékhatásai jól tolerálhatóak voltak, mindössze 16%-ban észleltünk Grade 3, terápiával összefüggést mutató mellékhatást. Laphám carcinoma második primer tumorként a klinikai vizsgálatokban leírt 19%-hoz képest csupán 5%-ban jelent meg vizsgálatunkban. Ezek medián megjelenése a terápia kezdetéhez képest a szakirodalmi adatoknak megfelelően 8 hét volt.⁸³ Neutrophil panniculitist egy esetben észleltünk.⁸⁴ Végleges terápiamegszakítást nem kellett alkalmaznunk a betegeknél, dózisredukciót a BRIM-3 törzskönyvezési vizsgálat 38%-ához képest, betegeinknel 30%-ban végeztünk. A vemurafenib terápia időszakos felfüggesztésére az esetek többségében maculo-papulosus kiütés, vagy arthralgia miatt került sor.

Bár a BRAF gátló terápia hatékonynak bizonyult BRAF pozitív, metasztatikus melanoma kezelésében, a körülbelül 6 hónap elteltével kialakuló rezisztencia miatt hosszú távú eredményességet a betegek többségénél nem sikerült elérni. A rezisztencia

kialakulásának mechanizmusa heterogén. Hátterében a MAPK jelátviteli útvonal reaktiválódása áll az esetek többségében, de egyéb jelátviteli utaknak is szerepe van.⁵⁸

A rezisztencia kiküszöbölésére MEK inhibitor terápia került kifejlesztésre (cobimetinib, trametinib), melyek hatására, BRAF inhibitor terápiával együtt alkalmazva a medián teljes túlélés, valamint a progressziómentes túlélés megkétszereződött a BRAF pozitív betegek esetén.

2015 ősze óta váltak elérhetővé a kombinációs (BRAF-MEK gátló) terápiák. 3 különböző BRAF-MEK inhibitor kombináció van jelenleg világszerte: vemurafenib+cobimetinib, dabrafenib+trametinib, encorafenib+binimetinib. Magyarországon az encorafenib+binimetinib nem került forgalmazásra.

Számos klinikai vizsgálat igazolta a kombinációs terápiák hatékonyságát.

A BRIM-7 vizsgálatában vemurafenib+cobimetinib terápiát hasonlították össze vemurafenib monoterápiával. Különböző dózisokban alkalmazva a terápiákat 9,9 hónapos PFS értéket értek el a vemurafenib monoterápiás karjának 6,2 hónapos progressziómentes túlélésével szemben. ORR 68% vs. 45%. Hosszabb, 14,2 hónapos követési időnél a PFS 12,3 hónapnak bizonyult a kombinációs karon (vs. 7,2 hónap). A medián teljes túlélés vemurafenib+cobimetinib kombinációval 22,3 hónap volt (vs. 17,4 hónap). A mellékhatások tekintetében elemezve az adatokat a kombinációs karon gyakrabban észleltek a terápiával összefüggő mellékhatást, így centrális serosus rethinopathiát, hasmenést, májenzim emelkedést, hányingert, fotoszenzitivitást, emelkedett kreatin foszfokináz értékeket. A második cutan malignitás megjelenési gyakorisága viszont (laphám carcinoma, keratoacanthoma) 11%-ról 2%-ra csökkent. Hosszabb követési idővel is publikálásra kerültek a túlélési adatok 2020-ban, a medián OS 31,8 hónap a kombinációs karon, vemurafenib monoterápiával pedig 8,5 hónap volt.^{59,60,85}

A coBRIM klinikai vizsgálat során, amelyben Intézetünk is részt vett, 495 beteget randomizáltak a vemurafenib+cobimetinib és a vemurafenib monoterápia összehasonlítása céljából. A 2014-ben közöltek szerint a medián PFS 9,9 hónap volt szemben a vemurafenib 6,2 hónapos PFS értékével. (*Larkin J.: NEJM. 2014;371(20):1867-1876.*)

Az 5 éves OS 30,8%, az 5 éves PFS 14%-nak bizonyult vemurafenib+cobimetinib terápiával.⁵⁹

Saját vizsgálatunkban vemurafenib+cobimetinib terápiával a szakirodalmi adatokhoz hasonlóan kissé alacsonyabb, de megközelítő túlélési adatokat, 76%-os objektív

tumorválasz mellett 8 hónapos medián progressziómentes túlélést és 18 hónapos medián teljes túlélést értünk el 90%-os betegség kontroll ráta mellett.

A dabrafenib+trametinib kombináció a COMBI-d, COMBI-v fázis 3-as vizsgálatokban bizonyította hatékonyságát. COMBI-d vizsgálatban dabrafenib+trametinib került összehasonlításra dabrafenib+placeboval. A medián PFS tekintetében 11 hónapot (vs. 8,8 hónap), míg a medián OS tekintetében 26,7 hónapot (vs.18,7 hónap) értek el a kombinációs karon. Az 5 éves teljes túlélés 34%-nak bizonyult, míg az 5 éves progressziómentes túlélés 19% volt, a 2019-ben ESMO kongresszuson publikált adatok alapján.⁶¹

Vizsgálatunkban dabrafenib+trametinib csoportban 82%-os objektív tumorválasz, 90%-os betegségkontroll arány mellett, a progressziómentes túlélés 8,2 hónapnak bizonyult, míg a medián teljes túlélés 12 hónapnak. Az alcsoport analízisünk során a cerebrális metasztázis jelenléte mind a teljes ($p<0,0002$), mind a progressziómentes túlélés szignifikáns negatív prediktorának bizonyult ($p<0.0001$). A cerebrális metasztázis mentes alcsoport teljes- és progressziómentes túlélése is szignifikánsan hosszabb túlélést mutatott: medián OS 18,5 hónap (vs. 11 hónap), medián PFS 14 hónap (vs. 7 hónap). A szakirodalmi adatokat összevetve dabrafenib+trametinib terápiában részesült betegeink 13 hónapos medián teljes túlélése a terápia kezdetekor kimutatható, a betegek mintegy 43%-ában jelen lévő, cerebrális manifesztáció negatív hatásával magyarázható.

Az encorafenib+binimetinib klinikai vizsgálata a III-as fázisú COLUMBUS studyban történt, ahol vemurafenib monoterápiával való összehasonlítása során a célzott BRAF-MEK gátló kombinációs terápiák tekintetében a leghosszabb túlélési mutatókat érték el.⁶³ Mellékhatások tekintetében a BRAF-MEK gátló terápiákkal szerzett tapasztalatok alapján az anamnézisben szereplő centralis serosus retinopathia, retina véna okklúzió, valamint csökkent ejekciós frakció, illetve meghosszabbodott QTc szakasz a terápia kontraindikációját képezheti, ezért a kezelések megkezdése előtt ezen rendellenességek kizárása szükséges, a terápia alatt pedig a betegek ezirányú monitorizálása az előírás.

A kombinációs terápiák minden vizsgálatban jól tolerálhatóaknak bizonyultak, kissé különböző mellékhatás spektrum mellett, ennek ismerete alapján, a betegek kísérőbetegségeinek figyelembevételével kiválasztható a beteg számára legelőnyösebb kombinációs kezelés.

A coBRIM vizsgálatban 75% -ban jelentkezett Grade 3-4 fokozatú mellékhatás, melyek leggyakrabban a diarrhoea, maculopapulosus kiütések, fotoszenzitivitás, szérum májenzim, valamint creatin foszfokináz emelkedések voltak. Grade 5 mellékhatás

mindkét karon 2%-ban volt jelent. 19%-ban szorultak terápia felfüggesztésre a betegek, a vemurafenib monoterápiás karhoz képest nagyobb arányban. Retinát érintő Grade 3-4-es mellékhatás mintegy 2%-ban jelentkezett, cutan laphám carcinoma megjelenését pedig 6%-ban írták le. Saját beteganyagunkban 34%-ban tapasztaltunk Grade 3-4 mellékhatást vemurafenib+cobimetinib kombinációval, mely a coBRIM vizsgálat 75%-ához képest jóval alacsonyabb arány. Ezt részben azzal magyarázzuk, hogy ismerve a klinikai vizsgálatok eredményeit, a súlyos tünetek elkerülése végett időben alkalmaztunk prevenciót, felhívtuk a betegek figyelmét a fényvédelem, a kardiológiai és a szemészeti szoros ellenőrzés fontosságára. 42%-ban alkalmaztunk időszakos terápia felfüggesztést. Leggyakrabban májenzim emelkedést, kiütéseket, emelkedett kreatin foszfokináz szintet, fényérzékenységet. Serosus retinopátiát 13%-ban észleltünk, azonban ezek többsége Grade 1-2-es fokozatú volt.

A dabrafenib+trametinib esetén a COMBI-d vizsgálatban 18%-ban a terápia végleges felfüggesztésére szorultak, mely 4%-ban láz miatt, 4%-ban csökkent ejekciós frakció miatt 1%-ban májenzim emelkedés miatt történt. Grade 5 fokozatú mellékhatást nem észleltek. Saját beteganyagunkban leggyakrabban kreatin foszfokináz emelkedést, lázat, emelkedett májenzim értékeket, hasmenést tapasztaltunk a terápiával összefüggő mellékhatásként. A betegek 14%-nál volt jelen Grade 3-4 mellékhatás. 24%-ban alkalmaztunk terápia felfüggesztést és 14%-ban dózismodifikációt. Serosus retinopathia mindössze 3%-ban jelentkezett, ami kedvezőbb mint a vemurafenib+cobimetinib terápia melletti 13%-os előfordulás.

A BRAF-MEK gátló terápia saját vizsgálatunkban is jól tolerálhatónak bizonyult kissé eltérő mellékhatás spektrummal a monoterápiához képest. Vemurafenib+cobimetinib terápia mellett gyakrabban észleltünk kiütést, valamint fényérzékenységet. Dabrafenib+trametinib terápia mellett láz jelentkezett nagyobb gyakorisággal.

A harmadik retrospektív vizsgálatunkban 159 beteg életkorát, nemét, primer tumor lokalizációját, Breslow-értékét, exulcerációját, szövettani típusát, a tumorban észlelt mitózisszámot, limfovaszkuláris és perineurális inváziót, a tumort infiltráló limfociták jelenlétét, regressziós jeleket, valamint a BRAF és NRAS mutációt vetettük össze a sentinel nyirokcsomó státusszal, valamint a különböző túlélési paraméterekkel. A nemzetközi szakirodalmi adatoknak megfelelően a SLN státus bizonyult a melanoma egyik legfontosabb prognosztikai tényezőjének vizsgálatunkban is.

A BRAF, NRAS mutáció prognosztikai értéke ellentmondásos a szakirodalomban. Egyes vizsgálatok BRAF mutáció esetén, IV-es stádiumú melanomában rosszabb prognózisra

utalnak, míg más vizsgálatok szerint nincs szignifikáns különbség a vad, illetve BRAF mutáns betegek túlélésében a mutációt figyelembe véve.²⁷⁻²⁹

59 study pooled analízise során 9243 beteg vizsgálata alapján megállapították, hogy BRAF mutáció jelenléte szignifikánsan korrelál a rosszabb teljes túléléssel.³⁰

Az NRAS mutáció prognosztikai értéke az irodalmi adatok szerint szintén nem teljesen egyértelmű. Egy 217 beteget magába foglaló retrospektív vizsgálat alapján NRAS mutáns daganatok agresszívabb biológiai jellemzővel bírnak a BRAF, illetve a kettős vad típusúhoz képest.³¹⁻³³ Az utóbbi vizsgálat megerősíti eredményeinket, miszerint az NRAS mutáció rosszabb túlélési mutatókat igazolt a BRAF és a kettős vad típusú tumorok betegcsoportjához képest. Mindezek mellett megemlítendő, hogy vizsgálatunkban a BRAF pozitív és a kettős vad mutációt hordozó melanomák túlélési mintázata igen hasonlóknak bizonyult.

Az SLN biopszia státuszát és a primer tumor onkogén mutációjának összefüggését csupán elenyésző számú klinikai vizsgálatban elemezték. Manninen és társai 140 intermediér Breslow tumorvastagságú melanomával operált beteg adatait vizsgálta, akiknél SLN biopszia történt, illetve akiknél nem történt SLN biopszia. A hasonló klinikopatológiai paraméterek alapján (exulceráció, mitózisszám, tumor regresszió) kiválasztott betegek adatait elemezték, BRAF immunhisztokémiai vizsgálat és sejtmotilitás aktin moduláló fehérjék vizsgálatának birtokában. A BRAF mutációt a SLN státusz prediktorának találták. Vizsgálatunk ezt az eredményt nem támasztotta alá, ennek részben az lehet a magyarázata, hogy a BRAF mutáció meghatározását immunhisztokémiaileg végezték, nem történt molekuláris vizsgálat, mint saját tanulmányunkban, valamint a betegbeválasztás kritériumai is különböztek.⁸⁶

Egy másik prospektív kohort vizsgálatban Adler és munkatársai arra következtettek, hogy a BRAF, NRAS mutációt hordozó primer melanomák esetén nagyobb rizikóval számolhatunk a kiújulásra, SLN státusz negativitás esetén is.⁸⁷ Következtetésük alapján az NRAS, BRAF mutáció függvényében szorosabb követés szükséges a mutációt hordozó betegek esetében, negatív SLN esetén is.

Saját munkánkban szintén azt találtuk, hogy a primer tumor NRAS mutációja a túlélés prediktora, ezt BRAF mutáció esetén nem igazoltuk, a BRAF és kettős vad molekuláris típusnál pedig a betegek túlélése közel azonosnak bizonyult. A Breslow tumorvastagság és a SLN státusz, valamint a betegek kora mellett (DMFS esetében a limfovaszkuláris invázió, DSS esetében a mitózisszám is) a primer tumor NRAS mutációja igazolódott a progressziómentes túlélés független prediktorának.

A BRAF pozitív betegek szignifikánsan fiatalabb életkorúak voltak, mint az NRAS, ill. kettős vad molekuláris típusú melanomák esetén; az NRAS mutáns primer melanomák Breslow tumorvastagsága nagyobb volt, mint a BRAF, illetve kettős vad típusú melanomák esetén.

Míg a primer tumor Breslow tumorvastagsága, a lymho- és perivascularis invázió, mitóziszsám, valamint az exulceráció jelenléte a SLN státusszal szignifikáns összefüggést mutatott, addig a primer tumor mutációi és az SLN státusz között nem találtunk statisztikailag igazolható összefüggést.

Érdekes módon, az SLN pozitív betegeknél a primer tumor NRAS mutációja százalékosan kisebb arányban fordult elő, mint a SLN negatív esetekben (6,9% vs. 20,8%). Egy onkogén BRAF, NRAS, c-KIT, MITF mutációkat figyelembe vevő prognosztikai, valamint prediktív faktorokat vizsgáló elemzésben megállapításra került, hogy a nyirokcsomó érintettség BRAF mutáns primer melanomájú betegek esetén gyakoribb, mint az egyéb mutációk esetén. Ez részben megegyezik vizsgálatunk eredményével, miszerint a pozitív SLN esetén alacsonyabb számban igazoltunk NRAS mutációt, mint a BRAF és a kettős vad csoportokban.⁸⁸ Az NRAS mutációt hordozó primer tumoroknál viszont a túlélés szignifikáns összefüggést mutatott a molekuláris háttérrel.

Az alacsony betegszám, valamint a heterogén betegcsoport ellenére is vizsgálatunk Adler és mtsai. által leírtakkal hasonlóan a BRAF és kettős vad tumorokkal összehasonlítva az NRAS mutációt hordozó primer melanomák esetén negatív SLN státusz mellett is rosszabb prognózist észleltünk.

Összefoglalásként megállapíthatjuk, hogy a SLN pozitivitás mellett a betegek életkora, a Breslow tumorvastagság, a limfovaszkuláris invázió és az NRAS mutáció a melanoma kimenetelének független prognosztikai faktorának bizonyult. Vizsgálatunkban az NRAS mutáns alcsoport progressziómentes és távoli metasztázismentes túlélése a kedvezőtlenebb volt, mint a BRAF pozitív és a kettős vad tumoroké. NRAS mutáns melanomákban a sentinel nyirokcsomó pozitivitás ritkább volt, mint a másik két csoportban. Nem igazoltunk szignifikáns összefüggést a primer tumor BRAF státusza és a SLN státusz, valamint a túlélés között.

A kutatás korlátai

Analízisünk retrospektív elemzés eredménye, ami a nem előre tervezett vizsgálatokkal szemben a betegcsoportok heterogén összetételéhez vezethet, limitálva összehasonlíthatóságukat, illetve esetenként az adatok hiányosak lehetnek.

Bár melanómában a leggyakrabban BRAF, NRAS mutáció kerül meghatározásra, ritkábban c-KIT onkogén mutáció vizsgálatára kerül sor jelenleg a klinikumban, ismert, hogy az NF1 (neurofibromin-1) funkcióvesztéses mutáció rosszabb prognózissal jár, a CDKN2A valamint a PTEN tumorszupresszor gének is fontos szerepet játszanak a melanoma kialakulásában, valamint a prognózisban. Mindezek mellett a TERT mutációnak is kiemelt fontossága van, hiszen a melanomás esetek mintegy felében detektálják. Független prognosztikai tényezőként szerepe lehet a melanoma, illetve egyéb tumorok prognózisában.^{89,90} Ezeket a mutációkat nem vizsgáltuk, a mindennapi klinikai gyakorlatban elérhető BRAF és NRAS mutációra fókuszáltunk.

8 Új megállapításaink, következtetéseink

1. Első vizsgálatunkban 43 vemurafenib monoterápiában részesült betegünknel a progresszió-mentes túlélés 6,48 hónapnak, a teljes túlélés 11,47 hónapnak bizonyult, ami megközelíti a BRIM-3 vizsgálat 6,9, illetve 13,6 hónapos eredményeit. Betegpopulációnk esetében azonban többedvonalú kezelésekre is sor került, míg a BRIM-3-as klinikai vizsgálatban kezeletlen betegek kerültek randomizálásra. A teljes túlélést leginkább meghatározó tényezőnek mind egy-, mind többváltozós analízisben a terápia kezdetekor mért LDH szint bizonyult.

Az általunk kimutatott 11,6%-os primer rezisztencia a nemzetközi irodalmi adatokhoz hasonló volt.^{81,82}

Vizsgálatunk „real-life” adatokat elemzett vemurafenib monoterápiában. Bár a monoterápiát a jelenlegi ajánlások BRAF-MEK kombinációra váltották, a gyógyszer hatékonyságának és különösen mellékhatásainak elemzése a további klinikai alkalmazásban jól felhasználható eredményeket adtak.

2. BRAF-MEK kombinációs célzott terápiában részesült betegeinket vizsgálva mindkét BRAF-MEK gátló kombinációs terápiával a teljes, illetve a progressziómentes túlélés további meghosszabbítása érhető el BRAF V600 mutációt hordozó metasztatikus melanoma kezelésében. **A klinikai vizsgálaton kívül mindennapi gyakorlatunkban alkalmazott kombinációval elért eredmények elmaradnak a törzskönyvezéshez vezető tanulmányokétól, ez azonban részben azzal magyarázható, hogy dabrafenib+trametinib terápiánál a betegek 49%-ában a terápia kezdetekor is cerebrális manifesztáció volt.**

A BRAF-MEK gátló kétféle kombinációs terápia mellékhatásprofilja klinikai tapasztalataink alapján is különböző, ami megfelel a nemzetközi irodalmi adatoknak is. Vemurafenib+cobimetinib terápia mellett gyakrabban észleltünk bőrtüneteket, valamint fényérzékenységet. Dabrafenib+trametinib terápia mellett láz jelentkezett nagyobb gyakorisággal. Összefoglalásképpen tanulmányunk eredményei alapján javasolható, hogy az eltérő mellékhatás spektrum miatt a terápia megválasztásánál figyelembe kell venni a betegek bőrtípusát, komorbiditásaikat és aktuális státuszukat is.

3. Harmadik vizsgálatunk eredményeit összegezve megállapítottuk, hogy a szakirodalmi adatoknak megfelelően **a sentinel nyirokcsomó státusz független prediktora a primer tumor Breslow daganatvastagsága volt. A BRAF, ill. NRAS státusz nem függött**

össze az SLNB eredményével, sőt NRAS pozitivitás esetében a sentinel nyirokcsomó pozitivitás százalékosan alacsonyabb volt.

A túlélésben azonban egyéb prognosztikus paraméterek mellett a primer tumor NRAS pozitivitása is független prediktornak bizonyult.

Az egyváltozós vizsgálat eredményeivel összehasonlítva az exulceráció, a mitózisszám és a limfovaszkuláris invázió gyengébb prediktív értékűnek bizonyult többváltozós vizsgálattal. **(9. táblázat)**

A **Breslow** tumorvastagság **többváltozós analízissel is**, az egyváltozós vizsgálathoz hasonlóan a túlélés legerősebb prediktorának bizonyult valamennyi túlélési kategóriánál. Az egyváltozós analízishez hasonlóan **a sentinel nyirokcsomó státusz** továbbra is prediktív tényező volt a **PFS (p=0,005)** és a **DMFS (p=0,034)** vonatkozásában.

Az NRAS mutáció a PFS szignifikáns negatív prediktora volt többváltozós analízissel is (p=0,047) és közel szignifikánsnak találtuk a DMFS értékkel összefüggésben (p=0,06). **A primer tumor BRAF mutációja és a betegség kimenete között nem találtunk statisztikailag igazolható összefüggést.**

9 Irodalomjegyzék

1. Garbe C, Peris K, Hauschild A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2016;63:201-217.
2. Liskay G, Kiss Z, Gyulai R, et al. Changing Trends in Melanoma Incidence and Decreasing Melanoma Mortality in Hungary Between 2011 and 2019: A Nationwide Epidemiological Study. *Front Oncol*. 2020;10:612459.
3. Guy GP, Thomas CC, Thompson T, et al. Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015;64(21):591-596.
4. Magyar Nemzeti Rákregiszter.
5. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures. Published online 2020. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2020/cancer-facts-and-figures-2020.pdf>
6. Narayanan DL, Saladi RN, Fox JL. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int J Dermatol*. 2010;49(9):978-986.
7. Schulman JM, Fisher DE. Indoor ultraviolet tanning and skin cancer: health risks and opportunities. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(2):144-149.
8. Sinha RP, Häder DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. 2002;1(4):225-236.
9. Seebode C, Lehmann J, Emmert S. Photocarcinogenesis and Skin Cancer Prevention Strategies. *Anticancer Res*. 2016;36(3):1371-1378.
10. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2009;20 Suppl 6:vi1-7.
11. Moan J, Grigalavicius M, Baturaite Z, Dahlback A, Juzeniene A. The relationship between UV exposure and incidence of skin cancer. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2015;31(1):26-35.
12. Wu S, Han J, Laden F, Qureshi AA. Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: a cohort study. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2014;23(6):1080-1089.
13. Dennis LK, Vanbeek MJ, Beane Freeman LE, Smith BJ, Dawson DV, Coughlin JA. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol*. 2008;18(8):614-627.

14. Oláh J, Tóth-Molnár E, Kemény L, Csoma Z. Long-term hazards of neonatal blue-light phototherapy. *Br J Dermatol*. 2013;169(2):243-249.
15. Csoma Z, Tóth-Molnár E, Balogh K, et al. Neonatal blue light phototherapy and melanocytic nevi: a twin study. *Pediatrics*. 2011;128(4):e856-864.
16. Soura E, Eliades PJ, Shannon K, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(3):395-407; quiz 408-410.
17. Shannan B, Perego M, Somasundaram R, Herlyn M. Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treat Res*. 2016;167:1-15.
18. Robles-Espinoza CD, Roberts ND, Chen S, et al. Germline MC1R status influences somatic mutation burden in melanoma. *Nat Commun*. 2016;7:12064.
19. Schierbeck J, Vestergaard T, Bygum A. Skin Cancer Associated Genodermatoses: A Literature Review. *Acta Derm Venereol*. 2019;99(4):360-369.
20. Tóth V, Hatvani Z, Somlai B, Hársing J, László JF, Kárpáti S. Risk of subsequent primary tumor development in melanoma patients. *Pathol Oncol Res POR*. 2013;19(4):805-810.
21. Fattouh K, Ducroux E, Decullier E, et al. Increasing incidence of melanoma after solid organ transplantation: a retrospective epidemiological study. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. 2017;30(11):1172-1180.
22. Hussein MR. Extracutaneous malignant melanomas. *Cancer Invest*. 2008;26(5):516-534.
23. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6(4):313-319.
24. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855-867.
25. Loo E, Khalili P, Beuhler K, Siddiqi I, Vasef MA. BRAF V600E Mutation Across Multiple Tumor Types: Correlation Between DNA-based Sequencing and Mutation-specific Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. 2018;26(10):709-713.
26. Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*. 2012;10:85.
27. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29(10):1239-1246.

28. Ekedahl H, Cirenajwis H, Harbst K, et al. The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br J Dermatol*. 2013;169(5):1049-1055.
29. Carlino MS, Haydu LE, Kakavand H, et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2014;111(2):292-299.
30. Ny L, Hernberg M, Nyakas M, et al. BRAF mutational status as a prognostic marker for survival in malignant melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol Stockh Swed*. 2020;59(7):833-844.
31. Akslen LA, Angelini S, Straume O, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol*. 2005;125(2):312-317.
32. Ellerhorst JA, Greene VR, Ekmekcioglu S, et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17(2):229-235.
33. Heppt MV, Siepmann T, Engel J, et al. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer*. 2017;17(1):536.
34. Gutiérrez-Castañeda LD, Gamboa M, Nova JA, Pulido L, Tovar-Parra JD. Mutations in the BRAF, NRAS, and C-KIT Genes of Patients Diagnosed with Melanoma in Colombia Population. *BioMed Res Int*. 2020;2020:2046947.
35. Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, Chandra S. Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer*. 2018;124(17):3490-3499.
36. Amann VC, Ramelyte E, Thurneysen S, et al. Developments in targeted therapy in melanoma. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol*. 2017;43(3):581-593.
37. Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun*. 2009;9:3.
38. Blank C, Gajewski TF, Mackensen A. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother CII*. 2005;54(4):307-314.
39. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23-34.

40. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(5):1225-1231.
41. Ascierto PA, Dummer R. Immunological effects of BRAF+MEK inhibition. *Oncoimmunology.* 2018;7(9):e1468955.
42. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* Eight edition. Wiley-Blackwell; 2017.
43. Swetter SM, Thompson JA, Albertini MR, et al. NCCN Guidelines® Insights: Melanoma: Cutaneous, Version 2.2021. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN.* 2021;19(4):364-376.
44. Medina BD, Choi BH, Rodogiannis KG, et al. Metastasectomy for melanoma is associated with improved overall survival in responders to targeted molecular or immunotherapy. *J Surg Oncol.* 2020;122(3):555-561.
45. Elias ML, Behbahani S, Maddukuri S, John AM, Schwartz RA, Lambert WC. Prolonged overall survival following metastasectomy in stage IV melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2019;33(9):1719-1725.
46. Bello DM, Faries MB. The Landmark Series: MSLT-1, MSLT-2 and DeCOG (Management of Lymph Nodes). *Ann Surg Oncol.* 2020;27(1):15-21.
47. Gonzalez A. Sentinel Lymph Node Biopsy: Past and Present Implications for the Management of Cutaneous Melanoma with Nodal Metastasis. *Am J Clin Dermatol.* 2018;19(Suppl 1):24-30. doi:10.1007/s40257-018-0379-0
48. Liskay G, Mátrai Z, Czirbesz K, Jani N, Bencze E, Kenessey I. Predictive and Prognostic Value of BRAF and NRAS Mutation of 159 Sentinel Lymph Node Cases in Melanoma-A Retrospective Single-Institute Study. *Cancers.* 2021;13(13):3302.
49. Liskay G, Péley G, Sinkovics I, et al. Clinical significance of sentinel lymph node involvement in malignant melanoma. *Pathol Oncol Res POR.* 2003;9(3):184-187.
50. Shi W. Role for radiation therapy in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015;24(2):323-335.
51. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med.* 2004;351(10):998-1012.
52. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(8):711-723.

53. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-2516.
54. Lee SM, Betticher DC, Thatcher N. Melanoma: chemotherapy. *Br Med Bull*. 1995;51(3):609-630.
55. Imrédi E, Plótár V, Szavcsur P, et al. [Treatment of metastatic progression following the synchronous occurrence of cutaneous and ocular primary melanomas]. *Orv Hetil*. 2018;159(16):642-647.
56. Rashid OM, Sloot S, Zager JS. Regional therapy in metastatic melanoma: an update on minimally invasive intraarterial isolated limb infusion and percutaneous hepatic perfusion. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(10):1355-1364.
57. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2012;380(9839):358-365.
58. Manzano JL, Layos L, Bugés C, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med*. 2016;4(12):237.
59. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, 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.
60. Lewis KD, Larkin J, Ribas A, et al. Impact of depth of response on survival in patients treated with cobimetinib ± vemurafenib: pooled analysis of BRIM-2, BRIM-3, BRIM-7 and coBRIM. *Br J Cancer*. 2019;121(7):522-528.
61. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(7):626-636.
62. Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D, et al. Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Ann Oncol*. 2017;28(7):1631-1639.
63. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF-mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(5):603-615.
64. Heinzerling L, Eigentler TK, Fluck M, et al. Tolerability of BRAF/MEK inhibitor combinations: adverse event evaluation and management. *ESMO Open*. 2019;4(3):e000491.

65. Ascierto PA, Del Vecchio M, Mackiewicz A, et al. Overall survival at 5 years of follow-up in a phase III trial comparing ipilimumab 10 mg/kg with 3 mg/kg in patients with advanced melanoma. *J Immunother Cancer*. 2020;8(1):e000391.
66. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Five-Year Outcomes With Nivolumab in Patients With Wild-Type BRAF Advanced Melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2020;38(33):3937-3946.
67. Robert C, Schachter J, Long GV, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2521-2532.
68. Robert C, Ribas A, Schachter J, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2019;20(9):1239-1251.
69. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019;30(4):582-588.
70. Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(11):1480-1492.
71. Gutzmer R, Stroyakovskiy D, Gogas H, et al. Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAFV600 mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2020;395(10240):1835-1844.
72. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. 2009;45(2):228-247.
73. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). :196.
74. Curry JL, Torres-Cabala CA, Tetzlaff MT, Bowman C, Prieto VG. Molecular platforms utilized to detect BRAF V600E mutation in melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 2012;31(4):267-273.
75. Janku F, Claes B, Huang HJ, et al. BRAF mutation testing with a rapid, fully integrated molecular diagnostics system. *Oncotarget*. 2015;6(29):26886-26894.
76. Vaz-Carneiro A, Luz R, Borges M, Costa J. [Primary and secondary outcomes in oncology clinical trials: definitions and uses]. *Acta Med Port*. 2014;27(4):498-502.

77. Liszkay G, Orosz Z, Péley G, et al. Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2005;15(6):509-513.
78. Smoller BR. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Melanoma of the Skin. Published online June 29, 2017. <https://documents.cap.org/protocols/cp-skin-melanoma-17protocol-4010.pdf>
79. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(9):809-819.
80. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 2012;366(8):707-714.
81. Asić K. Dominant mechanisms of primary resistance differ from dominant mechanisms of secondary resistance to targeted therapies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:178-196.
82. Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013;31(14):1767-1774.
83. Rinderknecht JD, Goldinger SM, Rozati S, et al. RASopathia Skin Eruptions during Vemurafenib Therapy. *PLoS ONE.* 2013;8(3):e58721.
84. Zimmer L, Livingstone E, Hillen U, Dömkes S, Becker A, Schadendorf D. Panniculitis With Arthralgia in Patients With Melanoma Treated With Selective BRAF Inhibitors and Its Management. *Arch Dermatol.* 2012;148(3):357-361.
85. Ribas A, Daud A, Pavlick AC, et al. Extended 5-Year Follow-up Results of a Phase Ib Study (BRIM7) of Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutant Melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2020;26(1):46-53.
86. Manninen AA, Gardberg M, Juteau S, et al. BRAF immunohistochemistry predicts sentinel lymph node involvement in intermediate thickness melanomas. *PLoS One.* 2019;14(4):e0216043.
87. Adler NR, Wolfe R, McArthur GA, et al. Tumour mutation status and melanoma recurrence following a negative sentinel lymph node biopsy. *Br J Cancer.* 2018;118(10):1289-1295.
88. Pracht M, Mogha A, Lespagnol A, et al. Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2015;29(8):1530-1538.
89. Leonardi GC, Candido S, Falzone L, Spandidos DA, Libra M. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). *Int J Oncol.* 2020;57(3):609-618.

90. Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(9):dju246.

10 Köszönetnyilvánítás

Köszönetem és hálám szeretném kifejezni témavezetőmnek, Liszkay Gabriella Professzor Asszonynak, aki mellett tapasztalatot szerezhettem a melanómában szenvedő betegek korszerű terápiás ellátásában, valamint részt vehettem a gyógyszerfejlesztési klinikai vizsgálatokban, ezáltal korai tapasztalatot szerezve a metasztatikus melanoma ellátásában újonnan megjelenő terápiákkal. Köszönöm, hogy lehetővé tette, valamint mindvégig segített az Országos Onkológiai Intézet Onkodermatológiai osztályának beteganyagán végzett vizsgálatokban, ösztönzött és biztatott a munka elvégzésében, és a kapcsolódó cikkek publikálásában.

Köszönettel tartozom Polgár Csaba Professzor Úrnak, hogy lehetőséget adott az általa vezetett Intézetben vizsgálataink megvalósulásához.

Köszönöm Kásler Miklós Miniszter Úrnak a támogatást és lehetőséget, hogy az Országos Onkológiai Intézet tudományos munkájához csatlakozhattam.

Köszönettel tartozom Balatoni Tímea Főorvosnőnek, hogy mindvégig motivált és bátran fordulhattam hozzá szakmai tanácsokért.

Köszönöm Fröhlich GeorGINának, hogy bármikor számíthattam rá a statisztikai vizsgálatok elvégzésében és kiértékelésében. Köszönettel tartozom továbbá a statisztikai elemzések elvégzésében Dr. Kenessey Istvánnak, valamint a Budapesti Műszaki Egyetem docensének, Antal Péternek, valamint Gézsi Andrásnak.

Hálásan köszönöm Horváth Anikónak a kézirat szerkesztésében végzett pontos és lelkiismeretes munkáját.

Köszönettel tartozom az Országos Onkológiai Intézet Onkodermatológiai Osztályán, valamint Onkodermatológiai szakambulanciáján dolgozó kollégáimnak, hogy önzetlenül segítettek Ph.D. dolgozatom létrejöttében, barátságukkal és munkájukkal egyaránt támogattak.

Köszönettel tartozom a PTE ÁOK Doktori Iskola vezetőjének, Bogár Lajos professzor úrnak és programvezetőmnek, Kiss István professzor úrnak munkám befogadásáért, Kis-Gadóné Wenczler Mária Ph.D. irodavezető asszonynak számos segítségéért.

Hálával tartozom Plótár Vanda tanárnőnek, valamint Tóth Erika tanárnőnek a molekuláris patológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Köszönöm előbírálóimnak és opponenseimnek, hogy vállalták dolgozatom értékelését.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom Kisfiamnak, Beninek, Szüleimnek, Bátyámnak és Barátaimnak, akik mindvégig mellettem álltak és bíztattak.

11 Publikációk jegyzéke

11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- [1] **Czirbesz K**, Gorka E, Balatoni T, et al. Efficacy of Vemurafenib Treatment in 43 Metastatic Melanoma Patients with BRAF Mutation. Single-Institute Retrospective Analysis, Early Real-Life Survival Data. *Pathol Oncol Res.* 2019;25(1):45-50.
IF: 2,826
- [2] Liskay G, Mátrai Z, **Czirbesz K**, Jani N, Bencze E, Kenessey I.: Predictive and Prognostic Value of BRAF and NRAS Mutation of 159 Sentinel Lymph Node Cases in Melanoma-A Retrospective Single-Institute Study. *Cancers (Basel).* 2021;13(13):3302. **IF: 6,639**
- [3] Gorka E, Fabó D, Gézsi A, **Czirbesz K**, Fedorcsák I, Liskay G.: Dabrafenib Therapy in 30 Patients with Melanoma Metastatic to the Brain: a Single-centre Controlled Retrospective Study in Hungary. *Pathol Oncol Res.* 2018;24(2):401-406.
IF: 2,433

11.2 Egyéb közlemények

- [1] Balatoni T, Ladányi A, Fröhlich G, **Czirbesz K**, Kovács P, Pánczél G, Bence E, Plótár V, Liskay G: Biomarkers associated with clinical outcome of advanced melanoma patients treated with ipilimumab. *Pathol Oncol Res.* 2020; 26:317-325.
IF: 3,201
- [2] Kotlan B, Horvath S, Eles K, Plotar V, Naszados Gy, **Czirbesz K**, Blank M, Farkas E, Toth L., Tovari J et al. Tumor-Associated Disialylated Glycosphingolipid Antigen-Revealing Antibodies Found in Melanoma Patients' Immunoglobulin Repertoire Suggest a Two-Direction Regulation Mechanism Between Immune B Cells and the Tumor. *Front Immunol.* 2019;10:650.
IF: 5,085
- [3] Gorka E, Gézsi A, **Czirbesz K**, Liskay G.: Single Center Retrospective Comparison of the Targeted Combination Therapies in Melanoma Patients. *ELYNS JOURNAL OF CANCER RESEARCH* 2017; 2:107-110.
- [4] Gorka E, **Czirbesz K**, Gézsi A, Liskay G.: Vemurafenib-cobimetinib kombinációs terápia és saját kezdeti tapasztalataink melanoma kezelésében. *Borgyogy Vener Szle* 2017; 93:168-171.
- [5] Kovács P, Pánczél G, Melegh K, Balatoni T, Pörnczy E, Lőrincz L, **Czirbesz K**, Gorka E, Liskay G.: Immunoterápiák pszichológiai vonatkozásai a melanoma komplex és multidiszciplináris kezelésében. *Magy Onkol.* 2016;60(1):22-27.

- [6] Gorka E, Fabó D, Gézsi A, **Czirbesz K**, Liskay G. Distance from Primary Tumor Is the Strongest Predictor for Early Onset of Brain Metastases in Melanoma. *Anticancer Res.* 2016;36(6):3065-3069.
IF: 1,937
- [7] Kovács P, Pánczél G, Balatoni T, Pörnczy E, Lőrincz L, **Czirbesz K**, Gorka E, Melegh K, Liskay G: A melanoma immunterápiájának pszichológiai aspektusai. *Onkológia (az ONCOLOGY magyar kiadása)* 2015;5,93-97.
- [8] Kovács P, Pánczél G, Balatoni T, Pörnczy E, Lőrincz L, **Czirbesz K**, Gorka E, Melegh K, Liskay G.: A melanoma immunterápiájának pszichológiai aspektusai. *ONKOLÓGIA (AZ ONCOLOGY MAGYAR KIADÁSA)* 2015; 2:93-97.
- [9] Borbola K, **Czirbesz K**, Liskay G.: Cutan planocellularis carcinoma Erbitux kezelése. *ONKOLÓGIA (AZ ONCOLOGY MAGYAR KIADÁSA)* 2012; 2:165-167.

11.3 Idézhető elsőszerzős absztraktok

- [1] **Czirbesz K**, Balatoni T, Baranyai F, Pánczél G, Kispál M, Danyi T, Fröhlich G, Liskay G.: BRAF-MEK gátló terápiaik mellékhatásainak összehasonlítása 118 metasztatikus melanomában szenvedő betegnél az Országos Onkológiai Intézetben. *Borgyogy Vener Szle* 2020; 96:286-286.
- [2] **Czirbesz K**, Baranyai F, Imrédi E, Pánczél G, Balatoni T, Kispál M, Danyi T, Fröhlich G, Liskay G.: BRAF-MEK gátló terápiával elért eredményeink 118 metasztatikus melanomában szenvedő betegnél az Országos Onkológiai Intézetben : retrospektív analízis. *Borgyogy Vener Szle.* 2019; 95: 251-251.
- [3] **Czirbesz K**, Baranyai F, Imrédi E, Kispál M, Pánczél G, Danyi T, Vízkeleti J, Fröhlich G, Balatoni T, Liskay G.: BRAF-MEK gátló terápiával elért eredményeink 118 metasztatikus melanomában szenvedő betegnél az Országos Onkológiai Intézetben. Retrospektív analízis. *Magy Onkol.* 2019; 63: 1.Supp.:18-18.
- [4] **Czirbesz K**, Geszti F, Gorka E, Pánczél G, Balatoni T, Imrédi E, Kovács P, Melegh K, Kenessey I, Liskay G.: 49 metasztatikus melanomában szenvedő beteg PD-1 gátló terápiája az Országos Onkológiai Intézetben. *Borgyogy Vener Szle* 2017, 93:258-258.
- [5] **Czirbesz K**, Gorka E, Pánczél G, Liskay G.: Zelboraf terápiával elért eredményeink 43 metasztatikus melanomában szenvedő betegnél az Országos Onkológiai Intézetben, hosszabb követési idővel. Retrospektív analízis. *Magy Onkol.* 2017;61:Suppl.1. pp. 13-13.
- [6] **Czirbesz K**, Gorka E, Panczel G, Melegh K, Kovacs P, Gezsi A, Liskay G.:Efficacy of vemurafenib treatment in 43 metastatic melanoma patient with BRAF mutation. Single-institute retrospective analysis, early real-life survival data with 15.9 months follow up time. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31: 61-61.
- [7] **Czirbesz K**, Gorka E, Melegh K, Imrédi E, Pánczél G, Balatoni T, Liskay G, Gézsi A.: Zelboraf terápiával elért eredményeink 43 metastaticus

- melanomában szenvedő betegnél az Országos Onkológiai Intézetben, hosszabb követési idővel. Retrospekív analízis. *Borgyogy Vener Szle*. 2016;92: 266-266.
- [8] **Czirbesz K**, Gorka E, Melegh K, Pörneczy E, Horváthy-Kovács A, Antal P, Gézsi A, Liskay G.: Zelboraf terápiával elért eredményeink metastaticus melanoma kezelésében. *Magy Onkol*. 2015; 59 1. Suppl.: 11-12.
- [9] **Czirbesz K**, Gorka E, Horváthy-Kovács A, Pörneczy E, Melegh K, Pánczél G, Kovács P, Liskay G.: Cutan agniosarcoma. Esetbemutatás (poszter). *Borgyogy Vener Szle*. 2015; 91:239-239.
- [10] **Czirbesz K**, Gorka E, Kovács F, Pörneczy E, Melegh K, Hetesi K, Antal P, Liskay G.: Clinical report of Sentinel-Node Biopsy in 850 Melanoma Patient: A 5-Year Follow-up study. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014, 27: 1183-1183.
- [11] **Czirbesz K**, Liskay G, Gorka E, Melegh K, Pörneczy E, Antal P.: Vemurafenib kezelés klinikai tapasztalatai melanoma malignumban. *Borgyogy Vener Szle* 2014; 90: 244-244.
- [12] **Czirbesz K**, Gorka E, Kovács F, Antal P, Borbola K, Liskay G.: Melanoma malignumban végzett sentinel nyirokcsomó-biopszia klinikai tapasztalatai 850 beteg adatai alapján az Országos Onkológiai Intézetben. Követéses vizsgálat. *Magy Onkol*. 2013; 57: suppl.1.17-17.
- [13] **Czirbesz K**, Plótár V, Serester O, Liskay G.: BRAF V600 mutation in malignant melanoma. *J Dtsch Dermatol Ges* 2013; 11: suppl.7. 44.
- [14] **Czirbesz K**, Gorka E, Kovács F, Antal P, Borbola K, Liskay G.: Melanoma malignumban végzett sentinel nyirokcsomó-biopszia klinikai tapasztalatai 850 beteg adatai alapján az Országos Onkológiai Intézetben. Követéses vizsgálat. *Borgyogy Vener Szle* 2013; 89:156.
- [15] **Czirbesz K**, Borbola K, Pánczél G, Gorka E, Liskay G.: Uvealis melanoma malignum, ductalis emlő carcinoma és pulmonalis adenocarcinoma együttes előfordulása. *Borgyogy Vener Szle* 2012; 88:189.
- [16] **Czirbesz K**, Balatoni T, Liskay G.: A psoriasis vulgaris kezelésének késői mellékhatásaként kialakult bőrtumороk. *Borgyogy Vener Szle* 2011; 87:198.

Efficacy of Vemurafenib Treatment in 43 Metastatic Melanoma Patients with BRAF Mutation. Single-Institute Retrospective Analysis, Early Real-Life Survival Data

Kata Czirbesz¹  · Eszter Gorka¹ · Tímea Balatoni¹ · Gitta Pánczél¹ · Krisztina Melegh¹ · Péter Kovács¹ · András Gézsi² · Gabriella Liskay¹

Received: 1 March 2017 / Accepted: 21 September 2017 / Published online: 29 September 2017
© Arányi Lajos Foundation 2017

Abstract BRAF inhibitor vemurafenib achieved improved overall survival over chemotherapy and have been approved by the FDA and EMA for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. The aim of our retrospective analysis was to determine the efficacy and safety of vemurafenib therapy for BRAF mutated metastatic melanoma and subsequently to prove the clinical benefit for the studied 43 patients, based on real-life data. From November 2012 to October 2015 we have selected 43 BRAF mutated, metastatic melanoma patients, treated with vemurafenib. The median follow-up time was 15.9 months. We evaluated progression free survival (PFS), overall survival (OS) and toxicities. According to the AJCC staging system 70% of the patients had stage M1c metastasis, including 6 with stable brain metastasis. Objective responses were noted in 51.1%, the disease control rate was achieved in 79% of the patients. Complete responses were attained by 5 patients (11.6%). Median PFS was 6.48 (95% CI:4.8–15.0) months, median OS was 11.47 (95% CI:8.08–NA) months. We found significant association between LDH level and OS in univariate ($p = 0.000613$) and multivariate analysis ($p = 0.0168$). The most common adverse events (AEs) included follicular hyperkeratosis, rash, arthralgia and photosensitivity. Grade 3 AEs, such as cutaneous squamous-cell carcinoma, QTcB interval prolongation, rash, arthralgia were reported in 7 patients (17%). We had no Grade 4 side effects. Similar to the previously published data our analysis confirms the improved

survival with vemurafenib treatment (11.47 months) in patients with BRAF V600 mutation. Vemurafenib therapy was well tolerated, the AE profile was almost consistent with the previously reported data of randomised clinical trials.

Keywords Vemurafenib · Melanoma · LDH level · Targeted therapy · Treatment · Survival

Introduction

Cutaneous melanoma is the most aggressive form of all skin cancers. The incidence and mortality rate has been increasing over the past four decades. Despite being a rare form of all skin cancers, it accounts for nearly 75% of skin cancer deaths [1]. In 2014 more than 2000 new cases of melanoma were diagnosed in Hungary alone. Until 2011 metastatic melanoma had no accepted effective therapy, the treatment options as chemotherapies displayed a very low level of efficacy. The prognosis of metastatic melanoma patients was poor, with a median survival of 6–10 months, the five-year survival rates were estimated to be less than 5% [2]. In 2011 the treatment landscape has changed with the approval of two new treatment options involving immunotherapy [3] and targeted agents, which have demonstrated a significantly higher survival benefit for metastatic melanoma patients. Vemurafenib is the first selective small molecule inhibitor of mutated BRAF. Approximately 40 to 60% of cutaneous melanoma carry mutations in BRAF leading to constitutive activation of downstream signalling through the MAP kinase/ERK-signalling pathway, responsible for transferring signals for cell growth from the cell surface to the nucleus [4].

Vemurafenib achieved improved overall survival over chemotherapy and have been approved by the FDA in August of 2011 and EMA in February of 2012 for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma, demonstrating the a

✉ Kata Czirbesz
czirbikatu@gmail.com

¹ Department of Dermatooncology, National Institute of Oncology, H-1122, Ráth György utca 7-9, Budapest, Hungary

² Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, H-1089, Nagyvárud tér 4, Budapest, Hungary

median progression-free survival of 6 to 8 months [5]. The aim of our retrospective study was to determine the progression free survival, overall survival and safety of vemurafenib therapy for BRAF mutated metastatic melanoma and subsequently to prove the clinical benefit for the studied 43 patients, based on real-life data in a single institute analysis.

Material and Methods

Patients and Treatment

From November 2012 to October 2015 we have selected a number of 43 BRAF mutated, metastatic melanoma patients, treated with vemurafenib. Patients were at least 18 years of age and all of them had unresectable stage IIIC or stage IV (M1a, M1b or M1c disease) melanoma with measurable lesions according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST), version 1.1 [6]. In baseline characteristics the following parameters were registered: gender, age, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status, mean Breslow tumor thickness, exulceration, melanoma metastasis stage (M1a, M1b, M1c), lactate dehydrogenase (LDH) level at enrollment (normal or elevated), treatment lines (first, second, third, fourth), genotype of the BRAF mutation status (V600E, V600 K, undefined). Patients with brain metastasis were included in case of stable disease. The baseline characteristics of the patients are shown in Table 1.

Cobas 4800 V600 mutation test, which is for the assessment of the BRAF mutation status from DNA isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue was used to identify BRAF^{V600} mutation status. The Cobas test was designed to detect the predominant BRAF^{V600E} mutation with high sensitivity and was performed at the Department of Pathology at the National Institute of Oncology. Study patients were stratified based on the American Joint Committee on Cancer stage (IIIC, M1a, M1b or M1c), ECOG performance status. All patients received continuous vemurafenib therapy according to the approved prescribing information (at a dose of 960 mg twice daily orally) unless unacceptable side effects or disease progression occurred. Safety evaluations were conducted every 4 weeks, including physical examination, electrocardiography, dermatologic evaluation and laboratory tests, that included complete blood count, chemical testing and urine analyses. The patients were monitored for adverse events at each visit and the National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 4.03 were used for all grading.

Dose reductions/interruption were determined for intolerable Grade 2 toxic effects or worse. When toxicity that resulted in a dose reduction improved to Grade 1 or less, the dose was restarted at 720 mg after a second presence of the toxic effects at 480 mg twice daily. Cutaneous squamous-cell carcinoma did

Table 1 Patients characteristics

Patients characteristics	
Age, Years	57 (27–77)
Sex	
Women	22 (48.8%)
Men	21 (51.2%)
Breslow mean tumor thickness (mm)	4.9 (1–15)
Exulceration	19 (59.4%)
ECOG performance status	
0	21 (49%)
1	18 (42%)
2	4 (9%)
Metastatic status	
Unresectable stage IIIC	5 (11%)
M1a	3 (7%)
M1b	5 (12%)
M1c	30 (70%)
Normal lactate dehydrogenase level at enrolment	21 (49%)
Treatment lines	
First	12 (27.9%)
Second	19 (44.2%)
Third	8 (18.6%)
Fourth or more	4 (9.3%)
History of brain metastasis	6 (13.9%)
BRAF mutation subtype	
V600E	39 (90.6%)
V600 K	2 (4.7%)
Not specified	2 (4.7%)

not require dose modification. At baseline, patients underwent computed tomography and magnetic resonance imaging of the brain. We conducted tumor assessment according to RECIST, version 1.1, at baseline, at weeks 9, and every 12 weeks thereafter until tumor progression, death or intolerable toxicities.

Statistical Analysis

We evaluated median progression free-survival (PFS) and median overall survival (OS) as multiple endpoints by using the Kaplan-Meier method. Overall survival was defined as the time beginning from starting the therapy until melanoma specific death. The effect of factors such as age, gender, Clark invasion level, Breslow tumor thickness, exulceration, lactate dehydrogenase level at the beginning of the therapy, on overall survival was determined by univariate and multivariate Cox regression analyses. The significance of the models was evaluated by the log-rank test and results with two-sided *P*-values <0.05 were considered significant. All analysis was performed in R statistical software (R Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria; version 3.0.3.) using the survival package in R.

Results

A total of 43 metastatic melanoma patients received vemurafenib. The median follow-up time was 15.9 months. The study included 22 women (51.2%), 21 men (48.8%), the

mean age was 57 years (range: 27–77). We found an ECOG 0–1 performance status in 91% of the patients. According to the AJCC staging system 70% of the patients had stage M1c status, including 6 patients with a history of stable brain metastasis. LDH blood level was 49% < ULN. 72.1% of the patients received vemurafenib therapy in second or third line. Out of these patients 39 had V600E, 2 of them had V600 K BRAF mutation genotype, while 2 patients' mutation was undefined.

22 (51.1%) patients had a confirmed objective response. Complete response was achieved in 5 patients (11.6%) and 17 (39.5%) patients achieved a partial response. Stable disease was seen in 27.9% of patients. We experienced primary resistance in 5 patients (11.6%). Median PFS was 6.48 (95% CI: 4.8–15.0) months (Fig. 1), median OS was 11.47 (95% CI: 8.08–NA) months (Fig. 2). We observed a non-significant difference in median PFS between the V600E and the V600 K mutation subtype groups (6.7 months versus 1.8 months) and in median OS between the V600E and the V600 K mutation groups (12.3 versus 8 months). 46.51% of the patients are still alive, the longest period of administering vemurafenib has been 26 months in this population. Analysing our subgroup with cerebral metastasis, 50% objective responses were observed; complete response was achieved in 1 patient (16.6%), partial response in 2 patients (33.3%) with vemurafenib treatment. 3 patients had progressive disease (50%). Median PFS was 4.5 months, median OS was 6.8 months in the group of patients with cerebral metastasis. We found significant association between LDH level at enrolment and OS, as the strongest predictive factor, both in univariate (HR:4.89, CI: 1.97–12.13, $p = 0.000613$) and multivariate analysis (HR:4.65, CI: 1.32–16.38, $p = 0.0168$).

The most common adverse events (AEs) included follicular hyperkeratosis, maculo-papular rash, arthralgia and photosensitivity. Grade 3 AEs, such as cutaneous squamous-cell carcinoma, QTcB interval prolongation, rash and arthralgia were reported in 7 patients (17%). We found no Grade 4 side effects

and in our population there were no patients with assigned to vemurafenib developed second primary melanoma. Most of the toxic effects were related to the skin (52%) as vemurafenib associated skin manifestations: follicular hyperkeratosis, maculo-papular rash, photosensitivity, alopecia, verruca vulgaris, keratoachantoma, pruritus, palmo-plantar hyperkeratosis, squamous cell carcinoma. 1 patient had serum bilirubin level elevation. Table 2.

Development of keratoachantoma or cutaneous squamous cell carcinoma was detected in 5 patients (12%). Median development of the first keratoachantoma or squamous cell carcinoma was 8 weeks (range: 7 to 32 weeks). Out of the 5 patients 1 patient had cutaneous squamous cell carcinoma KA mixed type. 2 patients (5%) experienced herpes zoster in this population and in case of both patients the infection developed after 6 month of treatment. After 1 month of vemurafenib treatment 1 patient developed 1 to 2 cm, subcutaneous, painful nodules, located dominantly in the under extremities. After the excision of one of these nodules the histopathology showed vemurafenib associated neutrophilic panniculitis. In this population we had no cases of permanent treatment discontinuation. Dose-reduction was required in 13 patients (30%). 13 patients' treatment was discontinued because of adverse events and after their resolution these patients were able to continue vemurafenib. In 8 patients a level 1 (75%) dose modification, in 5 patients a level 2 (50%) dose modification was required. The most common reasons for treatment discontinuation were maculopapular rash and arthralgia.

Discussion

Up to 2011 metastatic melanoma patients' treatment options were limited. Since the discovery of the metastatic melanoma molecular pathway mechanisms and the mutations concerning BRAF, poor prognosis patients have numerous promising

Fig. 1 Kaplan-Meier curve of progression-free survival in all patients. Median Progression-free survival, 6.48 months (95% CI:4.8–15.0)

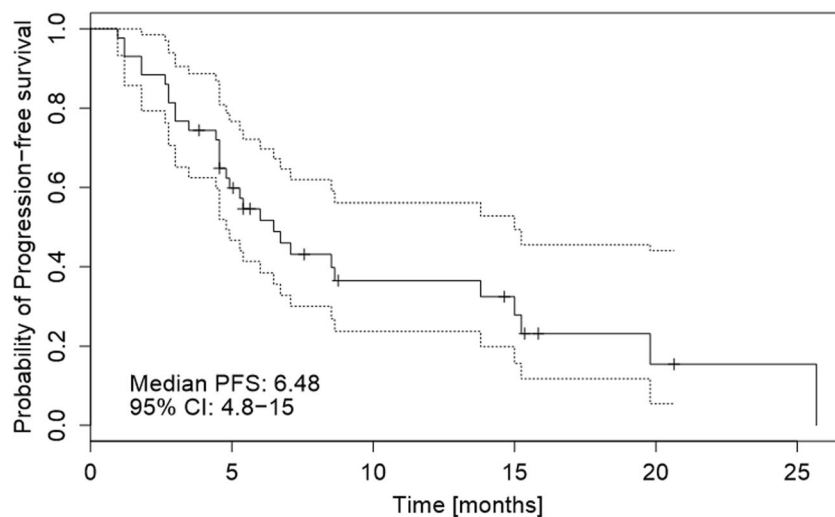
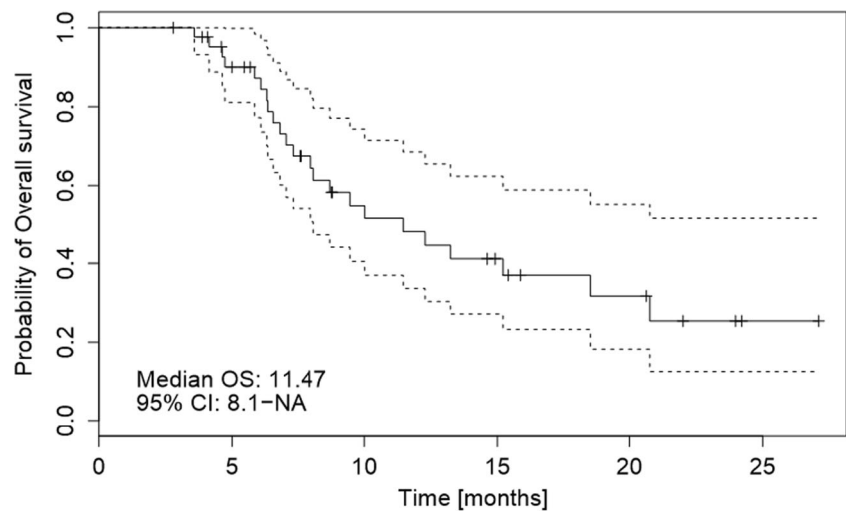


Fig. 2 Kaplan-Meier curve of overall survival in all patients. Median overall survival 11.47 months (95% CI: 8.08-NA)



approaches. Clinical studies evidenced effectiveness of targeted agents, such as BRAF-inhibitors vemurafenib approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2011 and dabrafenib approved in 2013. Dabrafenib is another BRAF-inhibitor that proved to have clinical benefit in BREAK-2 and BREAK-3 trials. The responses were observed in 50% (47% partial response (PR), 3% complete response (CR)) of the patients receiving dabrafenib. Median progression free survival in the dabrafenib group was 5.1 months vs. 2.7 months [7].

The phase 1 study for vemurafenib included patients with solid tumours, the dose escalation part included 55 patients followed by a dose-extension cohort of 32 additional patients with metastatic melanoma. The 32 patients with metastatic melanoma had BRAF V600 mutation, and provided evidence that

inhibition of the oncogenic MAPK pathway resulted in antitumor activity with the suggested dose of 960 mg twice daily. The estimated median PFS showed >7 months. A total of 26 of the 32 patients 81% had a response, with a CR in 2 patients and a PR in 24 patients [8]. The phase 2 trial (BRIM-2) involved 132 previously treated, stage IV metastatic melanoma patients with BRAF mutation. The aim of this study was to investigate the efficacy of vemurafenib with respect to objective response rate (ORR), OS and duration of response (DoR). The median follow up was 15.9 months, the confirmed ORR 53%, and the median duration of response was 6.7 months. 6% of the patients reached CR. The median PFS was 6.8 months, the median OS was 15.9 months. The toxic effects were more or less related to the skin and the keratoachantomas or squamous cell carcinomas manifested in the first 8 to 12 weeks of the therapy [9].

Table 2 Summary of adverse events. Data are n (%)

Adverse events	Gr 1–2 no. of patients (%)	Gr3 no. of patients (%)
Follicular hyperkeratosis	17 (39%)	0
Photosensitivity	14 (33%)	0
Macular-papular rash	7 (16%)	2 (5%)
Arthralgia	10 (23%)	1 (2%)
Diarrhoea	5 (12%)	0
Fatigue	4 (9%)	0
Alopecia	5 (12%)	0
Verruca vulgaris	4 (9%)	0
Keratoachantoma	3 (7%)	0
Pruritus	2 (5%)	0
QTcB interval prolongation	0	2 (5%)
Increased total bilirubin level	1 (2%)	0
Palmo-Plantar hyperkeratosis	2 (5%)	0
Dysgeusia	1 (2%)	0
Cutaneous squamous-cell carcinoma	0	2 (5%)
Vemurafenib associated panniculitis	1 (2%)	0

The approval clinical trial for vemurafenib resulted in the BRIM 3, phase 3 study, comparing vemurafenib to DTIC involving 675, previously untreated metastatic melanoma patients with BRAF mutation. The patients receiving vemurafenib experienced longer median PFS (5.3 vs. 1.6 months) and median OS (13.2 [95% CI, 12.0–15.0] vs. 9.7 months). Objective response rate (ORR) proved to be 48% vs. 5.5%. The generally observed adverse events of vemurafenib occurring were arthralgia, rash, photosensitivity, fatigue, pruritus, hyperkeratosis, diarrhoea, alopecia. In the vemurafenib group 18% of the patients developed cutaneous squamous cell carcinoma, keratoachantoma, or both. 38% of the patients in the vemurafenib group required dose modification or interruption [4].

In our study population 27.9% of the patients received vemurafenib first line, and 71.9% second-, third-, or fourth-line. Similarly to the previously published data in phase II and III trials, the median overall survival was 11.47 months. Objective responses were noted in 51.1%. DCR was achieved in 79% of patients. Complete responses were attained by 5 patients (11.6%), which is a significantly higher rate than was achieved in the BRIM-2 trial (6%). We experienced primary resistance in 5 patients (11.6%), which results are almost similar comparing to the reported data of randomised clinical trials. Approximately 10 to 15% of vemurafenib treated patients do not experience tumor regression or disease stabilization, demonstrating intrinsic or primary resistance [10, 11].

From the analysed predictive factors LDH level was significantly associated as the strongest predictive factor. In our study vemurafenib therapy was well tolerated, the AE profile was almost consistent with the previously reported data. However, less squamous cell carcinoma was observed than the literature data (19%). In this population we had no cases of permanent treatment discontinuation. Dose-reduction was required in 13 patients (30%), compared to the 38% in the BRIM 3 study. The most common reasons for treatment discontinuation were maculopapular rash and arthralgia. Development of keratoachantoma or cutaneous squamous cell carcinoma was detected in 5 patients (12%) which is a better rate than what was published in the BRIM 3 study (18%). Median development of the first keratoachantoma or squamous cell carcinoma was 8 weeks, similar to the literature data. According to the literature data infectious disease developed rarely with vemurafenib treatment [12]. Vemurafenib associated neutrophilic panniculitis was detected in one patient. The mechanism by which vemurafenib causes panniculitis is not yet known. Clinically it could cause differential-diagnostic difficulties [13].

Although BRAF inhibitor monotherapy is effective in BRAF-mutant melanoma, the duration of response is often short lived with developing resistance after approximately 6 months. The mechanisms of resistance to vemurafenib is heterogeneous. Re-activation of MAPK signalling occurs in

the majority of cases of acquired resistance to BRAF inhibitors [14]. In an attempt to delay the resistance and enable greater inhibition the combination of BRAF inhibitor and MEK inhibitor (cobimetinib, trametinib) target therapy was approved by the FDA in 2015. Combination therapy demonstrated even more impressive clinical outcomes than vemurafenib monotherapy, therefore is now preferred over single agent therapy, unless there are contraindications existing.

BRIM 7, phase 3 trial compared combination of vemurafenib and cobimetinib with vemurafenib as monotherapy. Median PFS was 9.9 months vs. 6.2 months in the vemurafenib monotherapy arm. The ORR was 68% in the combination arm compared to the 45% in the control arm [15]. The study results were recently updated with a median follow up of 14.2 months, the median progression free survival reached 12.3 months for cobimetinib and vemurafenib vs. 7.2 months for placebo and vemurafenib. The median overall survival was 22.3 months vs. 17.4 months [16]. The safety profile was manageable. Toxicities were observed more frequently with the combination group compared to the vemurafenib monotherapy, including central serous retinopathy, diarrhea, nausea, photosensitivity, elevated aminotransferase levels and an increased creatine kinase level. The incidence of secondary cutaneous squamous cell cancers decreased with the combination therapy, compared to vemurafenib alone (2% vs 11%).

Two phase 3 trials were subsequently conducted with dabrafenib and trametinib. COMBI-d compared combination of first-line therapy with dabrafenib and trametinib patients to dabrafenib and placebo. Updated results were reported a median PFS of 11 months vs 8.8 and the median OS was observed at 25.1 months for the combination arm vs. 18.7 [17]. COMBI-v compared the dabrafenib-trametinib combination to vemurafenib monotherapy. Median PFS observed at 11.4 months vs. 7.3 with vemurafenib therapy, and the ORR 64% was vs 51%. Median OS was 17.2 month at the vemurafenib arm [18].

Combination of target agents currently recommended in the NCCN guidelines for the treatment of BRAF mutated, unresectable metastatic melanoma patients. In case of contraindication, such as serous rethinopathy, retinal vein dysfunction or left ventricular dysfunction, according to our study 6.48 month progression free survival and 11.47 month overall survival are achievable.

Our real-life data proved almost similar results comparing to the literature data, moreover in our population we had no cases of permanent treatment discontinuation. This retrospective trial confirms that similar to the BRIM 3 trial (median PFS 5.3, median OS 13.2, objective response rate (ORR 48%)) there is an improved median survival of vemurafenib treatment (median OS 11.47 months) in patients with BRAF V600 mutation. Objective responses were noted in 51.1% of the patients. DCR was achieved in 79% of patients. Complete

responses were attained by 5 patients (11.6%). Vemurafenib therapy was well tolerated, the AE profile was almost consistent with the previously reported data.


The combination of BRAF and MEK inhibitor therapy already shows further improvement in the outcomes with response rates of approximately 70% and PFS of 11–14 months as clinically proved therapeutic agents, which are now part of the daily routine. Our experiences with vemurafenib monotherapy helps the enrolment and the management of patients with combination therapy.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 65:5–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21254>
2. Tsoo H, Atkins MB, Sober AJ (2004) Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 351(10):998–1012
3. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW et al (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363(8):711–723 Erratum in: *N Engl J Med*. 363(13):1290
4. Chapman PB, Hauschild A, Robert C et al (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364:2507–2516
5. McArthur GA, Chapman PB, Robert C et al (2014) Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF (V600E) and BRAF (V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 15(3):323–332
6. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J et al (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45:228–247
7. Hauschild A et al (2012) Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomized controlled trial. *Lancet* 380:358–365
8. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA et al (2010) Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* 363:809–819
9. Sosman JA, Kevin MD et al (2012) Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *N Engl J Med* 366:707–714
10. Asić K (2016) Dominant mechanisms of primary resistance differ from dominant mechanisms of secondary resistance to target therapies. *Crit Rev Oncol Hematol* 97:178–196
11. Trunzer K, Pavlick AC, Sosman JA, Ribas A et al (2013) Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 31(14):1767–1774
12. Rinderknecht JD, Goldinger SM et al (2013) RASopathies Skin Eruptions during Vemurafenib Therapy. *PlosOne* 8(10) <https://doi.org/10.1371/annotation/d884b668-04f7-4ae6-96a3-a199df5b43be>. 2013 March 14
13. Zimmer L, Livingstone E, Hillen U, Domkes S, Becker A et al (2012) Panniculitis with arthralgia in patients with melanoma treated with selective BRAF inhibitors and its management. *Arch Dermatol* 148(3):357–361
14. Manzano Jose L, Layos L et al (2016) Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med* 4(12):237
15. Larkin J, Ascierto PA, Dreno B et al (2014) Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 371:1867–1876
16. Ascierto PA, McArthur et al (2016) Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF V600 -mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17:1248–1260
17. Long G et al (2015) Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val 600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised, controlled trial. *Lancet* 386:444–451
18. Robert C, Karaszewska B, Schachter J et al (2015) Improved overall survival in melanoma combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med* 372:30–39

Article

Predictive and Prognostic Value of BRAF and NRAS Mutation of 159 Sentinel Lymph Node Cases in Melanoma—A Retrospective Single-Institute Study

Gabriella Liskay ^{1,*} , Zoltán Mátrai ², Kata Czirbesz ¹, Nóra Jani ³, Eszter Bencze ³ and István Kenessey ^{4,5}

¹ Department of Dermato-Oncology, National Institute of Oncology, 1122 Budapest, Hungary; czirbikatu@gmail.com

² Department of Breast and Sarcoma Surgery, National Institute of Oncology, 1122 Budapest, Hungary; matraidok@oncol.hu

³ Department of Surgical and Molecular Pathology, National Institute of Oncology, 1122 Budapest, Hungary; nora.jani.dr@gmail.com (N.J.); ri3lity@gmail.com (E.B.)

⁴ National Cancer Registry, National Institute of Oncology, 1122 Budapest, Hungary; kenessey.istvan@oncol.hu

⁵ 2nd Department of Pathology, Semmelweis University, 1085 Budapest, Hungary

* Correspondence: liskay@oncol.hu; Tel.: +36-1-224-8600; Fax: +36-1-224-8620

Simple Summary: Sentinel lymph node (SLN) status is still the most important prognostic factor for melanoma patients; however, the efficacy of completing lymph node dissection remains questionable. The aim of our study was to assess the correlation between known prognostic factors, mutational occurrence of BRAF and NRAS in the primary tumor, and SLN status. Statistical analysis revealed that Breslow thickness was associated with SLN status; however, neither NRAS nor BRAF showed a predictive value. Furthermore, NRAS mutation in primary tumors proved to be an independent factor of tumor progression. This suggests that regardless of the SLN status, the NRAS-mutant subgroup of patients requires closer monitoring.



Citation: Liskay, G.; Mátrai, Z.; Czirbesz, K.; Jani, N.; Bencze, E.; Kenessey, I. Predictive and Prognostic Value of BRAF and NRAS Mutation of 159 Sentinel Lymph Node Cases in Melanoma—A Retrospective Single-Institute Study. *Cancers* **2021**, *13*, 3302. <https://doi.org/10.3390/cancers13133302>

Academic Editor: Eduardo Nagore

Received: 21 May 2021

Accepted: 29 June 2021

Published: 30 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Purpose: To assess the prognostic role of sentinel lymph node status (SLN) in melanoma patients, a statistical comparison was performed with the application of already known prognostic factors, mutational occurrence of BRAF and NRAS in the primary tumor, as well as disease outcome. Methods: Our retrospective single-center study involved 159 melanoma cases, who underwent SLN biopsy. The following clinico-pathological data were collected: age, gender, location of primary tumor, Breslow thickness, ulceration degree, histological subtype, mitosis count, lymphovascular and perineural invasion, presence of tumor-infiltrating lymphocytes, regression signs, mutations of BRAF and NRAS of the primary tumors, and SLN status. Results: From the studied clinico-pathological factors, only Breslow thickness increased the risk of SLN positivity ($p = 0.025$) by multivariate analysis, while neither BRAF nor NRAS mutation of the primary tumor proved to be a predictor of the SLN status. While the NRAS-mutant subgroup showed the most unfavorable outcome for progression-free and distant metastasis-free survival, their rate of positive SLNs proved to be relatively lower than that of patient groups with BRAF mutation and double-wild-type phenotypes. Conclusion: Similarly to the importance of SLN positivity, NRAS mutation of the primary tumor proved to be an independent prognostic factor of progression. Therefore, despite negative SLN, this NRAS-mutant subgroup of patients still requires closer monitoring to detect disease progression.

Keywords: melanoma; sentinel lymph node; NRAS; BRAF; progression

1. Introduction

The incidence of melanoma shows a continuous increase worldwide. During the past few decades, the number of new cases has multiplied [1,2]. Experimental and clinical research in the last decades investigated the molecular and immunological background of melanoma and successfully established the base of novel innovative therapeutic modalities

such as target-based therapies and immunotherapies and the clinical application of new prognostic and predictive factors [3–5].

Oncogenic mutations in *BRAF* and *NRAS* proved to be the most common genetic alterations in cutaneous melanoma (40–60% and 15–20%, respectively), while the *KIT* gene is frequently affected in mucosal melanomas (5–40%), and the majority of uveal melanomas harbors mutations of *GNAQ* or *GNA-11* (80%) [6,7].

Somatic mutations of *BRAF* and *NRAS* result in the hyperactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling that drives tumor growth and leads to progression of the disease [8,9].

In 90% of cases with a *BRAF* mutation, a valine-to-glutamic-acid mutation is present at codon 600 of exon 15 (V600E). The development of specific inhibitors, such as vemurafenib, opened a new horizon for melanoma therapy. However, other known rare *BRAF* mutations also appear (e.g., V600K, V600R, V600D). *BRAF* mutations more frequently occur at younger ages and on trunk location and are associated with chronic UV exposure [10]. Although the presence of *BRAF* mutation is an attractive target of melanoma therapy, its prognostic value is still elusive.

RAS was the first discovered oncogene in melanoma. The incidence of *RAS* mutation is approximately 20%, with the majority found in *NRAS*, while mutations of *KRAS* and *HRAS* may occur in 1–2% of cases. Mostly, a glutamine–leucine substitution is detected in exon 3, codon 61 position, while alterations of exon 2, codons 12 and 13 are relatively rare [11,12]. Similarly to *BRAF*, it seems that high UV exposure induces the development of *NRAS* mutations as well. Unfortunately, specific molecular therapy against *NRAS*-mutated melanoma has not been accepted yet. Previously, based on clinical trials, some therapeutic advantages of a MEK inhibitory strategy were reported [13]. Furthermore, studies suggested that immunotherapy was more effective in patients with *NRAS* mutation, but some studies conclude that *NRAS* mutation in melanoma has a negative impact on disease outcome [14].

Although in sentinel lymph node (SLN)-positive cases the efficacy of completing lymph node dissection remains questionable [15], the role of sentinel lymph node biopsy is inevitable for regional staging and therapy designing, and sentinel lymph node status is one of the most important prognostic factors in melanoma.

The aim of our study was to assess the correlation between known prognostic factors of melanoma, mutational occurrence of *BRAF* and *NRAS* in the primary tumor, and sentinel lymph node status. Moreover, we investigated the association of these factors with disease outcome.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Our retrospective single-center study involved 159 patients who were surgically treated for melanoma at the National Institute of Oncology (Budapest, Hungary) between October 2011 and July 2015. From the institutional database, the following clinicopathological data were collected: age, gender, location of the primary tumor, Breslow thickness, ulceration, histological subtype, mitosis count, lymphovascular and perineural invasion, evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes, signs of regression, and SLN status. Microscopic satellitosis was not included in the analysis, because of the low number (less than 10) of cases. Primary melanomas were removed in two steps; a 5 mm safety margin was completed to 1–2 cm according to the WHO guideline (no insufficient margins were found in the population of patients.) SLN biopsy was performed in the following cases: intermediate tumor thickness (1–4 mm), less than 1 mm if the primary tumor was ulcerated, Clark level higher than III, lymphovascular invasion, or high mitosis activity, more than 4 mm Breslow thickness if the tumors were not ulcerated. SLN biopsy was performed by the double-labeling technique 4–8 weeks after primary surgery. In cases of positive SLNs, complete regional lymph node dissection (RLND) was indicated. SLNs were histologically investigated in serial sections stained with hematoxylin and eosin. In addition, HMB45,

S100, and Melan-A immunohistochemistry was performed to confirm the SLN status, as we previously reported [16].

Patients with negative SLNs received low-dose interferon- α therapy for 18 months. In positive-SLN cases, intermediate- or high-dose interferon- α therapy was indicated after regional block dissection. According to the decision of a multidisciplinary oncoteam, for cases with a disseminated tumor, targeted, immune, and chemotherapy were performed. Regression of primary tumor was classified as lower or higher than 75% and late or early, similarly to the protocol of the College of American Pathologists [17].

Follow-up data were obtained from the institutional database and National Cancer Registry of Hungary. The follow-up period ended in October 2019.

2.2. Genetic Subtyping

For further analysis, molecular categorization was performed. Genomic DNA was isolated from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPET) using the cobas[®] DNA Sample Preparation kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The target DNAs were amplified and detected on the cobas z 480 analyzer using the amplification and detection reagents provided in the BRAF/NRAS Mutation Test (LSR) kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

BRAF/NRAS Mutation Test (LSR) uses primers that define specific base-pair sequences for each of the targeted mutations. Amplification occurs only in the regions of the *BRAF* or *NRAS* genes between the primers; the entire gene is not amplified. *BRAF* sequences range from 101 to 120 base pairs. *NRAS* sequences range from 94 to 121 base pairs.

The test is designed to detect the following mutations ($n = 36$) at a percent mutation of 5% or greater:

- V600E, V600E2, V600D, V600K, V600R, and K601E in *BRAF* exon 15
- G466A, G466V, G469A, G469R, and G469V in *BRAF* exon 11
- G12A, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13A, G13C, G13D, G13R, G13S, G13V, and A18T in *NRAS* exon 2
- A59D, A59T, Q61Ht, Q61Hc, Q61K, Q61L, Q61P, and Q61R in *NRAS* exon 3
- K117Nc, K117Nt, A146T, and A146V in *NRAS* exon 4

2.3. Statistical Analysis

Numeric parameters were compared by the Mann–Whitney or Kruskal–Wallis test with post hoc analysis. Categorical data were analyzed by the Chi-square test or Fisher's exact probability test. Survival periods were determined as the time period from the date of SLN biopsy to the date of the last visit or defined complete event (death, progression, distant metastasis). Thus, overall survival (OS), disease-specific survival (DSS), progression-free survival (PFS), and distant metastasis-free survival (DMFS) were calculated. Survival analyses were done using the Kaplan–Meier method and log-rank statistics. Univariate and multivariate analyses of prognostic factors were done using the Cox's regression model. Probability of sentinel lymph node positivity was assessed by binary logistic regression model. Differences were considered statistically significant when the p -value proved to be lower than 0.05. All statistical calculations were performed by Statistica 13.4 (TIBCO Software, Palo Alto, CA, USA).

2.4. Ethical Permission

The study was conducted under the ethical permission of the Scientific and Research Ethics Committee of the Medical Research Council (approval number: 15140/2017) and was carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans.

3. Results

The median follow-up period of the studied 159 patients was 61 months (range: 1–96 months). The median age was 59 years (range: 18–83 years). Out of 159 patients,

71 were male (44.7%), and 88 were female (55.3%). The most frequent location of the primary tumor was the trunk (77; 48.4%), followed by the lower extremities (47; 29.6%), then the upper extremities (35; 22%). Median Breslow thickness was 1.8 mm (range: 0.51–20 mm). Forty-nine of the primary tumors were ulcerated (30.8%). The most frequent histological subtype was superficial spreading melanoma (SSM, 124; 78%); 31 cases (19.5%) presented with nodular melanoma (NM), while in 4 cases (2.5%), other histological types were identified (Table 1).

Table 1. General characteristics of the studied patients with melanoma.

Characteristics	Values
All patients	159
Age (year) (median, min; max)	59 (18; 83)
Follow-up time (month) (median, min; max)	61 (1; 96)
Gender	
male	71 (44.7%)
female	88 (55.3)
Location	
upper extremity	35 (22%)
lower extremity	47 (29.6%)
trunk	77 (48.4%)
Breslow (mm) (median, min; max)	1.8 (0.51; 20)
Breslow categories	
I (≤ 1 mm)	21 (13.2%)
II (1.01–2.00 mm)	65 (40.9%)
III (2.01–4.00 mm)	62 (39%)
IV (>4 mm)	11 (6.9%)
Ulceration	
no	110 (69.2%)
yes	49 (30.8%)
Histological subtype	
SSM	124 (78%)
NM	31 (19.5%)
LMM	1 (0.6%)
ALM	1 (0.6%)
other	2 (1.3%)
Mitosis count (/mm ²) (median, min; max)	4 (0; 31)
Invasion	
no	132 (83%)
vascular	11 (6.9%)
lymphatic	11 (6.9%)
vascular and lymphatic	2 (1.3%)
perineural	2 (1.3%)
NA	1 (0.6%)
TIL	
no	73 (45.9%)
yes	86 (54.1)
Regression	
no	79 (49.7%)
early	9 (5.7%)
late, $<75\%$	50 (31.4%)
late, $\geq 75\%$	21 (13.2%)

Table 1. Cont.

Characteristics	Values
Mutation categories	
double wild-type	28 (17.6%)
BRAF	90 (56.6%)
NRAS	29 (18.2%)
NA	12 (7.5%)
Sentinel status	
negative	130 (81.8%)
positive	29 (18.2%)

SSM: superficial spreading melanoma; NM: nodular melanoma; LMM: lentigo malignant melanoma; ALM: acrolentiginous melanoma; TIL: tumor-infiltrating lymphocytes; NA: not available.

The median mitosis count was 4/mm² (range: 0–31); in 132 tumors (83%) neither lymphovascular nor perineural invasion was detected. In 86 cases (54.1%), tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) were detected. Early regression of the primary tumor occurred in 9 patients (5.7%), late regression of less than 75% occurred in 50 tumors (31.4%), while 75% regression was exceeded in 21 patients (13.2%). The primary tumor of 90 patients harbored a BRAF mutation (56.6%), which was V600E in 87%, V600K in 10%, and V600R in 3% of the patients. An NRAS mutation was detected in 29 patients (18.2%), specifically, in exon 3 codon 61 (97%) and exon 2 codon 13 (3%); 28 patients proved to belong to the double-wild-type group (17.6%), and genotyping was not available for 12 patients (7.5%). The SLN status was negative in 130 cases (81.8%), while 29 cases showed SLN positivity (18.2%).

The SLN status showed a positive association with Breslow thickness of the primary tumors ($p = 0.008$). In SLN-negative cases, the median Breslow thickness was 1.64 mm (range: 0.51–20 mm), whereas in positive cases, it was 2.45 mm (range: 0.79–15 mm). SLN status and ulceration of the primary tumor showed significant association as well ($p = 0.007$): 26.2% of the studied tumors were ulcerated in negative-SLN cases, and 51.7% in positive-SLN cases. Additionally, mitosis count of the primary tumor differed between SLN-negative and -positive groups ($p = 0.009$), corresponding to 3/mm² (range: 0–31) and 5/mm² (1–30), respectively.

Obviously, the presence of lymphovascular and/or perineural invasion of the primary tumor was associated with SLN status ($p = 0.004$); it was present in 34.5% of SLN-positive cases and in only 12.3% of the negative cases. A slightly higher occurrence of BRAF mutation was detected in the primary tumors of SLN-positive patients with respect to the SLN-negatives cases (65.5% and 54.6%, respectively); however, the difference was not statistically significant. Interestingly, NRAS mutation of the primary tumor was present only in 6.9% of SLN-positive tumors, while it was detected in 20.8% of SLN-negative cases; however, this difference was not statistically significant either (Table 2).

Table 2. Distributional differences of melanoma patients by sentinel lymph node status.

Characteristics	Sentinel Negative	Sentinel Positive	p (with Applied Statistics)
All patients	130	29	
Age (year) (median, min; max)	59.5 (18; 82)	58 (32; 83)	0.81 (Mann–Whitney)
Gender			
male	55 (42.3%)	16 (55.2%)	0.208 (χ^2)
female	75 (57.7%)	13 (44.8%)	
Location			
upper extremity	32 (24.6%)	3 (10.3%)	0.211 (χ^2)
lower extremity	36 (27.7%)	11 (37.9%)	
trunk	62 (47.7%)	15 (51.7%)	

Table 2. Cont.

Characteristics	Sentinel Negative	Sentinel Positive	<i>p</i> (with Applied Statistics)
Breslow (mm) (median, min; max)	1.64 (0.51; 20)	2.45 (0.79; 15)	0.008 (Mann–Whitney)
Ulceration			
no	96 (73.8%)	14 (48.3%)	0.007 (χ^2)
yes	34 (26.2%)	15 (51.7%)	
Histological subtype			
SSM	104 (80%)	20 (69%)	0.177 (χ^2)
NM	24 (18.5%)	7 (24.1%)	
other	2 (1.5%)	2 (6.9%)	
Mitosis count (/mm ²) (median, min; max)	3 (0; 31)	5 (1; 30)	0.009 (Mann–Whitney)
Invasion (all type)			
no	113 (86.7%)	19 (65.5%)	0.004 (χ^2)
yes	16 (12.3%)	10 (34.5%)	
NA	1 (0%)	0 (0%)	
TIL			
no	62 (47.7%)	11 (37.9%)	0.34 (χ^2)
yes	68 (52.3%)	18 (62.1%)	
Regression			
no	63 (48.5%)	16 (55.2%)	0.873 (χ^2)
early	7 (5.4%)	2 (6.9%)	
late, <75%	42 (32.3%)	8 (27.6%)	
late, ≥75%	18 (13.9%)	3 (10.3%)	
Mutation categories			
double wild	23 (17.7%)	5 (17.2%)	0.218 (χ^2)
BRAF	71 (54.6%)	19 (65.5%)	
NRAS	27 (20.8%)	2 (6.9%)	
NA	9 (6.9%)	3 (10.3%)	

SSM: superficial spreading melanoma; NM: nodular melanoma; TIL: tumor-infiltrating lymphocytes; NA: not available. Bold means $p < 0.05$.

When analyzing the correlation of different prognostic factors with SLN status, a multivariate analysis revealed that the only significant parameter was Breslow thickness of the primary tumor (OR: 4.222; 95% CI: 1.201–14.873; $p = 0.025$), while the other studied variables did not affect the risk of sentinel node positivity (Table 3).

Table 3. Risk factors of sentinel node positivity by the binary logistic regression model.

Variable	OR (95% CI)	<i>p</i>
Age (≤59 vs. >59)	0.744 (0.268–2.065)	0.571
Gender (male vs. female)	0.563 (0.213–1.492)	0.248
Location (extremity vs. trunk)	1.142 (0.402–3.236)	0.804
Breslow (I–II vs. III–IV)	4.222 (1.201–14.837)	0.025
Ulceration (no vs. yes)	1.203 (0.383–3.788)	0.751
Mitosis (<4 vs. ≥4)	1.904 (0.617–5.874)	0.263
Invasion (no vs. yes)	1.759 (0.547–5.655)	0.343
TIL (no vs. yes)	1.185 (0.442–3.175)	0.736
BRAF (wild type vs. mutant)	1.287 (0.35–4.73)	0.704
NRAS (wild type vs. mutant)	0.314 (0.046–2.145)	0.237

OR: odds ratio; TIL: tumor-infiltrating lymphocytes. Bold means $p < 0.05$.

When evaluating the parameters of BRAF, NRAS mutant, and double-wild-type primary tumors, significant differences were revealed for age and Breslow thickness of

primary tumor ($p = 0.001$ and $p = 0.018$, respectively). BRAF-mutant patients were younger, NRAS-mutant primary tumors were thicker than those in the other two groups. Trunk location was slightly more frequent, found in 58.6% of NRAS-mutant, 51.1% of BRAF-mutant, and 31.1% of double-wild-type tumors. We also observed that 24.1% of NRAS-mutant tumors proved to be nodular melanoma, while 16.7% of BRAF-mutant and 17.9% of double-wild-type tumors belonged to that histological category (Table 4).

Table 4. Distributional differences of melanoma patients by molecular subtype (asterisk indicates a significant difference by the post hoc test).

Characteristics	Double Wild	BRAFmut	NRASmut	p (with Applied Statistics)
All patients	28	90	29	
Age (year) (median, min; max)	68 (19; 82)	53 (23; 83) *	66 (30; 81)	0.001 (Kruskal–Wallis)
Gender				
male	12 (42.9%)	40 (44.4%)	16 (55.2%)	0.555 (χ^2)
female	16 (57.1%)	50 (55.6%)	13 (44.8%)	
Location				
upper extremity	8 (28.6%)	16 (17.8%)	8 (27.6%)	0.116 (χ^2)
lower extremity	11 (39.3%)	28 (31.1%)	4 (13.8%)	
trunk	9 (31.1%)	46 (51.1%)	17 (58.6%)	
Breslow (mm) (median, min; max)	1.675 (0.73; 20)	1.64 (0.51; 15)	2.72 (0.84; 8) *	0.018 (Kruskal–Wallis)
Ulceration				
no	21 (75%)	64 (71.1%)	18 (62.1%)	0.534 (χ^2)
yes	7 (25%)	26 (28.9%)	11 (37.9%)	
Histological subtype				
SSM	23 (82.1%)	72 (80%)	20 (69%)	0.244 (χ^2)
NM	5 (17.9%)	15 (16.7%)	9 (24.1%)	
other	0 (0%)	3 (3.3%)	0 (0%)	
Mitosis count (/mm ²) (median min; max)	3.5 (0; 26)	3 (0; 24)	4 (0; 31)	0.319 (Kruskal–Wallis)
Invasion (all type)				
no	18 (64.3%)	78 (86.7%)	27 (93.1%)	0.193 (χ^2)
yes	10 (35.7%)	12 (13.3%)	1 (3.4%)	
NA	0 (0%)	0 (0%)	1 (3.4%)	
TIL				
no	13 (46.4%)	38 (42.2%)	16 (55.2%)	0.474 (χ^2)
yes	15 (53.6%)	52 (67.8%)	13 (44.8%)	
Regression				
no	15 (53.6%)	42 (46.7%)	16 (55.2%)	0.873 (χ^2)
early	2 (7.1%)	6 (6.7%)	0 (0%)	
late <75%	8 (28.6%)	30 (33.3%)	10 (34.5%)	
late ≥75%	3 (10.7%)	12 (13.3%)	3 (10.3%)	
Sentinel status				
negative	23 (82.1%)	71 (78.9%)	27 (93.1%)	0.218 (χ^2)
positive	5 (17.9%)	19 (21.1%)	2 (6.9%)	

SSM: superficial spreading melanoma; NM: nodular melanoma; NA: not available; TIL: tumor-infiltrating lymphocytes. *: $p < 0.05$, compared to the other two groups; bold means $p < 0.05$.

At the last follow-up, 130 patients were alive (81.8%), and 29 had died (18.2%). A total of 123 patients (77.4%) were tumor-free, 7 received innovative therapies due to metastatic disease (4.4%). In 29 cases (18.2%), progression of the disease was detected, i.e., locoregional progression in 7 patients (4.6%) and distant metastasis in 22 cases (13.8%), respectively. Out of the 22 distant-metastatic cases, 9 had previous locoregional progression.

The univariate Cox proportional hazard model confirmed previously reported findings that Breslow-thickness of the primary tumor, ulceration degree, mitosis level, and an invasive spreading pattern highly affected every survival endpoint (Table 5), while patients'

age affected DMFS and OS. In addition, sentinel lymph node status was associated with the risk of progression ($p = 0.001$) and distant metastasis-free survival ($p = 0.006$), but not with OS and DSS; however, for DSS, a tendency close to the significance level was observed. The NRAS/BRAF status adversely affected survival: mutant NRAS was associated with a poorer PFS ($p = 0.048$) and OS ($p = 0.037$), while mutant BRAF was associated with a significantly more favorable OS ($p = 0.045$).

Table 5. Cox univariate and multivariate analysis of various prognostic factors in melanoma patients, according to different survival endpoints (PFS: progression-free survival; DMFS: distant metastasis-free survival; DSS: disease-specific survival, OS: overall survival).

Parameters of Patients	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	RR (95% CI)	<i>p</i>	RR (95% CI)	<i>p</i>
PFS				
Age	1.023 (0.996–1.051)	0.089	1.026 (0.995–1.058)	0.098
Gender (male vs. female)	1.084 (0.526–2.232)	0.827	1.259 (0.577–2.743)	0.563
Location (extremity vs. trunk)	0.786 (0.382–1.618)	0.513	1.117 (0.702–1.778)	0.641
Breslow thickness	1.206 (1.11–1.311)	$<10^{-3}$	1.141 (1.018–1.28)	0.024
Ulceration (no vs. yes)	2.883 (1.406–5.912)	0.004	1.082 (0.398–2.937)	0.877
Mitosis number	1.081 (1.035–1.129)	$<10^{-3}$	1.058 (0.997–1.123)	0.062
Invasion (no vs. yes)	2.534 (1.157–5.549)	0.02	1.8 (0.713–4.543)	0.111
TIL (no vs. yes)	1.018 (0.882–1.175)	0.812	1.07 (0.915–1.251)	0.213
NRAS (wild-type vs. mutant)	1.479 (1.003–2.18)	0.048	1.887 (1.008–3.53)	0.047
BRAF (wild-type vs. mutant)	0.577 (0.275–1.214)	0.148	0.719 (0.227–2.277)	0.575
Sentinel status (negative vs. positive)	3.315 (1.595–6.89)	0.001	3.301 (1.424–7.654)	0.005
DMFS				
Age	1.04 (1.005–1.075)	0.023	1.047 (1.007–1.087)	0.019
Gender (male vs. female)	1.197 (0.511–2.8)	0.679	1.39 (0.56–3.45)	0.477
Location (extremity vs. trunk)	0.873 (0.377–2.02)	0.75	0.979 (0.555–1.728)	0.942
Breslow thickness	1.223 (1.12–1.333)	$<10^{-3}$	1.178 (1.039–1.336)	0.011
Ulceration (no vs. yes)	2.937 (1.268–6.802)	0.012	0.837 (0.236–2.964)	0.782
Mitosis number	1.089 (1.037–1.423)	$<10^{-3}$	1.07 (0.999–1.146)	0.054
Invasion (no vs. yes)	4.143 (1.765–9.728)	0.001	3.255 (1.09–9.723)	0.034
TIL (no vs. yes)	0.966 (0.815–1.145)	0.687	1.046 (0.864–1.265)	0.647
NRAS (wild-type vs. mutant)	1.439 (0.911–2.274)	0.119	2.034 (0.97–4.265)	0.06
BRAF (wild-type vs. mutant)	0.569 (0.239–1.356)	0.203	0.643 (0.174–2.379)	0.508
Sentinel status (negative vs. positive)	3.288 (1.404–7.698)	0.006	2.929 (1.087–7.892)	0.034
DSS				
Age	1.041 (1–1.084)	0.051	1.047 (0.999–1.097)	0.056
Gender (male vs. female)	1.785 (0.62–5.142)	0.283	2.055 (0.629–6.713)	0.233
Location (extremity vs. trunk)	0.802 (0.299–2.154)	0.662	0.789 (0.396–1.571)	0.499
Breslow thickness	1.283 (1.161–1.418)	$<10^{-3}$	1.294 (1.127–1.485)	$<10^{-3}$
Ulceration (no vs. yes)	3.089 (1.5–8.3)	0.025	0.577 (0.113–2.948)	0.509
Mitosis number	1.108 (1.051–1.169)	$<10^{-3}$	1.089 (1.006–1.177)	0.034
Invasion (no vs. yes)	4.346 (1.613–11.708)	0.004	3.485 (0.918–13.232)	0.067

Table 5. Cont.

Parameters of Patients	Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	RR (95% CI)	<i>p</i>	RR (95% CI)	<i>p</i>
DSS				
TIL (no vs. yes)	1.032 (0.848–1.256)	0.751	1.086 (0.87–1.357)	0.466
NRAS (wild-type vs. mutant)	1.407 (0.821–2.41)	0.214	1.869 (0.757–4.615)	0.175
BRAF (wild-type vs. mutant)	0.544 (0.196–1.508)	0.242	0.771 (0.146–4.077)	0.759
Sentinel status (negative vs. positive)	2.593 (0.942–7.136)	0.065	1.774 (0.538–5.85)	0.346
OS				
Age	1.061 (1.026–1.097)	<10 ^{−3}	1.068 (1.027–1.11)	<10 ^{−3}
Gender (male vs. female)	0.741 (0.357–1.536)	0.42	1.17 (0.523–2.614)	0.703
Location (extremity vs. trunk)	0.961 (0.464–1.992)	0.915	0.743 (0.445–1.241)	0.256
Breslow thickness	1.296 (1.889–1.413)	<10 ^{−3}	1.246 (1.112–1.397)	<10 ^{−3}
Ulceration (no vs. yes)	3.95 (1.865–8.366)	<10 ^{−3}	1.558 (0.541–4.482)	0.411
Mitosis number	1.098 (1.052–1.456)	<10 ^{−3}	1.057 (0.995–1.123)	0.07
Invasion (no vs. yes)	2.165 (0.961–4.875)	0.062	1.399 (0.518–3.782)	0.508
TIL (no vs. yes)	1.012 (0.875–1.171)	0.87	1.06 (0.905–1.241)	0.472
NRAS (wild-type vs. mutant)	1.52 (1.026–2.253)	0.037	1.327 (0.704–2.5)	0.382
BRAF (wild-type vs. mutant)	0.456 (0.212–0.981)	0.045	1068 (0.336–3.398)	0.911
Sentinel status (negative vs. positive)	1.72 (0.761–3.89)	0.193	1.594 (0.641–3.962)	0.315

RR: relative risk; PFS: progression-free survival; DMFS: distant metastasis-free survival; DSS: disease-specific survival; OS: overall survival, TIL: tumor-infiltrating lymphocytes. Bold means $p < 0.05$

The results of the univariate model regarding SLN and mutational status were confirmed by Kaplan–Meier curves with log-rank tests. According to the SLN status, the comparison of PFS and DMFS revealed significant differences between SLN-negative and -positive cases ($p = 0.001$ and 0.004 , respectively; Figure 1A,B). DSS showed nearly significant difference ($p = 0.052$): the 5-year disease-specific survival rate of SLN-negative cases was 92.7%, while that of SLN-positive cases was 77.5%. No significant difference of OS was found between the sentinel-positive and sentinel-negative groups. Evaluating the disease outcome of BRAF-, NRAS-mutant, and double-wild-type patients, NRAS-mutant cases showed less favorable outcomes in relation to almost every endpoints, while double-wild-type and BRAF-mutant cases showed a very similar survival pattern, with a more favorable prognosis (Figure 1C–F). Therefore, a comparison of merged BRAF-mutant/double-wild-type, and NRAS-mutant cases was performed, which showed statistically significant differences for PFS ($p = 0.047$) and OS ($p = 0.035$), while DMFS and DSS did not differ significantly. The 5-year PFS of BRAF-mutant/double-wild-type patients was 82.9%, whereas that of NRAS-positive cases was only 63.3%.

In multivariate analysis, except for the PFS, Breslow thickness still proved to be the strongest independent predictor of every endpoint. Compared to the univariate model, the predictive values of ulceration, mitosis, and invasion were weaker; mitosis was associated with DSS, and invasion with DMFS (Table 5). On the other hand, similarly to the univariate test, SLN positivity preserved the role of prediction on PFS ($p = 0.005$) and DMFS ($p = 0.034$). NRAS mutation proved to be a negative predictor of PFS ($p = 0.047$) and was nearly a significant predictor of DMFS ($p = 0.06$). In addition, patients' age was an independent predictor of OS and DMFS, both in the univariate and in the multivariate model.

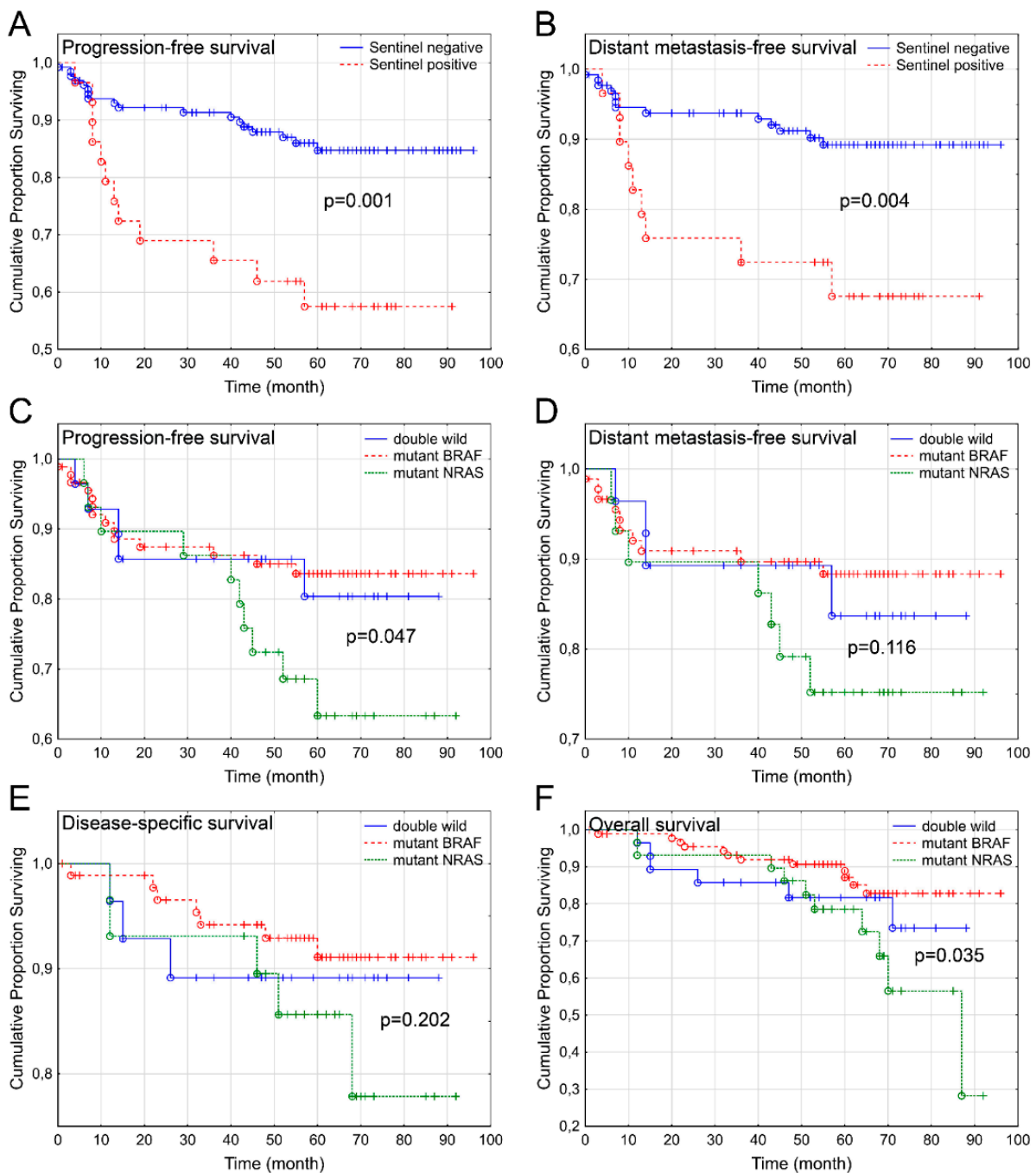


Figure 1. Kaplan–Meier curves of melanoma patients according to sentinel lymph node positivity and molecular subtypes. Sentinel lymph node positivity significantly impaired progression-free (A) and distant metastasis-free survival (B). Mutational status was analyzed in the primary tumor. Since the BRAF-mutant and double-wild-type subgroups showed a similar pattern, these categories were merged during the statistical analysis. Comparing the wild-type and NRAS-mutant groups, the latter showed a less favorable progression-free survival (C), while distant metastasis-free (D) and disease-specific (E) survival were not different. The overall survival (F) of NRAS-mutant patients showed a significantly worse outcome compared to that of the wild-type-NRAS subgroup. (o: Complete event; +: censored event).

4. Discussion

In our retrospective study including 159 patients, the associations between routine clinico-pathological factors, mutational status of the primary tumors, and SLN status were assessed. According to numerous previously published results, the SLN status is considered one of the most important prognostic factors of melanoma [18–20], and our results also

confirmed this theory. Progression and appearance of distant metastases showed an unfavorable outcome for SLN-positive patients. However, their effect on disease-specific and overall survival in our cohort might have been overwritten by numerous other factors, such as age pattern, comorbidities, and influence of innovative therapies. Generally, we consider that the evaluation of PFS and DMFS provides more informative results than that of DSS, since the influence of innovative therapies affects disease survival. In addition, disseminated disease was detected in the patients between 2012 and 2019, and in that period, the therapeutic modalities were very different according to the EMEA registration of medicines.

Nevertheless, the prognostic value of BRAF and NRAS mutation remains controversial. Some studies reported a shorter survival for BRAF-mutant stage IV melanoma patients [21,22], while other works did not find a significant difference for survival between patients with wild-type-BRAF and those with BRAF-mutant melanomas [23]. Among melanoma patients that received chemotherapy, circulating DNA of mutant BRAF was associated with a significantly worse overall survival compared to wild-type-BRAF patients, corresponding to 13 months and 30.6 months, respectively [24]. A meta-analysis of 59 heterogeneous studies (including 9243 patients) found a statistically significant association between reduced overall survival and the occurrence of BRAF mutation [25]. The prognostic value of NRAS mutation is also unclear [26,27]. A retrospective study of 217 patients confirmed that, compared to BRAF-mutant and -wild-type melanomas, NRAS-mutant tumors show a more aggressive biological behavior [14]. The latter corroborates our data, since the NRAS-mutant group showed a relatively unfavorable outcome compared to the BRAF-mutant and double-wild-type groups of patients. In addition, the BRAF-mutant and double-wild-type patients of our cohort showed a very similar survival pattern with respect to each applied endpoint.

Previously, only a few studies investigated the correlation between SLN status and oncogene mutation of the primary tumor. A case-control study of Manninen et al. enrolled 140 intermediate-thickness melanoma patients with or without SLN involvement, matched for age, gender, Breslow thickness, and location. They tested the common clinicopathological parameters (ulceration, mitotic count, and tumor regression), BRAF immunoreactivity, and cell motility involving actin-modulating proteins, in relation to SLN involvement and survival [28]. They found a significant correlation between SLN status and BRAF mutation; however, our study did not confirm their findings. A possible explanation of this contradiction is that, during the cited study, immunohistochemistry-based detection of V600E mutation was applied, while our group performed a more precise molecular analysis. It is of note that the indication of selective inhibitors is based on the latter method, and nowadays, immunohistochemical examination of BRAF is still an experimental rather than a reliable diagnostic option. Patient selection according to the experimental design showed another crucial difference, since they investigated exclusively patients with melanoma of intermediate thickness, while we did not include this prerequisite in our study. Nonetheless, we confirmed their other finding, that a higher mitotic activity of the primary tumor was related to SLN positivity. We also confirmed that SLN status was a strong independent predictive factor for progression-free survival and distant metastases-free survival. Another prospective cohort study suggested that melanoma patients with BRAF and NRAS mutation had an increased risk of tumor recurrence following a negative sentinel lymph node status. They concluded that, among melanoma patients with an earlier stage tumor, beside SLN negativity, intensive surveillance is required, taking into account BRAF and NRAS mutation status [29]. Without refusing their results, we found that the mutational status of NRAS has a higher impact on survival than that of BRAF. Furthermore, BRAF-mutant and double-wild-type patients showed a similar outcome. We found that beside Breslow thickness and sentinel lymph node status, NRAS mutation of the primary tumor is an independent predictor of PFS.

Moreover, our evaluations of BRAF-mutant, NRAS-mutant and double-wild-type tumors revealed that BRAF-positive patients were significantly younger, and NRAS-mutant

primary tumors were thicker than BRAF-mutant and double-wild-type ones. Additionally, Breslow thickness, lymphovascular and/or perineural invasion, mitosis count, and ulceration of the primary tumor were associated with SLN status, while mutation of the primary tumor did not show any significant relationship with the SLN status in our study. Interestingly, in the SLN-positive cases, NRAS mutation of the primary tumor was less frequent than in SLN-negative cases (6.9% vs. 20.8%); however, patients with NRAS mutation showed a more unfavorable outcome. In a study investigating the prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT, and MITF in melanoma, it was found that initial lymph node involvement was more frequent in patients with BRAF-mutated melanomas, than in cases presenting other mutations. This is partly similar to our results, as we found that SLN positivity was less frequent in NRAS-mutant, than in BRAF-mutant and wild-type cases [30].

Despite the low number of cases and the relatively heterogeneous population, our frequency analysis did not show statistically significant differences. Our results shares similarities with the study of Adler et al., where in comparison to wild-type primary tumors, BRAF and NRAS mutations in the primary tumor had a greater negative impact on the outcome of SLN-negative cases [29].

In conclusion, beside SLN positivity, age of the patients, Breslow thickness, lymphovascular invasion, and NRAS mutation of the primary tumor proved to be independent prognostic factors of melanoma progression. Though the age of the patients and Breslow thickness showed a significant relationship with the mutational status of the primary tumor by univariate analysis, age of the patients, NRAS mutation, and Breslow thickness remained independent prognostic factors. Therefore, despite the absence of positive SLN, the NRAS-positive patient subgroup requires closer monitoring to recognize disease progression. In contrast, the examination of our cohort did not confirm any significant association between BRAF mutation and SLN status and survival.

Our study has limitations. Melanomas are most frequently characterized by BRAF and NRAS mutation and, more rarely, by *c-KIT* oncogene mutations, but tumor suppressor genes such as *CDKN2A* and *PTEN* have an important role in the development and prognosis of melanoma [31]. In addition, *TERT* promoter mutation, detected in about half of melanoma cases, was independently associated with the prognosis of melanoma patients and of patients with other tumors [32].

The aim of our study was to evaluate the prognostic value of BRAF and NRAS mutation, evaluated in everyday clinical practice, in relation to the most important prognostic parameters, especially, the SLN status of melanoma patients.

5. Conclusions

In summary, independently of the SLN status, knowledge of the mutational status of primary melanoma lesions helps disease management and manifests additional benefits for the patients.

Author Contributions: Conceptualization, G.L.; methodology, I.K.; software, I.K.; validation, G.L., Z.M., K.C., N.J., E.B., and I.K.; formal analysis, G.L. and I.K.; investigation, G.L., K.C., Z.M., E.B., N.J.; resources, G.L., K.C., Z.M., and N.J.; data curation, I.K.; writing—original draft preparation, G.L. and I.K.; writing—review and editing, G.L. and I.K.; visualization, I.K.; supervision, I.K.; project administration, G.L., K.C.; funding acquisition, G.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The current study was supported by the Development of new cancer diagnostic and therapeutic procedures in the National Institute of Oncology (FUTURE 2020–1.1.6.), National Laboratories Excellence program (TUDFO/51757/2019-ITM) and the Hungarian Thematic Excellence Programme (TKP2020-NKA-26).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted under the ethical permission of Scientific and Research Ethics Committee of the Medical Research Council (approval number: 15140/2017) and was carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Applied datasets contain personal data, therefore privacy issues do not allow sharing.

Acknowledgments: The authors are deeply indebted to Anikó Horváth for her editing work, Edit Marosi for her contribution to the English translation, Andrea Ladányi for her critical revision, and Erika Tóth, Head of Department of Tumor Pathology, for kindly supporting the project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Erdmann, F.; Lortet-Tieulent, J.; Schuz, J.; Zeeb, H.; Greinert, R.; Breitbart, E.W.; 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*, 385–400. [CrossRef]
2. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D.M.; Pineros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* **2019**, *144*, 1941–1953. [CrossRef]
3. Larkin, J.; Ascierto, P.A.; Dreno, B.; Atkinson, V.; Liszkay, G.; Maio, M.; Mandala, M.; Demidov, L.; Stroyakovskiy, D.; Thomas, L.; et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 1867–1876. [CrossRef]
4. Chapman, P.B.; Hauschild, A.; Robert, C.; Haanen, J.B.; Ascierto, P.; Larkin, J.; Dummer, R.; Garbe, C.; Testori, A.; Maio, M.; et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 2507–2516. [CrossRef] [PubMed]
5. Hodi, F.S.; O’Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 711–723. [CrossRef]
6. Shain, A.H.; Yeh, I.; Kovalyshyn, I.; Sriharan, A.; Talevich, E.; Gagnon, A.; Dummer, R.; North, J.; Pincus, L.; Ruben, B.; et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1926–1936. [CrossRef]
7. Griewank, K.G.; Schilling, B.; Scholz, S.L.; Metz, C.H.; Livingstone, E.; Sucker, A.; Moller, I.; Reis, H.; Franklin, C.; Cosgarea, I.; et al. Oncogene status as a diagnostic tool in ocular and cutaneous melanoma. *Eur. J. Cancer* **2016**, *57*, 112–117. [CrossRef]
8. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954. [CrossRef]
9. Platz, A.; Egyhazi, S.; Ringborg, U.; Hansson, J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol. Oncol.* **2008**, *1*, 395–405. [CrossRef]
10. Liu, W.; Kelly, J.W.; Trivett, M.; Murray, W.K.; Dowling, J.P.; Wolfe, R.; Mason, G.; Magee, J.; Angel, C.; Dobrovic, A.; et al. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF(T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J. Investig. Dermatol.* **2007**, *127*, 900–905. [CrossRef] [PubMed]
11. Milagre, C.; Dhomen, N.; Geyer, F.C.; Hayward, R.; Lambros, M.; Reis-Filho, J.S.; Marais, R. A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5549–5557. [CrossRef]
12. Bos, J.L. Ras oncogenes in human cancer: A review. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4682–4689.
13. Dummer, R.; Schadendorf, D.; Ascierto, P.A.; Arance, A.; Dutriaux, C.; Di Giacomo, A.M.; Rutkowski, P.; Del Vecchio, M.; Gutzmer, R.; Mandala, M.; et al. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 435–445. [CrossRef]
14. Heppt, M.V.; Siepmann, T.; Engel, J.; Schubert-Fritschle, G.; Eckel, R.; Mirlach, L.; Kirchner, T.; Jung, A.; Gesierich, A.; Ruzicka, T.; et al. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: A German study from routine care. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 536. [CrossRef] [PubMed]
15. Gonzalez, A. Sentinel Lymph Node Biopsy: Past and Present Implications for the Management of Cutaneous Melanoma with Nodal Metastasis. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2018**, *19*, 24–30. [CrossRef]
16. Liszkay, G.; Orosz, Z.; Peley, G.; Csuka, O.; Plotar, V.; Sinkovics, I.; Banfalvi, T.; Fejos, Z.; Gilde, K.; Kasler, M. Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma. *Melanoma Res.* **2005**, *15*, 509–513. [CrossRef] [PubMed]
17. Smoller, B.R.; Gershenwald, J.E.; Scolye, R.A.; Brown, J.A.; Crowson, A.N.; Divaris, D.; Frishberg, D.P.; McNiff, J.M.; Phung, T.L.; Prieto, V.G.; et al. Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Melanoma of the Skin (Version 4.0.1.0). Available online: <https://documents.cap.org/protocols/cp-skin-melanoma-17protocol-4010.pdf> (accessed on 29 June 2017).
18. Jansen, L.; Nieweg, O.E.; Peterse, J.L.; Hoefnagel, C.A.; Olmos, R.A.; Kroon, B.B. Reliability of sentinel lymph node biopsy for staging melanoma. *Br. J. Surg.* **2000**, *87*, 484–489. [CrossRef]

19. Morton, D.L.; Cochran, A.J.; Thompson, J.F.; Elashoff, R.; Essner, R.; Glass, E.C.; Mozzillo, N.; Nieweg, O.E.; Roses, D.F.; Hoekstra, H.J.; et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: Accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann. Surg.* **2005**, *242*, 302–311. [[CrossRef](#)]
20. Morton, D.L.; Thompson, J.F.; Cochran, A.J.; Mozzillo, N.; Nieweg, O.E.; Roses, D.F.; Hoekstra, H.J.; Karakousis, C.P.; Puleo, C.A.; Coventry, B.J.; et al. Final trial report of sentinel-node biopsy versus nodal observation in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 599–609. [[CrossRef](#)]
21. Long, G.V.; Menzies, A.M.; Nagrial, A.M.; Haydu, L.E.; Hamilton, A.L.; Mann, G.J.; Hughes, T.M.; Thompson, J.F.; Scolyer, R.A.; Kefford, R.F. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 1239–1246. [[CrossRef](#)]
22. Ekedahl, H.; Cirenajwis, H.; Harbst, K.; Carneiro, A.; Nielsen, K.; Olsson, H.; Lundgren, L.; Ingvar, C.; Jonsson, G. The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br. J. Dermatol.* **2013**, *169*, 1049–1055. [[CrossRef](#)]
23. Carlino, M.S.; Haydu, L.E.; Kakavand, H.; Menzies, A.M.; Hamilton, A.L.; Yu, B.; Ng, C.C.; Cooper, W.A.; Thompson, J.F.; Kefford, R.F.; et al. Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 292–299. [[CrossRef](#)]
24. Shinozaki, M.; O’Day, S.J.; Kitago, M.; Amersi, F.; Kuo, C.; Kim, J.; Wang, H.J.; Hoon, D.S. Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2068–2074. [[CrossRef](#)]
25. Ny, L.; Hernberg, M.; Nyakas, M.; Koivunen, J.; Oddershede, L.; Yoon, M.; Wang, X.; Guyot, P.; Geisler, J. BRAF mutational status as a prognostic marker for survival in malignant melanoma: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* **2020**, *59*, 833–844. [[CrossRef](#)]
26. Akslen, L.A.; Angelini, S.; Straume, O.; Bachmann, I.M.; Molven, A.; Hemminki, K.; Kumar, R. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J. Investig. Dermatol.* **2005**, *125*, 312–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ellerhorst, J.A.; Greene, V.R.; Ekmekcioglu, S.; Warneke, C.L.; Johnson, M.M.; Cooke, C.P.; Wang, L.E.; Prieto, V.G.; Gershenwald, J.E.; Wei, Q.; et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 229–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Manninen, A.A.; Gardberg, M.; Juteau, S.; Ilmonen, S.; Jukonen, J.; Andersson, N.; Carpen, O. BRAF immunohistochemistry predicts sentinel lymph node involvement in intermediate thickness melanomas. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0216043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Adler, N.R.; Wolfe, R.; McArthur, G.A.; Kelly, J.W.; Haydon, A.; McLean, C.A.; Mar, V.J. Tumour mutation status and melanoma recurrence following a negative sentinel lymph node biopsy. *Br. J. Cancer* **2018**, *118*, 1289–1295. [[CrossRef](#)]
30. Pracht, M.; Mogha, A.; Lespagnol, A.; Fautrel, A.; Mouchet, N.; Le Gall, F.; Paumier, V.; Lefeuvre-Plesse, C.; Rioux-Leclerc, N.; Mosser, J.; et al. Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2015**, *8*, 1530–1538. [[CrossRef](#)]
31. Leonardi, G.C.; Candido, S.; Falzone, L.; Spandidos, D.A.; Libra, M. Cutaneous melanoma and the immunotherapy revolution (Review). *Int. J. Oncol.* **2020**, *3*, 609–618. [[CrossRef](#)]
32. Griewank, K.G.; Murali, R.; Puig-Butille, J.A.; Schilling, B.; Livingstone, E.; Potrony, M.; Carrera, C.; Schimming, T.; Möller, I.; Schwamborn, M.; et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **2014**, *9*, dju246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Dabrafenib Therapy in 30 Patients with Melanoma Metastatic to the Brain: a Single-centre Controlled Retrospective Study in Hungary

Eszter Gorka¹  · Dániel Fabó² · András Gézsi³ · Kata Czirbesz¹ · Imre Fedorcsák² · Gabriella Liskay¹

Received: 9 April 2017 / Accepted: 23 May 2017 / Published online: 1 June 2017
© Arányi Lajos Foundation 2017

Abstract Dabrafenib is a potent BRAF inhibitor, which showed intracranial tumor activity. The purpose of our retrospective analysis was to evaluate the efficacy of dabrafenib for patients with melanoma brain metastasis (BM). We studied 30 BRAF mutant melanoma patients with BM, who received dabrafenib after local control of the brain between 2014 and 2017. Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG) was 0–2. The control arm consisted of 204 melanoma patients from our institutional melanoma database with BM and ECOG 0–2 treated with local therapies and/or chemotherapy, between 2003 and 2015. We found the intracranial disease control rate (DCR) was 83% including four (13%) complete remissions (CR), nine (30%) partial remissions (PR) and twelve (40%) stable diseases (SD) in contrast to five (17%) progressive diseases (PD). With a median follow-up of 14 months, median progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were 5.5 months, and 8.8 months, respectively. If calculated from BM onset, the OS turned to be 11.8 months on the dabrafenib arm, while it was only 6.0 months in the control arm (HR = 0.45, $p = 0.0014$). Higher risk of progression was observed with increasing ECOG (HR = 4.06, $p = 0.00027$) and if more than 2 extracranial organs were involved (HR = 3.4, $p = 0.0077$). Elevated lactate dehydrogenase (LDH) was non-significantly associated with worse clin-

ical outcome. Remarkable intracranial activity of dabrafenib in real practice was confirmed by our analysis.

Keywords Dabrafenib · Melanoma · Brain metastases · Targeted therapy · BRAF

Introduction

Patients with advanced malignant melanoma have a high rate of intracranial spread and this serious, hard to treat complication determines life expectancy. For a long time therapeutic modalities for BM were limited to surgical resection, stereotactic radiosurgery and whole-brain radiotherapy as local control and systemic chemotherapy, all of them with modest therapeutic results. Although in the past 5 years numerous new therapies, like immunotherapies (anti-CTLA4 ipilimumab, PD1 blocking nivolumab, pembrolizumab), targeted monotherapies (vemurafenib, dabrafenib) and targeted BRAF inhibitor-MEK inhibitor combination therapies (vemurafenib-cobimetinib, dabrafenib-trametinib) were licensed by the American and European authorities for metastatic melanoma, we have inconclusive information about their intracranial effect, as the presence of BM was an exclusion criterion from the majority of clinical trials. This trend seems to change recently, and several clinical studies have demonstrated the intracranial activity of targeted therapies [1–3]. Interestingly, the incidence of BRAF mutation occurs more frequently in the brain than in any other metastatic sites [4], and BM might be more common in patients with BRAF mutation than in those with wild-type BRAF [5].

Dabrafenib is a new targeted therapy, a BRAF-kinase inhibitor, like vemurafenib, but theoretically with better effect on BM according to a recent preclinical study, which established that dabrafenib may show greater brain penetration in mouse brain compared with vemurafenib after a single oral dose of drug [6].

✉ Eszter Gorka
goreszter@yahoo.com

¹ Dermatooncology Department, National Institute of Oncology, Ráth György str. 7-9, Budapest H-1122, Hungary

² Epilepsy Centrum, Department of Neurology, National Institute of Clinical Neurosciences, Amerikai str. 57, Budapest H-1145, Hungary

³ Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, Nagyváradi sq. 4, Budapest H-1084, Hungary

Our aim was to confirm the promising clinical study results in real-life practice regarding the effect of dabrafenib monotherapy for BM.

Materials and Methods

We investigated 30 melanoma patients with asymptomatic BM, verified BRAF mutation, and ECOG 0–2 who received dabrafenib therapy between 2014 and 2017. 150 mg b.i.d. dabrafenib was administered orally for all patients, until disease progression, death or unacceptable adverse events (AEs), consistently with the labeled indication. Routine efficacy and toxicity data were collected throughout treatment scheduled in 28-day dosing cycles and studied retrospectively. Radiological assessments by magnetic resonance imaging (MRI) or contrast enhanced computed tomography (CT) were performed at baseline, at 2 months, and every 3 months thereafter. Intracranial and extracranial tumor response was assessed by the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) version 1.1. We extended RECIST to include up to 5 target lesions and allowed intracranial target lesions of at least 5 mm in diameter. AEs were assessed with the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.03. Dose modification and interruptions were carried out in case of grade 3 or worse treatment related AE.

We evaluated the benefit of dabrafenib versus other previously existing modes of treatment in melanoma patients with BM. We identified 281 patients from our melanoma database with BM who did not received dabrafenib but underwent local therapies and/or chemotherapy between 2003 and 2015. 204 patients with ECOG 0–2 was used as control group. There was no significant difference in terms of the age and ECOG between the patients in the two arms, however, the gender differed significantly, therefore we used it as a covariate while comparing the two patient groups. The BRAF status of the patients in the historical group were mostly not identified.

This study was approved by our institutional review board and it was done in accordance with both the Declaration of Helsinki and International Conference of Harmonisation Good Clinical Practice.

Statistical Methods

DCR was determined as the sum of CR, PR and SD rates, while ORR as the sum of CR and PR rates. All these measures were classified on the basis of the best response recorded. We determined responses for intracranial and extracranial sites separately. OS was defined as the time interval between the start of dabrafenib therapy and death or last date of follow-up. PFS was calculated from the beginning of the therapy to the first

intracranial/extracranial progression or to death of any cause. PFS and OS were calculated using the Kaplan-Meier method.

The effect of the variables (ECOG, LDH level, number of BM, size of BM, number of extracranial organs involved, BRAF mutation type) on PFS and OS was determined by Cox regression analysis. The significance of the models was evaluated by the log-rank test and results with two-sided *P*-values <0.05 were considered significant. All analysis was performed in R statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; version 3.0.3.) using the survival package.

Results

Patients

Clinical characteristics of the involved 30 patients are shown in Table 1. All patients had cerebral dissemination, 70% of patients had more than 2 BM. Four patients were previously untreated, and 26 treated with different combinations of „classic therapies” such as chemotherapy (6 patients) and local

Table 1 Patient population, dabrafenib arm

Age (years)	59.2 (21.8–75.1)
Gender	
Male	15 (50%)
Female	15 (50%)
Breslow tumor depth (median and range in mm)	3.9 (0.7–21)
Eastern cooperative oncology group performance status	
0	10 (33.3%)
1	12 (40%)
2	8 (26.7%)
Elevated lactate dehydrogenase level at baseline (higher than the upper limit of normal range)	17 (56.6%)
Number of brain metastases	
1	5 (16.7%)
2	4 (13.3%)
2<	21 (70%)
Number of extracranial organs involved with metastases	
≥	21 (70%)
2<	9 (30%)
BRAF mutation	
V600E	25 (83%)
V600K	5 (17%)
Previous treatment	
Surgical resection	9 (30%)
Stereotactic radiosurgery	10 (33%)
Whole brain radiotherapy	16 (53%)
Chemotherapy	6 (20%)
Vemurafenib therapy	2 (7%)

Table 2 Patient characteristics, control arm

Age (years)	56.7 (21–83.1)
Gender	
Male	131 (64%)
Female	73 (36%)
Eastern cooperative oncology group performance status	
0	41 (20%)
1	104 (51%)
2	59 (29%)
Number of brain metastases	
1	72 (35%)
2	40 (20%)
2<	92 (45%)
Number of extracranial organs involved with metastases	
2≥	169 (83%)
2<	35 (17%)
Treatment	
Surgical resection	90 (44%)
Stereotactic radiosurgery	88 (43%)
Whole brain radiotherapy	145 (71%)
Chemotherapy	149 (73%)

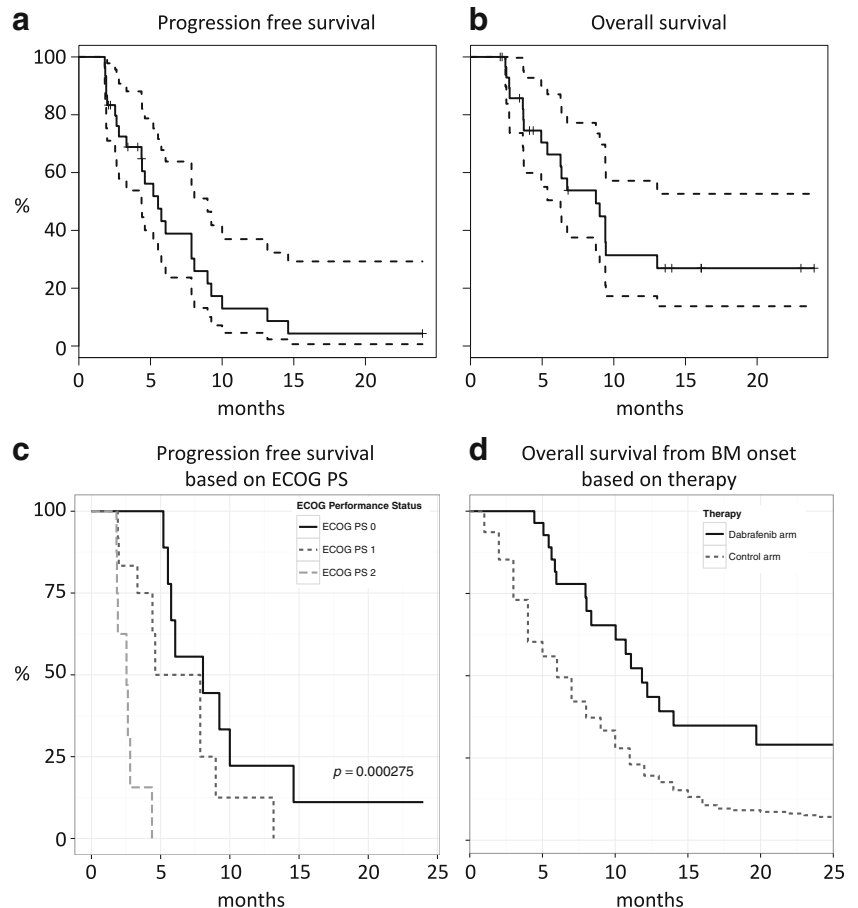
therapy (26 patients) including surgical resection (9 cases), stereotactic radiosurgery (10 cases) or whole brain radiation therapy (16 cases). Two patients received prior vemurafenib therapy until progression.

The control arm consisted of 204 patients (Table 2). Proportion of patients falling under ECOG categories of 0, 1, and 2 was 20%, 51%, and 29% respectively. More than 2 BM were detected in 45% of patients and more than 2 extracranial organs were involved in 17% of patients. The patients received complex oncotherapy, 44% of patients underwent surgical resection, 43% were eligible for stereotactic radiosurgery, 71% had whole brain radiotherapy and 73% received chemotherapy.

Tumor Response/ Clinical Outcome

During dabrafenib therapy four patients showed CR (13%), 9 PR (30%), 12 SD (40%) and 5 PD (17%), resulting intracranial DCR being 83% and the intracranial ORR 43%. Response rates were similar in extracranial sites (DCR: 77%, ORR: 37%), except that no CR was recorded extracranially. With a median follow-up of 14 months, median PFS was 5.5 months (Fig. 1a), OS was 8.8 months (Fig. 1b).

Fig. 1 Probability versus time Kaplan-Maier curves. **a** Progression free survival. **b** Overall survival. Solid line indicates survival, dashed line 95% CI. **c** Progression free survival by ECOG performance status. Solid line indicates ECOG 0, black dashed line ECOG 1 and grey dashed line ECOG 2. **d** Overall survival calculated from BM development on, comparing dabrafenib arm (solid line) to control arm where patients have not received dabrafenib (dashed line)



ECOG at study entry significantly predicted the PFS (HR = 4.06, 95% CI: 1.9–8.62; $p = 0.00027$) (Fig. 1c). The PFS was 8, 6.2 and 2.5 months for ECOG 0, 1 and 2 respectively. In cases of 0–2 extracranial organs were involved by melanoma, PFS turned to be 7.9 months, contrarily it was 2.6 months if more than 2 extracranial organs were affected (HR = 3.4, 95% CI: 1.39–8.65; $p = 0.0077$). Elevated LDH non-significantly associated with worse clinical outcome (HR = 2.25, 95% CI: 0.92–5.5; $p = 0.07$). Patients with normal LDH had a median PFS of 7.5 months, versus those with elevated LDH had it of 4.2 months. The number ($p = 0.9$) and size ($p = 0.6$) of BM and the presence of BRAF V600 K or V600E ($p = 0.7$) made no difference in PFS. There are 6 ongoing medications at the time of this analysis. We had to discontinue dabrafenib therapy due to intracranial progression in 5 cases, progression elsewhere despite stable BM in 8 cases and progression both in intracranial and extracranial sites in 11 cases.

The OS from BM development was 11.8 months in the dabrafenib group, and 6 months in the control arm (HR = 0.45, 95% CI: 0.27–0.74; $p = 0.0014$) (Fig. 1c). The OS of the entire dabrafenib free population irrespective of ECOG was 4 months.

Adverse Events

The most common treatment-related AEs were hyperkeratotic lesions, observed in 12 patients (40%), including verruca vulgaris (5 patients, 17%), keratoacanthoma (2 patients, 7%) and squamous cell carcinoma (1 patient, 3%) (Table 3). We detected liver enzymes elevation in 6 patients (20%). Five patients had rash (17%), four had decreased appetite (13%). Fatigue, balding and hacking cough was experienced by 3–3 patients (10%). In 3 of 30 patients (10%) treatment-related pyrexia occurred.

Three AEs was of grade 3: a maculopapular rash, 1 development of new melanoma and 1 development of squamous cell carcinoma as a result of the dabrafenib treatment. 27 patients (90%) had no treatment-related AE worse than grade 2, and 9 patients (30%) had no AE at all. No permanent discontinuation was necessary by reason of intolerable toxicity. Temporary dose interruption (1 or 2 weeks) was performed 5 times and 2 patients required dose reduction because of recurrent grade 2–3 adverse events (GGT elevation and squamous cell carcinoma after keratoacanthoma).

Discussion

Malignant melanoma has a remarkably high propensity for BM and after having metastasized to the brain, it carries a poor outcome. Even with the use of all combinations of surgical resection, stereotactic radiosurgery, whole brain radiotherapy and systemic chemotherapy, the median OS time after BM onset is generally reported to be only approximately 4 months [7–9]. The recent discovery of targeted therapies has led to significant advances in

Table 3 Frequencies of toxicity (CTCAE criteria)

Any event	21 (70%)
Hyperkeratosis	12 (40%)
Verruca vulgaris	5 (17%)
Keratoacanthoma	2 (7%)
Squamous cell carcinoma	1 (3%)
Increased concentrations of liver enzymes	6 (20%)
Rash	5 (17%)
Grade 3>	4 (13%)
Grade 3	1 (3%)
Decreased appetite	4 (13%)
Fatigue	3 (10%)
Balding	3 (10%)
Hacking cough	3 (10%)
Pyrexia	3 (10%)
Rash	2 (7%)
Arthralgia	2 (7%)
Nausea	1 (3%)
Development of a second melanoma (Grade 3)	1 (5%)
All adverse events \geq Gr3	3 (10%)
Dose interruption needed	5 (17%)
Permanent discontinuation	0 (0%)
Dose reduction needed	2 (7%)

treatment options, but initially their activity on BM was equivocal. A phase I study concluded dabrafenib as an efficacious treatment for untreated BRAF mutant melanoma with asymptomatic BM, showing the reduction of BM size in 90% of patients, including 40% CR [1]. The intracranial effect of the BRAF inhibitor dabrafenib was confirmed by the BREAK-MB phase II clinical trial which involved 171 patients with melanoma and asymptomatic BM and reported an OS of 33 weeks for whom had not received previous local treatment for BM and 31 weeks for those who had progressive BM after previous local treatments (7.2–7.7 months) [2].

Vemurafenib therapy could also achieve improvement in the outcomes of melanoma with BM according to retrospective analyses where PFS ranged from 3.3 to 5.4 months, OS from 4.9 to 10.7 months [3, 10, 11].

In contrast with randomized controlled trials, our observational study afforded the opportunity to characterize outcomes in the real-world setting. Results of our study suggest that beneficial outcomes are associated with dabrafenib. Our intracranial DCR of beyond 80% corresponded to the literature data [1, 2]. Although our intracranial CR rate of 13% differed from those of large clinical trial results, as Falchook et al. reported 40% and the BREAK-MB trial found only 0–3% CR rate, ours was roughly consistent with other studies of 8.7% [12] or 7% [13].

Our PFS of 5.5 months equalled to [12] or slightly exceeded the previously published PFS data of 4.2 months

[1], of 3.7–3.8 months [2] or of 4.6 months [14]. Our 8.8 months OS data was also similar to other reported OS results, like 7.2–7.7 months [2] or 8.5 months [12]. Based on the findings of BREAK-MB trial, which suggested the major benefit for patients with ECOG 0, V600E mutation and normal LDH level [2], we analyzed the clinical factors in connection with the PFS. Increasing ECOG (HR = 4.06, 95% CI: 1.9–8.62; $p = 0.00027$) and increased number of extracranial organs involved (HR = 3.4, 95% CI: 1.39–8.65; $p = 0.0077$) strongly affected the PFS despite the small sample size. Elevated LDH showed correlation to shorter PFS consistently with other studies [2, 13], however this effect was not significant. The number and size of BM and the presence of BRAF V600 K or V600E made no difference in PFS according to our analysis.

Our comparative analysis undoubtedly proved the benefit of dabrafenib versus other classical approaches in BRAF mutant melanoma patients with BM, since the OS calculated from BM onset was found to be 11.8 months versus 6 months in the control group with strong significance (HR = 0.45, 95% CI: 0.27–0.74; $p = 0.0014$).

Dabrafenib was safely administered. Our safety and tolerability results are mostly consistent with previous findings. The most relevant toxic effect, the transient fever occurred less frequently than reported [1, 15], palmpoplantar dysesthesia was not experienced at all contrary to other studies [2], hyperkeratosis and liver enzymes elevations were detected more frequently compared with previously published studies [1, 2].

Our analysis confirms the findings of clinical studies on the intracranial effect of dabrafenib therapy. Our results exceed the reported data of randomized clinical trials, but mostly correspond to observational studies in terms of PFS, OS and ORR.

Combination therapy such as dabrafenib plus trametinib has been demonstrated to further prolong survival in melanoma patients compared to dabrafenib alone [16, 17], however data for BM population will be provided from ongoing clinical trials.

Conclusion

The current analysis succeeded to confirm that dabrafenib had therapeutic effect on BM from melanoma in patients with BRAF mutation. Both PFS and OS improved with the use of dabrafenib, the significant OS improvement was demonstrated even by our comparative analysis versus local therapies and/or chemotherapy. According to our study dabrafenib was safely administered. As no strict inclusion or exclusion criteria were applied to our brain metastatic patient population, our setting represents the typical oncological practice better than clinical trials do.

Compliance with Ethical Standards

Funding Supported by Hungarian government (KTIA_NAP 13–1–2013-0001).

Conflict of Interest Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

References

1. Falchook GS, Long GV, Kurzrock R et al (2012) Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose escalation trial. *Lancet* 379(9829):1893–1901
2. Long GV, Trefzer U, Davies MA et al (2012) Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 13(11):1087–1095
3. Dummer R, Goldinger SM, Turtzchi CP et al (2014) Vemurafenib in patients with BRAF(V600) mutation-positive melanoma with symptomatic brain metastases: final results of an open-label pilot study. *Eur J Cancer* 50(3):611–621
4. Colombino M, Capone M, Lissia A et al (2012) Vemurafenib in patients with BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumours and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol* 30(20):2522–2529
5. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS et al (2012) NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 118(16):4014–4023
6. Mittapalli RK, Vaidhyanathan S, Dudek AZ et al (2013) Mechanisms limiting distribution of the threonine-protein kinase B-RaF(V600E) inhibitor dabrafenib to the brain: implications for the treatment of melanoma brain metastases. *J Pharmacol Exp Ther* 344(3):655–664
7. Davies MA, Liu P, McIntyre S et al (2011) Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. *Cancer* 117(8):1687–1696
8. Fife KM, Colman MH, Stevens GN et al (2004) Determinants of outcome in melanoma patients with cerebral metastases. *J Clin Oncol* 22(7):1293–1300
9. Sampson JH, Carter JH Jr, Friedman AH et al (1998) Demographics, prognosis, and therapy in 702 patients with brain metastases from malignant melanoma. *J Neurosurg* 88(1):11–20
10. Dzienis MR, Atkinson V. (2013) Response rate to vemurafenib in BRAF-positive melanoma brain metastases. *J Clin Oncol* 31, abstract 9081
11. Harding JJ, Catalanotti F, Munhoz RR et al (2015) A retrospective evaluation of Vemurafenib as treatment for BRAF-mutant melanoma brain metastases. *Oncologist* 20(7):789–797
12. Azer MW, Menzies AM, Haydu LE et al (2014) Patterns of response and progression in patients with BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain who were treated with dabrafenib. *Cancer* 120(4):530–536
13. Cocorocchio E, Gandini S, Alfieri S et al (2016) Dabrafenib in metastatic melanoma: a monocentric 'real life' experience. *Ecancermedalscience* 10:624

14. Lau DK, Andrews MC, Turner N et al (2014) A single-centre experience of patients with metastatic melanoma enrolled in a dabrafenib named patient programme. *Mel res* 24(2):144–149
15. Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV et al (2012) Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 380(9839):358–365
16. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H et al (2014) Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J med* 371(20):1877–1888
17. Schadendorf D, Amonkar MM, Stroyakovskiy D et al (2015) Health-related quality of life impact in a randomised phase III study of the combination of dabrafenib and trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with BRAF V600 metastatic melanoma. *Eur J Cancer* 51(7):833–840