

rezistence (4, 5). Proto byla zavedena kombinovaná terapie BRAF a MEK (MEK1/2, trametinib, cobimetinib) inhibitory s cílenou inhibicí v dalším stupni MAP kinázové signalizace (5). Trametinib a cobimetinib patří mezi selektivní reverzibilní inhibitory MEK 1/2 kináz, které jsou součástí MAP kinázové intracelulární signalizace. Jedná se o kinázový protein, který je uložen mezi proteinem BRAF a ERK kinázou. První inhibitor trametinib ukázal významnou účinnost v kombinaci s dabrafenibem ve studii COMBI-D. Cobimetinib byl zkoušen v kombinaci s vemurafenibem ve studii COMBI-V. Obě kombinace ve studiích prokázaly statisticky významné zlepšení celkového přežití a přežití bez progresu oproti monoterapii jen BRAF inhibitory. V dlouhodobém přežití byly výsledky obou studií spojeny (211 ve studii COMBI-D a 352 ve studii COMBI-V). Celková míra přežití do progresu (PFS) byla 21 % (95 % CI, 17–24) po 4 letech a 19 % (95 % CI, 15–22) po 5 letech. Celková míra OS byla 37 % (95 % CI, 33–42) po 4 letech a 34 % (95 % CI, 30–38) po 5 letech. Kompletní terapeutická odpověď byla u 109 pacientů (19%) a byla spojena s dlouhodobým efektem a trváním remise (6). Třetí dvojice BRAF a MEK inhibitorů, resp. encorafenibu a binimetinibu byla testována ve studii Columbus sledující efekt zmíněných inhibitorů oproti monoterapii vemurafenibem či encorafenibem. Medián sledování pro OS byl 36,8 měsíce (95 % CI, 0,47–0,79), medián OS pro kombinaci encorafenibu s binimetinibem byl 33,6 měsíce (95 % CI, 24,4–39,2) ve srovnání s 16,9 měsíci (95 % CI, 14,0–24,5) při terapii vemurafenibem (HR 0,61; 95 % CI, 0,47–0,79; $p < 0,0001$) (7). Tato studie prokázala na zatím nejlepší dlouhodobé výsledky OS pacientů na kombinované terapii BRAF a MEK inhibitory.

Výše popsané studie a znalosti o efektu imunoterapie melanomu *checkpoint* inhibitory nabídl možnost kombinované terapie, která by mohla navodit vyšší míru terapeutických odpovědí a současně prodloužit terapeutickou odpověď u pacientů s BRAF mutovaným melanomem (8). Jednou z těchto kombinací byla studie COMBI-i, která navíc zavedla třetí anti-PD-1 protilátku spartalizumab. Dostupná data z klinické fáze 1 a 2, při sledování 1 rok, byl OS 85,9 % (95% CI, 69–94) a kompletní remise byla pozorována dokonce u 1/3 všech pacientů (9). Tyto výsledky ukázaly

na poměrně zajímavé možnosti léčby, ale z posledních uveřejněných dat bohužel vyplývá, že kombinovaná terapie anti-PD-1 s cílenou terapií signifikantně neprodloužila PFS oproti kombinaci placebo a cílené terapie. Medián sledování byl 27,2 měsíce a medián PFS byl v kombinaci 16,2 měsíce oproti 12,0 měsícům v kombinaci jen s placebem (HR, 0,82; 95 % CI, 0,655–1,027; $p = 0,042$). Očekávané PFS po 12 měsících léčby bylo 58% oproti 50% pacientů a po 24 měsících terapie 44% oproti 36% pacientů. Tyto statistické údaje nepotvrdily původním očekávání a údaje z předchozích fází klinického testování (10). Výsledky této studie ukázaly na nutnost důslednějšího prozkoumání případného vlivu BRAF a MEK inhibitorů na imunitní systém, protože nadále je případná kombinace těchto léčiv jednou z možností k dosažení efektivnější a dlouhodobější terapie u pacientů s přítomnou BRAF mutací.

BRAF mutované nádory indukují imunitní „únikové“ mechanismy

Řada studií naznačuje, že BRAF mutované nádory, včetně melanomu, vytvářejí únikové mechanismy vedoucí k tzv. „cold“ (chudému) imunitnímu nádorovému mikroprostředí, které není schopno vytvořit adekvátní protinádorovou odpověď. BRAF mutované melanomy mohou vytvořit imunosupresivní mikroprostředí, které brání prezentaci nádorových antigenů antigen prezentujícími buňkám, jako jsou dendritické buňky (DC) a makrofágy, a tak i následně stimulaci T-lymfocytů. Ho a jeho spolupracovníci zjistili, že v počátečních fázích BRAF mutovaných nádorů je snížena exprese IFN gama, TNF alfa, IL-2 a např. exprese CD40L na CD4⁺ nádor infiltrujících lymfocytech (TILs) (11). Signalizace CD40/CD40L a IFN gama jsou zásadní imunologické faktory, které mohou zlepšit diferenciaci DC a pomáhají posílit aktivaci CD8⁺ T-lymfocytů (12). Navíc, nádor infiltrující dendritické buňky (TIDCs) izolované z BRAFV600E/PTEN melanomů nejsou schopny stimulovat proliferaci gp100-specifických (Pmel) CD8⁺ T-lymfocytů (11). V další řadě je snížena polarizace makrofágů M1 fenotypu, které produkují např. cytokiny IL-1 β , IL-12 a pomáhají vytvářet protinádorové mikroprostředí (11–13). Posílené makrofágy s M2 polarizací produkují IL-10 a VEGF a tlumí tak imunitní protinádoro-

vou odpověď (13). Další cestou ovlivnění imunitního systému je adekvátní exprese HLA molekul. MAP kinázová signalizace se ukázala jako dominantní regulátor exprese molekul HLA I. třídy. Bradley a jeho spolupracovníci prokázali, že BRAF mutované melanomy snižují expresi molekuly HLA I. třídy na svém buněčném povrchu prostřednictvím intracelulární posílené signalizace BRAF mutovanou kinázou (14). Celkově tyto výsledky ukazují, že konstitutivní upregulace signální dráhy MAP kinázy mutací genu BRAF může vést k pro-tumorogennímu mikroprostředí s potlačením protinádorové imunitní odpovědi.

Aktivace imunitního systému cílenou léčbou BRAF a MEK inhibitory

Vzhledem ke klinickým možnostem použití kombinované terapie BRAF a MEK inhibitory a po jejich selhání použití imunoterapie *checkpoint* inhibitory je důležité porozumět působení cílené terapie na nádorové imunitní mikroprostředí. BRAF a MEK inhibitory významně indukují protinádorovou imunitní reakci. BRAF inhibitory zvyšují expresi MHC molekul a indukují protinádorovou imunitní odpověď pomocí stimulace CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů (15). Situace u MEK inhibitorů je komplikovanější, jelikož jejich samotné podání posiluje spíše imunosupresivní účinky protinádorové imunitní reakce T-lymfocyty aktivací TCR receptoru a následně dochází k indukci apoptózy nádorově specifických T-lymfocytů. Tento imunosupresivní efekt lze blokovat např. použitím agonistů IL-15, který stimuluje T-lymfocyty pomocí aktivace PI3K kinázy (16). V *in vitro* modelování bylo navíc prokázáno, že MEK inhibitor trametinib může inhibovat funkci CD4⁺ T-lymfocytů, který lze blokovat použitím CD3/CD28 protilátek. Některé tyto poznatky nebyly ale potvrzeny v *in vivo* experimentech (17, 18). Obecně platí, že terapie BRAF a MEK inhibitory koreluje s infiltrací T-lymfocytů do nádorů a napomáhá vzniku nádor infiltrujících lymfocytů (TILs). Dostatečná infiltrace nádoru TILs je spojena s lepší terapeutickou odpovědí melanomu na *checkpoint* inhibitory. Zásadní musí být i dostatečná stimulace TILs nádorovými neoantigeny, která by v ideálním případě během cílené terapie BRAF a MEK inhibitory měla být dostatečná (díky rozpadu nádorových buněk). Na druhé straně může