

Received: 2011.09.23
Accepted: 2011.11.09
Published: 2011.11.23

Dakarbazyna jako lek przeciwczeraniakowy i referencyjny dla nowych programów terapeutycznych*

Dacarbazine, a chemotherapeutic against metastatic melanoma and a reference drug for new treatment modalities

Kamila Koprowska, Małgorzata Czyż

Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Czerniak jest nowotworem wywodzącym się z melanocytów, komórek pochodzenia neuroektodermalnego. Leczenie pacjentów z czerniakiem jest trudne ze względu na agresywny przebieg choroby oraz wczesne i liczne przerzuty. Podstawową metodą jest operacyjne usuwanie zmiany, co może być skuteczne jeżeli zostanie wykonane we wczesnym stadium rozwoju nowotworu. Natomiast mediana przeżycia chorych z czerniakiem w fazie przerzutów jest ciągle poniżej jednego roku. W 2011 roku zarejestrowano nowe leki przeciw czerniakowi w fazie przerzutów, ipilimumab i vemurafenib, które mogą przynieść przełom w walce z tym nowotworem. Potrzeba jednak czasu, aby stwierdzić czy któryś z nich zastąpi dakarbazyne, która od wielu lat stosowana jest w leczeniu pacjentów z czerniakiem w stadium IV, chociaż obiektywną odpowiedź kliniczną uzyskuje się zaledwie u 10–15% pacjentów. Mechanizm działania dakarbazyny przypuszczalnie polega na metylacji zasad purynowych w DNA. Jej mała skuteczność terapeutyczna wynika z szybkiego i efektywnego usuwania uszkodzeń DNA przez systemy naprawy. U podłoża małej skuteczności leków stosowanych w terapii czerniaka leży również zakres i charakter zmian w szlakach sygnałowych w komórkach tego nowotworu. Żadna z wcześniej podjętych prób kojarzenia dakarbazyny z innymi chemioterapeutykami nie przyniosła zadowalających wyników. Wyższe odsetki odpowiedzi obserwowane u pacjentów nie przekładały się na poprawę wskaźników przeżyć, natomiast często oznaczały nasilenie działań niepożądanych. Pewne nadzieje pokłada się w stosowaniu dakarbazyny w połączeniu z terapią celowaną lub immunoterapią, które to podejścia już przyniosły obiecujące wyniki w badaniach klinicznych. W pracy przedstawiono stan wiedzy na temat molekularnych mechanizmów działania dakarbazyny oraz jej analogu temozolomidu, z uwzględnieniem ostatnich wyników badań klinicznych opisujących ich zastosowania w terapiach złożonych.

Słowa kluczowe:

dakarbazyna • temozolomid • ipilimumab • vemurafenib • czerniak • leki przeciwnowotworowe • uszkodzenia DNA • apoptoza • immunoterapia • terapia celowana • immunomodulacja

Summary

Melanoma is a tumour derived from melanocytes, cells of neuroectodermal origin. Melanoma treatment represents a challenge to oncologists due to its aggressive course and early and multiple metastases. Surgical excision of lesions is a highly effective intervention, but only in early

* Artykuł opracowano w ramach projektu nr N N401 554940 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

stages. In contrast, median survival of patients with metastatic melanoma is still below one year. In 2011 the FDA and EMA have approved new drugs, ipilimumab and vemurafenib, that might be a major breakthrough in treating patients with advanced melanoma. However, time is needed to conclude whether they replace dacarbazine, a drug used for over 30 years in the therapy of metastatic melanoma, even if the response rate was only 10–15%. The mechanism of dacarbazine action is not clear but it is probably based on methylation of purine bases in DNA. The low therapeutic efficacy of dacarbazine might be the consequence of rapid removal of DNA lesions by repair systems. A high melanoma chemoresistance is also driven by the extent and nature of alterations in signal transductions in tumour cells. None of the previously conducted trials proved superiority of any treatment modality over monotherapy with dacarbazine. Higher response rates did not correlate with survival benefit, and more intense adverse effects were frequently observed. There are some expectations for targeted therapy and immunotherapy, which have already demonstrated some efficacy in clinical studies. This review aims at providing the current knowledge on dacarbazine and its analogue, temozolomide, including the latest results of clinical studies combining these drugs with other treatment protocols.

Key words: dacarbazine • temozolomide • ipilimumab • vemurafenib • melanoma • antitumour drugs • DNA damage • apoptosis • immunotherapy • targeted therapy • immunomodulation

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=966832>

Word count: 6285

Tables: 2

Figures: 4

References: 129

Adres autorki: prof. dr hab. Małgorzata Czyż, Zakład Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: malgorzata.czyz@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **4-BTG** – O⁶-(4-bromotenylo)-guanina (O⁶-(4-bromothenylo)guanine); **AIC** – 5-aminoimidazolo-4-karbonsamid; **Akt** – kinaza serynowo-treoninowa (PKB, protein kinase B); **ASO** – antysensowy oligonukleotyd (antisense nucleotide); **Bax** – proapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2 (Bcl-2-associated X protein); **Bcl-2** – rodzina białek pro- i antyapoptotycznych (B-cell lymphoma 2); **Bcl-x_L** – białko inhibitorowe apoptozy (B-cell lymphoma-extra large); **BER** – system naprawy przez wycinanie zasady (base-excision repair); **BOLD** – bleomycyna, winkrystyna, lomustyna, dakarbazyna (bleomycin, vincristine, lomustine and dacarbazine); **BRAF** – protoonkogenna kinaza serynowo-treoninowa (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1); **CEL** – celastrol (celastrol); **c-Kit** – receptor o aktywności kinazy tyrozynowej (tyrosine-protein kinase Kit); **CTLA-4** – antygen 4 związany z cytotoksycznymi limfocytami T (cytotoxic T-lymphocyte associated antygen 4); **CVD** – cisplatyna, winblastyna, dakarbazyna (cisplatin, vinblastine and dacarbazine); **CXCL** – ligand chemokiny (C-X-C chemokine ligand); **ΔNp73** – pozbawiona N-terminalnej domeny wersja białka p73 (p73 variant lacking the N-terminal transactivation domain); **DMF** – fumaran dimetylu (dimethylfumarate); **DTIC** – dakarbazyna, 5-(3,3-dimetylotriazeno)-imidazolo-4-karbonsamid (dacarbazine); **EMA** – Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency); **Erk** – kinaza aktywowana przez czynniki pozakomórkowe (extracellular signal-regulated kinase); **FDA** – Amerykańska Agencja do spraw Żywności i Leków (Food and Drug Administration); **HDAC** – deacetylaza histonowa (histone deacetylase); **HMTIC** – 5-(3-hydroksymetylo-3-metylotriazeno)-imidazolo-4-karbonsamid; **IAP** – rodzina białek hamujących apoptozę (inhibitor of apoptosis proteins); **IFN** – interferon (interferon); **IκB** – inhibitor czynnika transkrypcyjnego NF-κB (inhibitor of NF-κB); **IKK** – kompleks kinaz białkowych IκB (IκB kinase complex); **IL** – interleukina (interleukin); **LDH** – dehydrogenaza mleczanowa (lactate dehydrogenase); **Mcl-1** – białko różnicowania komórkowego białaczki szpikowej (myeloid cell leukaemia differentiation protein 1); **MDM2** – onkoproteina (murine double minute 2); **MEK** – kinaza kinaz MAP-Erk (MAP kinase kinase); **MGMT** – metylotransferaza O⁶-metyloguaniny (O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase); **MMR** – system naprawy błędnie sparowanych nukleotydów (mismatch repair); **MTIC** – 3-metylotriazen-1-ylo-imidazolo-4-karbonsamid; **mTOR** – kinaza serynowo-treoninowa (mammalian target of rapamycin); **N³-MeA** – N³-metyloadenina

(N³-methyladenine); **N⁷-MeG** – N⁷-metyloguanina (N⁷-methylguanine); **NF-κB** – czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB); **Noxa** – proapoptotyczne białko z rodziny Bcl-2 (BH3-only member of the Bcl-2 family); **O⁶-BG** – O⁶-benzyloguanina (O⁶-benzylguanine); **O⁶-MeG** – O⁶-metyloguanina (O⁶-methylguanine); **p53** – białko o masie cząsteczkowej 53 kDa, supresor nowotworów (protein 53); **p53wt** – „dzikie białko” p53 (wild-type p53); **PARP** – polimeraza poli(ADP-rybozy) (poly(ADP-ribose) polymerase); **PDGFR** – receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu (platelet-derived growth factor receptor); **PI3K** – kinaza fosfatydilinozytolu (phosphoinositide 3-kinase); **Ras** – rodzina kinaz protoonkogennych (rat sarcoma); **SCID** – wrodzony defekt odporności (severe combined immunodeficiency); **shRNA** – RNA o strukturze typu szpilki do włosów (short hairpin RNA); **TMZ** – temozolomid, 8-karbomoilo-3-metyloimidazo [5,1-d]-1,2,3,5-tetrazyn-4(3H)-on (temozolomide); **TNF** – czynnik martwicy nowotworu (tumour necrosis factor); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (vascular endothelial growth factor); **VEGFR** – receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyń (vascular endothelial growth factor receptor); **VPA** – kwas walproinowy (valproic acid).

WSTĘP

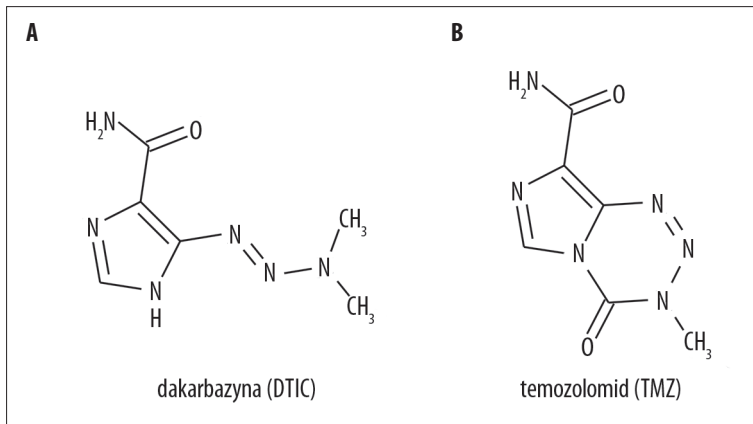
Czerniak jest nowotworem wywodzącym się z melanocytów, komórek barwnikowych pochodzenia neuroektodermalnego. Najczęściej występuje w skórze, ale w 10% przypadków rozwija się pierwotnie w innych narządach, głównie gałce ocznej oraz błonach śluzowych jamy ustnej i narządów płciowych. Czerniak skóry należy do nowotworów o najszybszej dynamice wzrostu zachorowań. Wykrywany jest głównie u ludzi w średnim i starszym wieku. Rokowanie w czerniaku zależne jest od stopnia zaawansowania klinicznego. We wczesnym stadium choroby skuteczność leczenia sięga ponad 90%. Natomiast w stadium przerzutów powoduje śmierć 75% pacjentów w ciągu pierwszych 5 lat od rozpoznania choroby. W Polsce nowotwór ten rejestrowany jest u około 2300 osób rocznie i powoduje prawie 1200 zgonów [127]. Dane zebrane przez Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów w Warszawie wskazują, że w Polsce każdego roku współczynnik zapadalności na czerniaka wzrasta średnio o 4%, a w latach 1982–2002 liczba zachorowań zwiększyła się niemal trzykrotnie. Leczenie pacjentów z czerniakiem stanowi ciągle wyzwanie dla onkologów ze względu na agresywny przebieg choroby, wczesne i liczne przerzuty oraz wyjątkową oporność na wszystkie dotąd stosowane terapie. Podstawową metodą leczenia jest operacyjne usunięcie zmiany. Radioterapia, ze względu na bardzo zróżnicowaną wrażliwość komórek czerniaka, jest stosowana głównie jako leczenie uzupełniające zabieg operacyjny lub paliatywny w przypadku przerzutów do kości i mózgu [98]. Przez wiele lat jedyną zaaprobowaną w Europie i Stanach Zjednoczonych metodą terapeutyczną dla pacjentów z czerniakiem w stadium IV była dakarbazyna (DTIC). Stosowanie tego leku wiąże się z uzyskaniem obiektywnej odpowiedzi klinicznej trwającej zaledwie 4–6 miesięcy u 10–15% chorych [32]. Innym podejściem terapeutycznym stosowanym w leczeniu pacjentów z przerzutami są wysokie dawki interleukiny 2 (IL-2), zarejestrowanej w 1998 roku przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration – FDA). Efekt leczenia uzyskuje się u większego odsetka pacjentów, ale ze względu na dużą toksyczność terapii, może być stosowana tylko u niektórych pacjentów i tylko w warunkach szpitalnych [45]. Mimo że czerniak jest nowotworem wysoce immunogennym i znane są swoiste antygeny komórek czerniaka rozpoznawane przez układ immunologiczny, to

wyniki immunoterapii przez lata były niezadowalające [45]. Prawdziwym przełomem w leczeniu pacjentów z czerniakiem w stadium przerzutów mogą być przeciwciała monoklonalne zaprojektowane jako immunomodulatory. Należy do nich ipilimumab, przeciwciało monoklonalne blokujące represor aktywacji limfocytów T i zarejestrowane w 2011 roku przez FDA i Europejską Agencję Leków (European Medicines Agency – EMA) do leczenia pacjentów z czerniakiem w stadium przerzutów [33]. Innym kierunkiem poszukiwań są terapietyki celowane, z których vemurafenib, inhibitor BRAF, został również zarejestrowany w tym roku. Nowe leki przyniosły nadzieję chorym z czerniakiem na skuteczniejsze leczenie. Czy nowe leki zastąpią dakarbazynę? Odpowiedź na to pytanie przyniosą najbliższe lata.

BUDOWA, AKTYWACJA I MECHANIZM DZIAŁANIA DAKARBAZYNY I TEMOZOLOMIDU

Dakarbazyna (5-[3,3-dimetylotriazeno]-imidazo-4-karboxamid; DTIC; ryc. 1A) jest cytostatykiem o działaniu fazowonieswoistym z klasy triazenów. Po raz pierwszy została otrzymana w 1959 roku przez Fulmera Shealy z Southern Research Institute w Birmingham (Stany Zjednoczone). Związek ten, ze względu na strukturalne podobieństwo do reszty 5-aminoimidazo-4-karboxamidu (AIC) obecnej w prekursorze kwasu inozynowego, miał pełnić rolę antymetabolitu w biosyntezie puryn [104]. Dalsze badania wykazały jednak, że aktywność DTIC wynika głównie z metylacji zasad purynowych w DNA. W maju 1975 roku DTIC została zaakceptowana przez FDA do leczenia pacjentów z czerniakiem oraz chorobą Hodgkina. DTIC jest również stosowana w terapii chorych z chłoniakami nieziarniczymi oraz mięsakami tkanek miękkich w fazie zaawansowanej, z wyjątkiem mięsaka Kaposiego. DTIC jest lekiem referencyjnym dla nowych związków o aktywności przeciwczerńiakowej, ocenianych w badaniach przedklinicznych i klinicznych.

Temozolomid (8-karbomoilo-3-metyloimidazo [5,1-d]-1,2,3,5-tetrazyn-4(3H)-on; TMZ; ryc. 1B), po raz pierwszy zsyntetyzowany w 1984 r. w Uniwersytecie Aston w Birmingham (Wielka Brytania), jest związkiem strukturalnie i funkcjonalnie podobnym do DTIC. Lipofilowy charakter cząsteczki pozwala na jej dobre przenikanie przez barierę krew–mózg, co znalazło zastosowanie w terapii chorych z pierwotnymi nowotworami mózgu, m.in. z gwiaździakiem anaplastycznym i glejakiem wielopostaciowym



Ryc. 1. **A** – wzór chemiczny dakarbazyny (DTIC);
B – wzór chemiczny temozolomidu (TMZ)

oraz z przerzutami czerniaka do mózgu [3]. Badania na szczurach oraz małpach wykazały, że stężenie TMZ w płynie mózgowo-rdzeniowym wynosi 30–40% maksymalnego stężenia osiąganego w osoczu, co dowodzi dobrej przenikalności tego związku do ośrodkowego układu nerwowego [83]. TMZ wykazuje podobną skuteczność terapeutyczną jak DTIC, ale charakteryzuje się większą biodostępnością i lepszym profilem toksyczności [77]. Kolejną przewagą TMZ nad DTIC jest jego większa stabilność w roztworach. Mimo licznych zalet tego związku, wyższa cena oraz brak istotnych różnic w trwałości odpowiedzi obserwowanej u chorych zdecydowały o niezarejestrowaniu TMZ do leczenia pacjentów z czerniakiem w stadium zaawansowanym, a jedynymi przesłankami do stosowania TMZ zamiast DTIC są zaburzenia funkcjonowania wątroby oraz obecność przerzutów do mózgu.

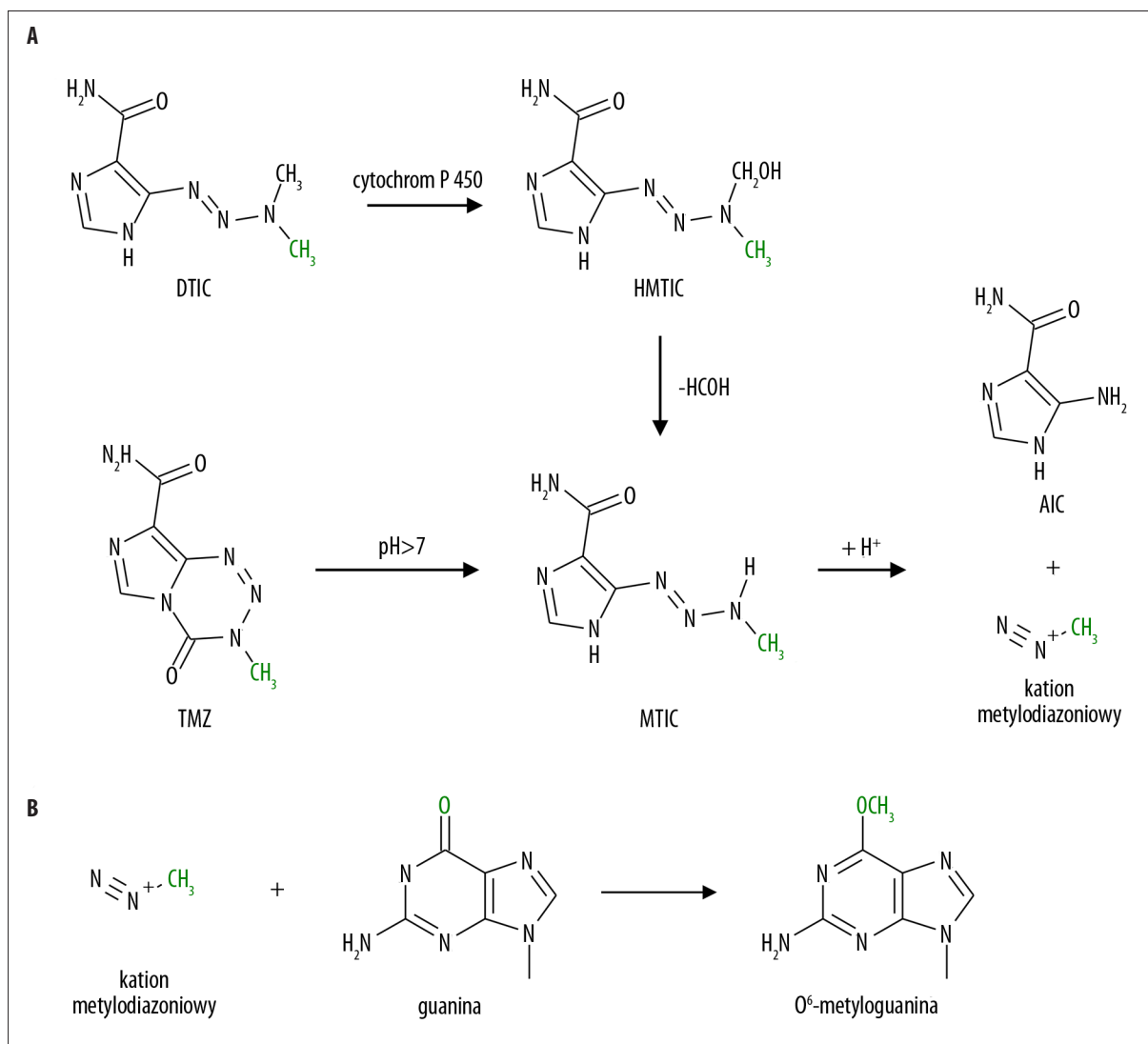
DTIC i TMZ, w postaci podawanej pacjentom, są nieczynne farmakologicznie. Aktywacja DTIC następuje w mikrosomach wątroby z udziałem różnych izoform cytochromu P450, spośród których dominującą rolę odgrywają izoformy CYP1A2 i CYP2E1 [90]. Zaobserwowano również właściwości katalizujące izoformy CYP1A1, której stężenie w wątrobie jest na granicy wykrywalności, chociaż jest obecna w tkankach niektórych nowotworów. Sugeruje to, że aktywacja DTIC może występować w obrębie guza. W pierwszym etapie aktywacji zostaje utworzony 5-[3-hydroksymetylo-3-metylotriazeno]-imidazolo-4-karboksamid (HMTIC), który następnie, po odłączeniu formaldehydu, przechodzi w aktywny 3-metylotriazen-1-ylo-imidazolo-4-karboksamid (MTIC). Związek ten jest niestabilny i natychmiast ulega rozpadowi do AIC, metabolitu ubocznego usuwanego z moczem oraz do kationu metyldiazoniowego, odpowiedzialnego za metylację zasad purynowych w DNA (ryc. 2A). W przeciwieństwie do DTIC, aktywacja TMZ nie wymaga katalizowanego enzymatycznie rozkładu w wątrobie [78]. Dzięki obecności węgla karbonylowego podatnego na nukleofilowy atak cząsteczki wody, w środowisku lekko zasadowym dwunastnicy TMZ ulega spontanicznej hydrolizie do aktywnego MTIC, który następnie samoistnie rozpada się na AIC i kation metyldiazoniowy (ryc. 2A).

Mimo kilkudziesięciu lat badań właściwości DTIC i TMZ, ich mechanizm działania nie został do końca wyjaśniony. Działanie cytotoksyczne może wynikać ze zdolności tych związków do alkilacji kwasów nukleinowych [47], hamowania wbudowywania zasad purynowych podczas syntezy DNA [51] lub oddziaływania z grupami tiolowymi białek

[101]. Przyjmuje się, że metylacja zasad purynowych przez kation metyldiazoniowy jest podstawowym mechanizmem działania DTIC i TMZ (ryc. 2B). Spośród kilkunastu miejsc metylowanych przez związki alkilujące najbardziej reaktywny jest atom N⁷ guaniny [57]. Jon metyldiazoniowy często reaguje również z atomem N¹ guaniny, N³ cytozyny oraz atomami N¹ i N³ adeniny. Znacznie rzadziej następuje alkilacja atomu O⁶ guaniny, ale właśnie ta modyfikacja uznawana jest za najbardziej mutageną [37]. Utworzenie O⁶-metyloguaniny (O⁶-MeG) indukuje w czasie replikacji jawowy cykl naprawy nieprawidłowo sparowanych nukleotydów (mismatch repair – MMR), który prowadzi do pojawienia się po dwóch podziałach komórkowych somatycznej mutacji punktowej reprezentowanej przez tranzycję G:C→A:T. Rezultatem jest śmierć komórek nowotworowych w wyniku apoptozy, nekrozy lub autofagii. To samo uszkodzenie DNA może indukować również inne procesy, m.in. starzenie się komórek lub zatrzymanie cyklu komórkowego [96].

FARMAKOKINETYKA DAKARBAZYN I TEMOZOLOMIDU

Pierwsze badania farmakokinetyczne DTIC wykazały, że po podaniu doustnym zaledwie 14–23% jest przyjmowane przez układ pokarmowy [107]. Dlatego w standardowej monoterapii chorych na czerniaka w stadium zaawansowanym, DTIC podawana jest dożylnie w dawkach 200–250 mg/m² powierzchni ciała/dobę przez 5 dni z przerwą 4-tygodniową lub 1000 mg/m² co 3 tygodnie. Lek jest usuwany w 46–52% w niezmienionej postaci przez układ moczowy [13]. Końcowy metabolit AIC jest wykrywany w osoczu krwi już po 15 min od podania leku [13]. Usuwanie DTIC z osocza krwi przebiega dwufazowo z biologicznymi czasami półtrwania leku $t_{1/2\alpha}$ wynoszącym zaledwie 20 min i $t_{1/2\beta}$, zależnym od dawki oraz stanu patofizjologicznego wątroby i nerek, równym 0,5–5 godz [13,36]. Duża objętość dystrybucji, tzn. hipotetyczna objętość płynów ustrojowych, w których lek w stanie niezmienionym osiągałby takie samo stężenie jak we krwi, wskazuje na gromadzenie DTIC w niektórych tkankach, prawdopodobnie w wątrobie. DTIC przenika przez barierę krew-mózg w ograniczonym zakresie. W płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono stężenie DTIC odpowiadające 14% maksymalnego stężenia osiąganego w osoczu. Istotnym problemem w stosowaniu DTIC jest niestabilność leku, zwłaszcza fotolityczna [105]. Stwierdzono, że diazoimidazolo-4-karboksamid i 2-azahipoksantyna, związki powstałe w wyniku ekspozycji DTIC na światło słoneczne, mogą powodować reakcję alergiczną u niektórych chorych i w rezultacie konieczność



Ryc. 2. Schemat aktywacji dakarbazyny i temozolomidu. **A** – pierwsze etapy aktywacji podawanej dożylnie dakarbazyny (DTIC), tj. utworzenie 5-(3-hydroksymetylo-3-metylo-triazeno)-imidazolo-4-karboksamidu (HMTIC), a następnie 3-metylotriazeno-1-ylo-imidazolo-4-karboksamidu (MTIC), zachodzą w mikrosomach wątroby z udziałem cytochromu P 450. Z kolei podawany doustnie temozolomid (TMZ) w lekko zasadowym pH dwunastnicy ulega spontanicznej hydrolizie do MTIC. Wspólny metabolit pośredni, MITC jest związkiem niestabilnym i natychmiast ulega rozpadowi do 5-aminoimidazolo-4-karboksamidu (AIC) i kationu metyldiazońskiego. **B** – kation metyldiazoński, zawierający aktywną grupę metylową (oznaczoną na rycinie zieloną czcionką), metylując zasady purynowe w DNA, odpowiada za cytotoksyczne działanie DTIC i TMZ

odstawienia leku [117]. Brak jest przeciwwskazań do stosowania DTIC z innymi lekami z wyjątkiem fotemustyny. Skutkiem interakcji między tymi związkami może być wystąpienie zespołu ostrej niewydolności oddechowej [46].

TMZ po podaniu doustnym ulega szybkiemu i całkowitemu wchłanianiu w przewodzie pokarmowym, osiągając maksymalne stężenie po 33–120 min u dorosłych pacjentów [78]. W moczu wykrywa się 5–10% TMZ w ciągu 24 godzin w stanie niezmiennym. Lek ten w niewielkim stopniu wiąże się z białkami (12–16%) [7]. Jego okres półtrwania w osoczu wynosi około 1,8 godziny. W przeciwieństwie do DTIC, nie ma dowodów na interakcje TMZ z innymi lekami przeciwnowotworowymi, w tym także z fotemustyną [14,74].

Stosowanie chemioterapeutyków zawsze wiąże się z występowaniem działań niepożądanych. W przypadku DTIC i TMZ są one przeważnie łagodne i łatwe do opanowania.

DTIC w dawce 850–1000 mg/m² jest dobrze tolerowana. U 90% pacjentów poddanych terapii DTIC występują nudności, wymioty, objawy grypopodobne oraz mielosupresja, znacznie rzadziej uszkodzenia wątroby, zaburzenia czynności nerek oraz wtórna białaczka. Najczęstszym działaniem niepożądanym występującym u chorych przyjmujących TMZ jest mielosupresja, głównie neutropenia i małopłytkowość. W porównaniu z DTIC, znacznie rzadziej, tylko u 10–15% pacjentów, obserwuje się nudności i wymioty.

OPORNOŚĆ NA DAKARBAZYNĘ I TEMOZOLOMID

Największą przeszkodą w skutecznym leczeniu pacjentów z czerniakiem w stadium zaawansowanym jest wyjątkowa oporność nowotworu, zarówno pierwotna jak i wtórna, na wszystkie dotychczas poznane związki. Chemiooporność komórek czerniaka związana jest z licznymi zmianami na poziomie komórkowym oraz genetycznym. Mała skuteczność

Tabela 1. DTIC jako lek referencyjny (wybrane przykłady)

Rodzaj badania	Leki/strategie porównywane	Wyniki	Piśmiennictwo
Randomizowane; czerniak przerzutowy (117 p)	DTIC tamoksifen	wyższe: ORR (28 vs. 12%), MS (9 vs. 5 m)	[21]
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (240 p)	CDBT (program Dartmouth)	porównywalne: MS; wyższe: ORR (18,5 vs. 10,2%); toksyczność	[17]
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (305 p)	TMZ	porównywalne: ORR, TR, OS, DFS; wyższe: PFS (1,9 vs. 1,5 m); poprawa jakości życia	[77]
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (771 p)	DTIC oblimersen	wyższe: ORR (13,5 vs. 7,5%), PFS (mediana, 2,6 vs. 1,6 m), OS (mediana, 11,4 vs. 9,7 m)	[8]
Randomizowane II fazy; czerniak przerzutowy (101 p)	DTIC sorafenib	wyższe: PFS (mediana, 21,1 vs. 11,7 w); niższe: OS (mediana, 45,6 vs. 51,3 w)	[76]
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (655 p)	tremelimumab	porównywalne: OS; badania przedwcześnie zakończone	[91]
Randomizowane II fazy; czerniak przerzutowy (129 p)	intetumumab	porównywalne: OS, ORR, PFS	[79]
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (502 p)	DTIC ipilimumab	porównywalne: PFS wyższe: ORR (15,2 vs. 10,3%), MS (11,2 vs. 9,1 m), MDR (19,3 vs. 8,1 m); toksyczność	[93]
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (675 p)	vemurafenib	wyższe: RR (48 vs. 5%), mediana PFS (5,3 vs. 1,6 m), badania trwają	[18]
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (200 p)	dabrafenib (GSK2118436)	badania trwają	www.clinicaltrials.gov ; NCT01227889
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (514 p)	ABI-007 (paklitaksel stabilizowany albuminą)	badania trwają	www.clinicaltrials.gov ; NCT00864253

CDB – cisplatyna, dakarbazyna, karmustyna; CDBT – cisplatyna, karmustyna, dakarbazyna, tamoksifen; CR (complete response) – całkowita odpowiedź; CVD – cisplatyna, winblastyna, dakarbazyna; DFS (disease-free survival) – czas przeżycia wolny od objawów choroby; m (month) – miesiąc; MDR (median duration of response) – mediana czasu trwania odpowiedzi; MS (median survival) – mediana przeżycia; ORR (overall response rate) – wskaźnik obiektywnej odpowiedzi; p (patient) – pacjent; PFS (progression-free survival) – czas przeżycia wolny od progresji; PR (partial response) – częściowa odpowiedź; w (week) – tydzień.

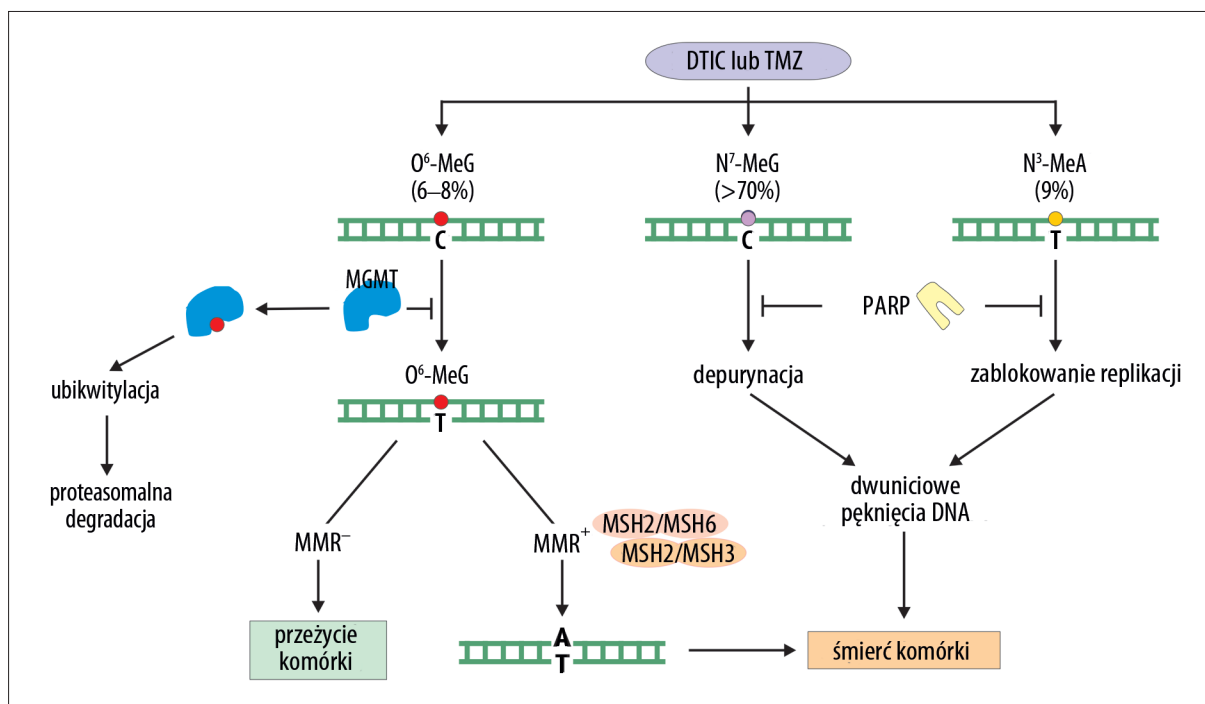
terapeutyczna związków metylujących, w tym DTIC i TMZ, wynika przede wszystkim z dużej wydajności mechanizmów naprawy DNA. Spośród pięciu dróg naprawy uszkodzeń DNA największe znaczenie odgrywiają: naprawa bezpośrednia z udziałem metylotransferazy O⁶-metyloguaniny (MGMT), system naprawy MMR oraz system naprawy przez wycinanie zasad azotowych (base excision repair – BER) (ryc. 3). Przyczyn lekooporności czerniaka można również upatrywać w zaburzeniach procesu apoptozy, będących wynikiem m.in. podwyższonej w tych komórkach aktywności czynnika transkrypcyjnego NF-κB, nieprawidłowego funkcjonowania białka p53 i/lub zmian w ekspresji białek pro- i antyapoptotycznych, głównie z rodziny Bcl-2.

Mechanizmy naprawy DNA

Wcześniej uzyskane wyniki sugerowały, że związki alkilujące generują uszkodzenia DNA, a w konsekwencji indukują śmierć tylko w komórkach czerniaka z obniżonym poziomem MGMT oraz sprawnym systemem MMR. Podjęto zatem próby mające na celu określenie zależności między ekspresją MGMT a wrażliwością pacjentów na terapię DTIC

lub TMZ. Analiza próbek nowotworu pobranych od 117 pacjentów z zaawansowanym czerniakiem leczonych TMZ nie dowiodła takiej korelacji [50]. Zaobserwowano natomiast nasilenie poważnych działań niepożądanych w grupie chorych ze zmetylowanym promotorem tej metylotransferazy. W prospektywnych badaniach przeprowadzonych w grupie 75 chorych otrzymujących standardową terapię DTIC wykazano, że chociaż hipermetylacja promotora MGMT korelowała z obniżeniem poziomu ekspresji tego białka, to nie przekładała się na lepsze działanie terapeutyczne [15]. Z kolei niska ekspresja MGMT okazała się czynnikiem prognostycznym wrażliwości na działanie DTIC. Ponadto zaobserwowano zależność ekspresji MGMT od głębokości naciekania guza pierwotnego w skali Breslowa [15].

Podjęte próby stosowania DTIC i TMZ z inhibitorami MGMT, O⁶-benzylguaniną (O⁶-BG) i O⁶-(4-bromotenylo)guaniną (4-BTG; obecnie znana jako lomeguatrib) nie potwierdziły hipotezy, że obniżenie poziomu MGMT zwiększa odsetek odpowiedzi wśród pacjentów z czerniakiem otrzymujących leki metylujące [59,86,109]. Ponadto zastosowanie O⁶-BG lub lomeguatribu obniżało stężenie MGMT



Ryc. 3. Mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA indukowanych dakarbazyną i temozolomidem. DTIC i TMZ metylują zasady purynowe w DNA. Mała skuteczność terapeutyczna tych leków jest konsekwencją dużej wydajności systemów naprawy DNA. Metylotransferaza O⁶-metyloguaniny (MGMT), przenosząc grupę metylową na resztę cysteiny obecnej w centrum katalitycznym (Cys145) enzymu, usuwa najbardziej mutagenne uszkodzenie – O⁶-metyloguaninę (O⁶-MeG). Niski poziom MGMT lub zablokowanie jej aktywności przez inhibitory powoduje akumulację O⁶-MeG, ale dopiero prawidłowe funkcjonowanie systemu naprawy błędnie sparowanych nukleotydów (MMR⁺) prowadzi do pojawienia się letalnej mutacji punktowej reprezentowanej przez tranzycję G:C→A:T. Zablokowanie systemu naprawy przez wycinanie zasad (BER), w którym główną rolę odgrywają polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP), również może prowadzić do śmierci komórki nowotworowej

również w komórkach krwi i szpiku kostnego, czyniąc je tym samym bardziej wrażliwymi na niepożądane działania chemioterapii [59,109,124]. Jedną z przyczyn obserwowanych rozbieżności między badaniami przedklinicznymi i klinicznymi może być szybkość uzupełniania puli dostępnych cząsteczek MGMT w komórkach czerniaka. Cytotoksyczność będąca rezultatem metylacji O⁶-guaniny przez DTIC i TMZ jest obserwowana dopiero po dwóch podziałach komórkowych. Tymczasem analiza ilości MGMT w komórkach czerniaka, dzielących się średnio co 7,2 dnia, wykazała, że białko to ulegało szybkiej reekspresji, poprzedzając drugą rundę replikacji DNA [125]. Czas podwojenia populacji czerniaka ustalonych linii komórkowych wynosi prawie 24 godziny, co może tłumaczyć zwiększenie skuteczności działania TMZ w skojarzeniu z inhibitorami MGMT w tych warunkach. Względnie krótki czas podziału komórek szpiku kostnego, w porównaniu do komórek czerniaka, może być przyczyną obserwowanej zwiększonej hematotoksyczności leczenia skojarzonego TMZ i O⁶-BG lub lomeguatribu. Heterogenność ekspresji MGMT w tkankach nowotworowych może być kolejnym wytłumaczeniem braku efektywności inhibitorów MGMT w badaniach klinicznych.

Chociaż aktywność przeciwnowotworowa DTIC i TMZ wynika głównie ze zdolności tych leków do metylacji atomu O⁶ guaniny, to zmetylowane adenina (N³-MeA) lub guanina (N⁷-MeG), nieusunięte przez system BER, również wywołują apoptozę (ryc. 3). Główną rolę w tym mechanizmie naprawy DNA odgrywają polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) [62]. Liczne badania *in vitro* oraz *in vivo*

wykazały, że komórki czerniaka z zahamowaną aktywnością białka PARP są bardziej wrażliwe na działanie związków alkilujących, w tym TMZ [82,110,111,116]. W badaniach klinicznych [9,85] dawki terapeutyczne inhibitorów wydajnie hamujące aktywność PARP były dobrze tolerowane przez chorych i nie wiązały się z wystąpieniem poważniejszych działań niepożądanych. Do badania II fazy włączono 40 niepoddanych wcześniej chemioterapii pacjentów z czerniakiem. W ciągu pierwszego roku w grupie chorych przyjmujących TMZ z inhibitorem PARP AG014699 zaobserwowano 4 przypadki odpowiedzi częściowej oraz kolejne 4 stabilizacji choroby [85]. Jednak zastosowanie TMZ w skojarzeniu z tym inhibitorem PARP nasilało mielosupresję indukowaną związkiem alkilującym, a nawet doprowadziło do śmierci z powodu gorączki neutropenicznej jednego z pacjentów. Efektywność innego inhibitora PARP, olaparibu (AZD2281, KU0059436), oceniano z DTIC, ale i w tym badaniu I fazy nie wykazano wyższości kombinacji dwulekowej nad monoterapią DTIC [61].

Zaburzenia w procesie apoptozy

Zaburzenia w procesie apoptozy uznawane są za jedną z przyczyn rozwoju lekooporności wielu nowotworów, w tym czerniaka. W regulacji tego procesu biorą udział białka o działaniu pro- i antyapoptotycznym, głównie z rodziny Bcl-2 oraz grupy białek inhibitora apoptozy (inhibitor of apoptosis proteins – IAP). Ekspresja tych białek jest pod kontrolą wielu czynników transkrypcyjnych, m.in. NF-κB i p53, które w komórkach nowotworowych często wykazują nieprawidłową aktywność.

NF-κB

Czynnik transkrypcyjny NF-κB reguluje wiele procesów fizjologicznych, w tym odpowiedź immunologiczną i angiogenezę oraz patofizjologicznych m.in. związanych z transformacją nowotworową. Duża aktywność tego czynnika transkrypcyjnego może się również przyczyniać do rozwoju oporności na związki alkilujące [12]. W komórkach czerniaka NF-κB jest konstytutywnie aktywny, co zwiększa potencjał proliferacyjny, inwazyjny i metastatyczny [66]. Niektóre chemioterapeutyki, np. cisplatyna, mogą dodatkowo zwiększać aktywność NF-κB w komórkach czerniaka [28]. W odpowiedzi na działanie DTIC i TMZ stwierdzano zarówno aktywację, jak i hamowanie aktywności NF-κB, co wydaje się zależeć od zmian na poziomie molekularnym w komórkach czerniaka oraz metod stosowanych do oceny aktywności NF-κB. Wykazano, że TMZ hamuje aktywność czynnika NF-κB, zarówno *in vitro* w komórkach niektórych linii czerniaka [128], jak i w modelach zwierzęcych czerniaka [129]. W innych badaniach, obserwowano zarówno zwiększoną aktywność tego czynnika transkrypcyjnego w komórkach traktowanych DTIC [68], jak i wzmożoną przez TMZ translokację NF-κB do jądra [5]. Wykazano, że dwudniowa stymulacja DTIC komórek czerniaka linii SB2 i MeWo zwiększyła ekspresję oraz sekrecję czynników angiogennych, interleukiny 8 (IL-8) i czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), co wydaje się konsekwencją, przynajmniej częściowo, aktywacji czynnika NF-κB [68]. Hodowla tych komórek w obecności wzrastających stężeń DTIC skutkowałą selekcją komórek opornych na działanie leku, cechujących się bardziej agresywnym fenotypem. Uzyskane populacje komórek czerniaka miały zwiększony, względem pierwotnych linii SB2 i MeWo, potencjał do tworzenia dużych guzów pierwotnych oraz przerzutów do płuc i wątroby u myszy doświadczalnych [67].

Podjęmowane są próby stosowania inhibitorów NF-κB w skojarzeniu z DTIC lub TMZ. Jednym z takich inhibitorów jest celastrol (CEL), związek izolowany z kory trzyskrzydłca (*Tripterygium wilfordii*), który jest stosowany od ponad 2000 lat w chińskiej medycynie jako remedium na gorączkę, dreszcze, bóle stawów i stany zapalne. W badaniach *in vivo* związek ten ograniczał liczbę i wielkość przerzutów w mysim modelu czerniaka [1]. Skojarzenie CEL z TMZ synergistycznie hamowało proliferację komórek czerniaka opornych na lek alkilujący [19]. Dalsza analiza wykazała, że CEL blokował translokację NF-κB do jądra komórkowego. Jednocześnie obserwowana akumulacja ubikwitylowanych białek, w tym inhibitora NF-κB (IκB), sugerowała, że mechanizm działania CEL w badanych liniach komórkowych czerniaka opierał się na inhibicji proteasomu.

Do inhibitorów pośrednio hamujących aktywność NF-κB zaliczany jest również bortezomib (VELCADE, dawniej PS-341), który jest zarejestrowany przez FDA do leczenia chorych na szpiczaka mnogiego. Jego aktywność przeciwnowotworowa została także potwierdzona w czerniaku. W komórkach czerniaka kontrolnych i traktowanych TMZ, bortezomib obniżał ekspresję cytokin zaangażowanych w rozwój przerzutów, CXCL8 i CXCL1 oraz białek związanych z opornością wielolekową, MDR-1 i MRP1 [5]. Wydaje się, że bortezomib w komórkach czerniaka oddziałuje również na cykl komórkowy poprzez stabilizację białek supresorowych p21 i p53. Przeciwczeraniakowe działanie bortezomibu

potwierdzono w badaniach na mysim modelu czerniaka. Lek ten hamował wzrost guza, a w skojarzeniu z TMZ indukował całkowitą regresję nowotworu oraz istotnie wydłużał czas życia w porównaniu do myszy kontrolnych i traktowanych wyłącznie TMZ [5]. Bortezomib zmniejszał także neowaskularyzację tkanki nowotworowej, potwierdzając swoje przeciwingiogenne właściwości. Aktywność bortezomibu nie została dowiedziona w badaniach klinicznych, oceniających skuteczność leku stosowanego samodzielnie [73], jak i z TMZ [108] u chorych z czerniakiem.

Badano również aktywność przeciwczeraniakową bardziej selektywnych inhibitorów NF-κB. BMS-345541, inhibitor konstytutywnej aktywności kinazy IκBβ (IKKβ) w komórkach czerniaka linii Hs294T, stosowany z TMZ synergistycznie indukował regresję nowotworu *in vivo* [129]. Z kolei zastosowanie DTIC z fumaranem dimetylu (DMF), inhibitorem lokalizacji jądrowej NF-κB, redukowało wzrost guza pierwotnego oraz znacząco opóźniło rozwój przerzutów do węzła wartowniczego w mysich ksenoprzeszczepach czerniaka, czemu towarzyszyło obniżenie poziomu chemokin CXCL2 i CXCL11, których ekspresja jest zależna od NF-κB [120]. Doniesienie o silnie uczulających właściwościach DMF [87] spowodowało zakończenie badań w warunkach klinicznych.

Białko p53

Podkreśla się, że główną rolę w indukcji apoptozy komórek nowotworowych odgrywa białko p53. Duża oporność czerniaka sugerowałaby obecność zmutowanego białka p53 lub jego nieprawidłowe funkcjonowanie w komórkach tego nowotworu. Tymczasem badania dowodzą, że utrata zdolności do apoptozy w komórkach czerniaka nie jest związana z mutacjami w obrębie genu p53, czy z utratą jego ekspresji, gdyż te zaburzenia występują zaledwie w 5% przypadków. Jednym z proponowanych mechanizmów jest nadekspresja antagonistów tego białka np. pozabawionej N-terminalnej domeny wersji p73, tzw. ΔNp73. Badania w komórkach czerniaka traktowanych TMZ wykazały, że mimo zwiększonej fosforylacji p53 i kinazy serynowo-treoninowej ATM (ataxia telangiectasia mutated) oraz podwyższonej ekspresji proapoptotycznego białka Bax, proces apoptozy nie został uruchomiony [115]. Brak proapoptotycznego działania TMZ było wynikiem zwiększonej ekspresji oraz jądrowej lokalizacji ΔNp73. Oporność ta została zniesiona przez zastosowanie kwercetyny, która indukując akumulację ΔNp73 w cytoplazmie, reaktywowała zdolność komórek czerniaka do wejścia w proces apoptozy pod wpływem TMZ. Podobny efekt, co najmniej addytywny, zależnej od p53 indukcji śmierci komórek czerniaka obserwowano, stosując kwercetynę z DTIC [114].

Stabilność i aktywność p53 są regulowane przez białko MDM2 oraz deacetylazę histonową 1 (HDAC1). Utworzenie kompleksu p53-MDM2, a następnie deacetylacja indukowana przez HDAC1 powoduje naznaczenie białka p53 ubikwityną i jego proteasomalną degradację. Deacetylazy histonowe odgrywają również rolę w wyciszaniu genów, których produkty białkowe są zaangażowane w odpowiedź apoptotyczną, mogą więc również bezpośrednio odpowiadać za wyjątkowo dużą oporność komórek czerniaka na chemioterapię [39]. Na przykład, kwas walproinowy (VPA) uwrażliwiał komórki czerniaka na cisplatinę i etopozyd, prawdopodobnie przez reekspresję p16

wynikającą z hamowania HDAC [119]. Zastosowanie VPA z TMZ i IFN- β prowadziło do aktywacji prokaspazy 8 oraz wzmocnienia proapoptotycznego działania leku alkilującego w komórkach czerniaka linii D05 [95]. Z kolei w warunkach *in vivo* kombinacja tych związków redukowałą masę guza w myszach doświadczalnych w znacznie większym stopniu niż TMZ stosowany samodzielnie. W badaniach klinicznych nie uzyskano jednak wzrostu odsetka odpowiedzi w porównaniu do schematu DTIC i IFN- α . Jest to prawdopodobnie konsekwencją niemożności osiągnięcia efektywnego stężenia VPA w organizmie chorych bez jednoczesnego nasilenia działań niepożądanych III i IV stopnia [94].

Rodzina białek Bcl-2

Białka z rodziny Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) odgrywają ważną rolę regulacyjną w procesie apoptozy. Wśród nich wyróżniamy białka antyapoptotyczne np. Bcl-2, Bcl-x_L i Mcl-1 oraz proapoptotyczne, m.in. Bax, Bad, Puma i Noxa. Poszukiwano korelacji między stadiem czerniaka a stężeniem Bcl-2 [118]. Wyciszenie genu Bcl-2 oligonukleotydem antysensowym (ASO) lub shRNA w warunkach *in vitro* nie hamowało proliferacji komórek czerniaka ani nie uwrażliwiało ich na działanie DTIC i cisplatyny [10,11]. Tymczasem w warunkach *in vivo*, obniżenie stężenia Bcl-2 skutkowało utratą zdolności komórek czerniaka do tworzenia guzów lub regresją nowotworu u myszy SCID [10]. W innych badaniach wykazano, że ASO 4625 indukował apoptozę w komórkach czerniaka w różnych stadiach zaawansowania choroby [80], a blokada ekspresji Bcl-2 przez zastosowanie oblimersenu sodu (nazwa handlowa: Genasense, dawniej augmersen), wysoce swoistego ASO skierowanego przeciwko mRNA Bcl-2, w mysich ksenoprzeszczepach ludzkiego czerniaka znosiła oporność na DTIC [55]. W badaniach klinicznych, podobnie jak w warunkach *in vivo*, uzyskano spadek stężenia Bcl-2, czemu towarzyszył wzrost apoptozy w komórkach czerniaka pobranych od pacjentów poddanych terapii DTIC z oblimersenem [56]. Odpowiedź kliniczną uzyskano u 6 na 14 pacjentów, a u kolejnych 2 obserwowano stabilizację choroby. W randomizowanym badaniu klinicznym III fazy, do którego zakwalifikowano 771 pacjentów z czerniakiem przerzutowym, oceniano skuteczność oblimersenu skojarzonego z DTIC w porównaniu do monoterapii DTIC [8]. Odsetek objektywnych odpowiedzi klinicznych był niemal dwukrotnie wyższy w grupie pacjentów otrzymujących kombinację leków niż w grupie leczonych wyłącznie DTIC (odpowiednio 13,5 i 7,5%). W tej grupie obserwowano również wydłużenie czasu wolnego od progresji (2,6 vs. 1,6 miesiąca) i czasu całkowitego przeżycia (9 vs. 7,8 miesiąca). Zauważono, że na leczenie lepiej odpowiadają pacjenci, którzy przed rozpoczęciem terapii mieli prawidłowe wartości dehydrogenazy mleczanowej (LDH), niezależnego czynnika rokowniczego w IV stadium zaawansowania czerniaka. W grupie chorych leczonych dwoma lekami zaobserwowano zwiększenie incydentów krwawienia (13,7 vs. 9,2%). W 2007 roku rozpoczęły się wieloośrodkowe badania III fazy z losowym doбором chorych charakteryzujących się niskim stężeniem LDH mające potwierdzić przewagę leczenia DTIC z oblimersenem nad monoterapią DTIC. Pierwszych wyników tego badania należy się spodziewać pod koniec 2011 roku. Prowadzone są również nierandomizowane badania ukierunkowane na określenie efektywności i bezpieczeństwa terapii oblimersenem sodu z TMZ

i ABI-007 (nazwa handlowa: Abraxane, paklitaksel stabilizowany albuminą) u chorych ze zdiagnozowanym czerniakiem w stadium zaawansowanym i prawidłowym stężeniem LDH. W badaniach przedklinicznych znajduje się również ABT-737, inhibitor białek Bcl-2, Bcl-x_L i Bcl-w. Dotychczas wykazano, że związek ten współdziałał w sposób synergistyczny z DTIC w indukcji apoptozy komórek czerniaka [126].

CHEMIOTERAPIA ZŁOŻONA OPARTA NA DAKARBAZYNE I TEMOZOLOMIDZIE

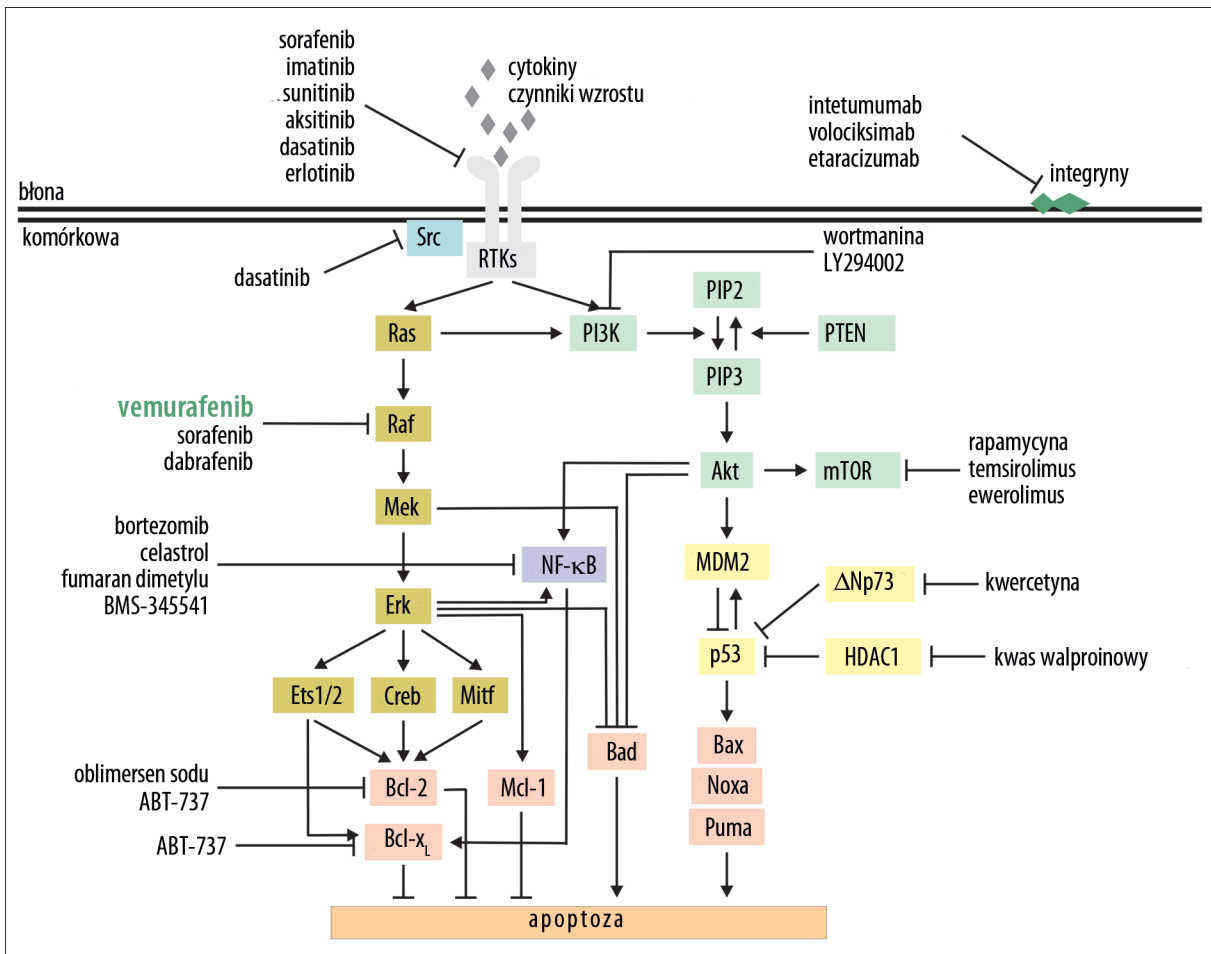
Oprócz związków alkilujących, aktywność przeciwczeraniakową wykazują pochodne nitrozomocznika (karmustyna, lomustyna, fotemustyna), związki platyny (cisplatyna i karboplatyna), alkaloidy barwinka różowego (winkrystyna, winblastyna i winorelbina) oraz taksany (paklitaksel, docetaksel oraz ich pochodne). Wiele programów chemioterapii wielolekowej zawierających DTIC zostało poddanych ocenie w badaniach I i II fazy u pacjentów z czerniakiem. Najbardziej obiecujące były próby łączenia DTIC z karmustyną, cisplatyną i tamoksifenem, tzw. program Dartmouth. W pierwszym badaniu uzyskano odpowiedź na leczenie u 55% pacjentów z czerniakiem [29]. Równie wysoką objektywną odpowiedź (40–55%) obserwowano w kolejnych trzech jednoośrodkowych badaniach klinicznych [64,75,100]. Żadne wieloośrodkowe badania jednak nie potwierdziły tych wyników, a objektywną odpowiedź uzyskiwano zaledwie u 15–30% chorych [17,20,72,99]. Ponadto stosowanie czterolekowej chemioterapii nie wiązało się z istotnym wydłużeniem czasu przeżycia w porównaniu do monoterapii DTIC i skutkowało nasileniem hemotoksyczności III i IV stopnia [17,20].

Podobnie jak w przypadku programu Dartmouth, łączenie DTIC z cisplatyną i winblastyną (program CVD) lub bleomycyną, winkrystyną i lomustyną (program BOLD) wiązało się z wysokim odsetkiem objektywnych odpowiedzi (35–40%) we wczesnych badaniach klinicznych [65,103], ale żadne randomizowane badanie III fazy nie dowiodło wyższości tych programów leczenia nad monoterapią DTIC [123].

Bodźcem do podjęcia próby zastosowania DTIC w skojarzeniu z tamoksifenem były wyniki wskazujące na obecność receptorów estrogenowych w komórkach czerniaka. Niektóre badania sugerowały, że włączenie tamoksifenu do monoterapii DTIC lub chemioterapii wielolekowej spowoduje wzrost odsetka odpowiedzi oraz wydłużenie czasu przeżycia [21,43,64]. Na przykład w badaniu, w którym 55 chorych otrzymywało DTIC, a 62 DTIC i tamoksifen, objektywną odpowiedź zaobserwowano odpowiednio u 12 i 28% pacjentów, a mediana przeżycia wyniosła odpowiednio 29 i 48 tygodni [21]. Różnice w objektywnej odpowiedzi między monoterapią DTIC a leczeniem DTIC z tamoksifenem były bardziej wyraźne u kobiet niż u mężczyzn i wyniosły odpowiednio 10 i 38%. Dalsze badania kliniczne nie potwierdziły tych wyników [2,22,26,41,99].

DAKARBAZYNA I TEMOZOLOMID A TERAPIA CELOWANA

Postęp w poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów w komórce umożliwił powstanie nowego podejścia terapeutycznego zwanego terapią celowaną. W założeniu strategia ta polega na zastosowaniu



Ryc. 4. Uproszczony schemat szlaków sygnałowych w czerniaku, uwzględniający związki i przeciwciała rozpatrywane jako leki przeciwczeraniakowe, niektóre stosowane z dakarbazyną lub temozolomidem. W progresji czerniaka oraz rozwoju jego oporności ważną rolę odgrywają drogi sygnałowe Ras/Raf/Mek/Erk, PI3K/Akt/mTOR, NF-κB oraz p53. Zidentyfikowano wiele nowych cząsteczek lub przeciwciał skierowanych przeciwko różnym elementom tych szlaków sygnałowych. Najskuteczniejsze klinicznie okazały się inhibitory zmutowanego białka BRAF, zwłaszcza vemurafenib (wyróżniony zieloną czcionką), który w 2011 roku został zarejestrowany jako lek pierwszego i drugiego rzutu do leczenia chorych z czerniakiem w stadium zaawansowanym, u których stwierdzono mutację V600E BRAF

związków selektywnie blokujących nieprawidłowo podwyższoną aktywność określonego białka regulatorowego. Jednym z pierwszych takich związków jest imatinib, inhibitor kinazy tyrozynowej Bcr-Abl oraz dwóch receptorów kinaz tyrozynowych c-Kit i PDGFR [27]. Korzystny efekt terapeutyczny wynikający z zastosowania imatinibu w przewlekłej białaczce szpikowej, ostrej białaczce limfoblastycznej i guzach podścieliska przewodu pokarmowego zapoczątkował badania oceniające skuteczność kolejnych inhibitorów, głównie kinaz tyrozynowych i serynowo-treoninowych w innych nowotworach, w tym w czerniaku (ryc. 4).

Inhibitory kinaz: szlak Ras/Raf/Mek/Erk

Przykładem inhibitora wielokinazowego jest sorafenib (nazwa handlowa: Nexavar, dawniej BAY43-9006), który został zarejestrowany do leczenia pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym i rakiem nerki. Właściwości przeciwnowotworowe wykazuje przez hamowanie aktywności CRAF, BRAF, V600E BRAF, EGFR, c-KIT, FLT-3, VEGFR-2 i -3 oraz PDGFR-β. Monoterapia sorafenibem chorych z czerniakiem w stadium przerzutów nie przyniosła

sukcesu w badaniach II fazy. U 19% pacjentów zaobserwowano stabilizację choroby, ale żaden z pacjentów nie odpowiadał, nawet częściowo, na leczenie, a mediana czasu wolnego od progresji wyniosła zaledwie 11 tygodni [34]. W kolejnym badaniu, w grupie 36 chorych nie zanotowano żadnego przypadku całkowitej odpowiedzi klinicznej, jeden pacjent odpowiedział częściowo na leczenie, a stabilizacja choroby była widoczna u trzech badanych [81]. Ponadto nie obserwowano korelacji między mutacją V600E BRAF, a kliniczną odpowiedzią, co sugeruje że sorafenib nie jest efektywnym inhibitorem V600E BRAF. Podawanie DTIC z sorafenibem również nie przyniosło zadowalających wyników. Odpowiedź kliniczną obserwowano u 10 na 83 pacjentów (12%), a mediana całkowitego przeżycia była równa 37 tygodni [35]. W kolejnym randomizowanym badaniu uzyskano obiektywną odpowiedź u 24% pacjentów otrzymujących sorafenib z DTIC i 12% otrzymujących wyłącznie DTIC, ale różnice nie były znaczące statystycznie [76]. Sorafenib badano także w skojarzeniu z TMZ u pacjentów z czerniakiem w stadium zaawansowanym [4] lub glejakiem wielopostaciowym [49,89], ale nie wykazano wyższości leczenia dwulekowego nad monoterapią DTIC.

Spośród selektywnych inhibitorów białka V600E BRAF, największym osiągnięciem terapeutycznym jest podawanie doustnie vemurafenibu (nazwa handlowa: Zelboraf, dawniej PLX4032, RG7204, RO5185426). W badaniach I i II fazy wykazano, że stosowanie vemurafenibu w dawce 960 mg dwa razy dziennie indukowało całkowitą lub częściową odpowiedź, trwającą ponad 6 miesięcy u ponad 50% pacjentów z mutacją V600E BRAF, a mediana czasu wolnego od progresji wynosiła 6,2 miesiąca [42,92]. W wieloośrodkowym badaniu III fazy z randomizacją, do którego włączono 675 pacjentów z czerniakiem w III lub IV stadium choroby z obecną mutacją V600E białka BRAF, porównywano efektywność monoterapii vemurafenibem (960 mg dwa razy dziennie) i DTIC (1000 mg/m² co 3 tygodnie). Okresowa analiza wykazała, że podawanie chorym vemurafenibu wiązało się z wysokim odsetkiem objektywnych odpowiedzi (48,4%) oraz ze zmniejszeniem masy guza w 90% przypadków [18]. Na monoterapię DTIC odpowiedziało zaledwie 5,5% pacjentów, co potwierdza hipotezę, że zmutowane białko BRAF charakteryzuje bardziej agresywny fenotyp komórek czerniaka o zwiększonej oporności na standardową chemioterapię. Szacowana mediana czasu wolnego od progresji była wyższa w grupie chorych otrzymujących vemurafenib niż DTIC i wyniosła odpowiednio 5,3 vs. 1,6 miesiąca. Wyższość vemurafenibu nad DTIC została wykazana we wszystkich badanych podgrupach, również u pacjentów ze złym rokowaniem – w stadium M1c choroby i/lub z podwyższonym stężeniem LDH. Ponadto leczenie vemurafenibem obniżało ryzyko śmierci i progresji choroby o 74% w porównaniu do monoterapii DTIC. Wśród pacjentów 38% wymagało obniżenia dawki vemurafenibu, natomiast działania niepożądane III i IV stopnia wystąpiły tylko u <10% chorych. Wyniki tego badania stały się podstawą do zarejestrowania przez FDA w 2011 roku vemurafenibu do leczenia pacjentów z czerniakiem nieoperacyjnym lub przerzutowym z obecną mutacją V600E BRAF.

Obiecujące wyniki uzyskano także stosując dabrafenib (GSK2118436), doustny inhibitor V600E BRAF wyprodukowany przez GlaxoSmithKline. Inhibitor ten w badaniu klinicznym I/II fazy zredukował przerzuty czerniaka do mózgu u 9 na 10 pacjentów [69]. W kolejnym badaniu, w ciągu pierwszych 8–9 tygodni stosowania dabrafenibu uzyskano zmniejszenie o ponad 20% wielkości guza u 60% pacjentów z czerniakiem w stadium przerzutów [58]. Na początku 2011 roku rozpoczęły się wieloośrodkowe badania kliniczne III fazy z randomizacją porównujące skuteczność dabrafenibu (150 mg dwa razy dziennie) i DTIC (1000 mg/m² co 3 tygodnie) u chorych w III i IV stadium czerniaka.

Kolejnym celem terapii w szlaku Ras/Raf/Mek/Erk jest kinaza Mek, której konstytutywną aktywność obserwuje się w komórkach czerniaka, ale nie w prawidłowych melanocytach. Najbardziej obiecującym inhibitorem tej kinazy jest selumetinib (AZD6244), który hamował proliferację komórek czerniaka *in vitro* oraz wzrost guza *in vivo*, a w skojarzeniu z docetakselem indukował apoptozę i regresję nowotworu [48]. W wieloośrodkowym badaniu II fazy randomizowano 200 chorych w IV stadium zaawansowania klinicznego do dwóch ramion: leczonych wyłącznie AZD6244 lub wyłącznie TMZ. Nie stwierdzono różnic ani w czasie wolnym od progresji ani w odsetku całkowitych przeżyć chorych między badanymi grupami. W grupach

leczonych AZD6244 i TMZ zaobserwowano odpowiednio 5,8 i 9,4% odpowiedzi częściowych [31].

Inhibitory kinaz: szlak PI3K/Akt/mTOR

Innym szlakiem sygnałowym istotnym w rozwoju i progresji czerniaka jest PI3K/Akt/mTOR regulujący proliferację i migrację komórek [66]. Konstytutywna aktywność tego szlaku, zwłaszcza kinazy mTOR, charakterystyczna dla komórek czerniaka, może odpowiadać za oporność na chemioterapię [70]. Niektóre inhibitory mTOR już zostały zarejestrowane przez FDA. Jednym z nich jest rapamycyna (sirolimus), antybiotyk makrolidowy wytwarzany przez *Streptomyces higroscopicus*, który zapobiega odrzucaniu przeszczepu nerki. Z kolei jej rozpuszczalna pochodna, temsirolimus (CCI-779), jest lekiem pierwszego rzutu u pacjentów z zaawansowanym rakiem jasnokomórkowym. Skuteczność inhibitorów mTOR była oceniana w warunkach *in vitro* i w modelach zwierzęcych czerniaka. Zastosowanie LY294002, wortmaniny i rapamycyny, inhibitorów szlaku PI3K/Akt/mTOR, zwiększyło wrażliwość na proapoptotyczne działanie TMZ i cisplatyny, czemu towarzyszyło zahamowanie ekspresji antyapoptotycznego białka Mcl-1 w komórkach czerniaka *in vitro* [106]. Ponadto kombinacje leków, zawierające LY294002 lub rapamycynę, wydajniej niż TMZ i cisplatyna stosowane samodzielnie ograniczały inwazyjność komórek czerniaka w rekonstrukcie skóry ludzkiej. Z kolei zastosowanie rapamycyny w połączeniu z DTIC u myszy zaszczerpionych komórkami ludzkiego czerniaka zmniejszało masę guza, ale efekt ten był podobny do uzyskanego u myszy traktowanych tylko inhibitorem mTOR [112]. W innych badaniach temsirolimus, samodzielnie niewykazujący działania przeciwnowotworowego, z DTIC redukował o 44 i 61% masę dwóch z trzech guzów u myszy SCID [113]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach klinicznych oceniano skuteczność tylko jednego inhibitora mTOR, ewerolimusa (RAD001). Objektywnych odpowiedzi nie zaobserwowano, natomiast stabilizację choroby zanotowano u 35% pacjentów [88]. Podawanie ewerolimusu z TMZ wiązało się z uzyskaniem objektywnych odpowiedzi zaledwie u 8% pacjentów [30]. Trwają badania kliniczne różnych faz mające na celu określenie skuteczności terapeutycznej inhibitorów mTOR z innymi lekami, m.in. cisplatyną, sorafenibem i docetakselem.

DAKARBAZYNA I TEMOZOLOMID JAKO ZWIĄZKI REFERENCYJNE W IMMUNOTERAPII

Czerniak uważany jest za jeden z najbardziej immunogennych nowotworów. Wśród dowodów należy wymienić spontaniczne remisje, występowanie bielactwa uwarunkowanego autoimmunologicznie, towarzyszącą reakcją limfocytarną, zmiany aktywności komórek dendrytycznych, wzrost aktywności czynnika martwicy guza (TNF) czy też zmiany w ekspresji głównego układu zgodności tkankowej. Duża immunogenność czerniaka stworzyła nadzieje na opracowanie skutecznych metod immunoterapii tego nowotworu. Od lat 90 ub.w. w leczeniu czerniaka skóry zaczęto stosować naturalne, rekombinowane lub syntetyczne cytokiny modyfikujące reakcję immunologiczną organizmu. Należą do nich interleukiny, interferony, czynniki stymulujące wzrost kolonii (G-CSF, GM-CSF, Epo) i TNF. Obecnie w leczeniu chorych z czerniakiem stosuje

się interferon $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$) i IL-2 zarówno w monoterapii, jak i w skojarzeniu z cytostatykami. Odnotowano zwiększenie wskaźnika odpowiedzi na leczenie IL-2 i IFN- α , przy jednoczesnym znaczącym nasileniu działań niepożądanych. Próby stosowania biochemioterapii przyniosły sprzeczne wyniki. Wstępne badania sugerowały, że stosowanie biochemioterapii zmniejsza o ponad 40% ryzyko zgonu [40,122], ale nie zostało to potwierdzone w badaniach na większej liczbie pacjentów. W największym badaniu uzyskano wyższe odsetki odpowiedzi, ale czas całkowitego przeżycia i wskaźniki jakości życia nie uległy poprawie [6]. Brak wyraźnych korzyści stosowania biochemioterapii w porównaniu z chemioterapią potwierdziła metaanaliza 18 badań klinicznych z losowym doбором pacjentów z czerniakiem w stadium przerzutów [54].

Trwają badania kliniczne nad wykorzystaniem kolejnych immunomodulatorów m.in. cytokin aktywujących makrofagi (interleukiny 12, 15, 18), IFN- γ , komórek TIL i LAK (hodowanych i stymulowanych *ex vivo*). Szczególne zainteresowanie budzą szczepionki przeciwnowotworowe (cancer vaccines). Pierwsze próby zastosowania takich szczepionek przeprowadził w 1983 r. chirurg William Colley. Opisał on przypadek regresji mięsaków po zastosowaniu mieszaniny lizatu komórek nowotworowych i toksyn bakteryjnych. Zidentyfikowanie antygenów czerniaka było bodźcem do opracowania szczepionek przeciwczeraniakowych. Antygeny te mogą być peptydami wytwarzanymi w komórkach czerniaka lub glikosfingolipidami zakotwiczonymi w błonie komórkowej, m.in. GM2 i GM3. W badaniach klinicznych analizuje się skuteczność wielu szczepionek przeciwczeraniakowych, również w Polsce [71]. Dotychczas testowane szczepionki przeciwnowotworowe, mimo zachęcających wyników dowodzących regresji guza u większości pacjentów w I i II fazie badań klinicznych, w randomizowanych badaniach III fazy nie wykazywały oczekiwanej skuteczności klinicznej. Wyraźna aktywacja swoistych mechanizmów immunologicznych obserwowana u większości pacjentów nie korelowała bezpośrednio z odpowiedziami klinicznymi. W jedynym randomizowanym badaniu III fazy, polegającym na porównaniu monoterapii DTIC z monoterapią szczepionkami komórek dendrytycznych z peptydami MHC klasy I i II, nie wykazano wyższości immunoterapii. Obiektywną odpowiedź uzyskano u zaledwie 3,8 i 5,5% chorych, w grupach otrzymujących odpowiednio szczepionkę i DTIC, co przyczyniło się do przedwczesnego zakończenia badania klinicznego [102].

Badania ostatnich lat doprowadziły do prawdziwego przełomu w stosowaniu immunoterapii w leczeniu pacjentów z czerniakiem. Przykładem jest ipilimumab (nazwa handlowa: Yervoy, dawniej: MDX-010), przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko antygenowi 4 cytotoksycznych limfocytów T (CTLA-4), które blokując interakcję CTLA-4 z CD80/86, znosi supresję immunologiczną i umożliwia ciągle stymulowanie limfocytów T przez komórki dendrytyczne. W jednym z badań klinicznych II fazy na grupie 72 wcześniej nieleczonych pacjentów, badano skuteczność ipilimumabu w monoterapii (3 mg/kg m.c. co 4 tygodnie przez 4 miesiące) i z DTIC [53]. Obiektywną odpowiedź obserwowano odpowiednio u 5,4 i 14,3% chorych, a mediana całkowitego przeżycia była równa 11,4 i 14,3 miesiąca. Toksyczność autoimmunologiczna III i IV stopnia

wystąpiła u 7,7 i 17,1% pacjentów otrzymujących odpowiednio tylko ipilimumab i ipilimumab z DTIC. W randomizowanych badaniach III fazy, obejmujących 502 wcześniej nieleczonych pacjentów, wykazano wyższość terapii ipilimumabem (10 mg/kg m.c.) z DTIC nad monoterapią DTIC [93]. Czas przeżycia był dłuższy o 2 miesiące (11,2 vs. 9,1 miesiąca). Szacowane wskaźniki przeżyć rocznych (47,3 vs. 36,3%), dwuletnich (28,5 vs. 17,9%) i trzyletnich (20,8 vs. 12,2%) również przemawiały na korzyść stosowania ipilimumabu w skojarzeniu z DTIC. Wprawdzie leczenie skojarzone ipilimumabem z DTIC wiązało się z nasileniem działań niepożądanych typowych dla monoterapii ipilimumabem, m.in. hepatotoksyczności, to można było je zmniejszyć przez podawanie glukokortykoidów i związków immunosupresyjnych. Zakończenie tego badania jest planowane na początek 2012 roku, ale dotychczas uzyskane wyniki przyczyniły się do przyspieszenia trybu rejestracji ipilimumabu jako leku przeciwczeraniakowego. W 2011 roku FDA i EMA zaakceptowały ipilimumab do leczenia chorych z zaawansowanym czerniakiem. Obecnie trwa badanie I fazy, w którym ocenie poddana jest terapia vemurafenibem w skojarzeniu z ipilimumabem. Przeciwciałem skierowanym przeciwko CTLA-4 jest również tremelimumab (CP-675,206), którego skuteczność przeciwczeraniakowa w badaniach I/II fazy [16,63] skłoniła do przeprowadzenia randomizowanego badania III fazy. Sześćset czterdzieści trzech chorych otrzymywało tremelimumab lub DTIC/TMZ w pierwszej linii leczenia. Po przeanalizowaniu wstępnych wyników badanie zostało jednak przerwane ze względu na brak dowodów lepszej skuteczności tego przeciwciała anty-CTLA-4 niż standardowej chemioterapii (11,8 vs. 10,7 miesiąca) [91].

Przeciwciała monoklonalne, oprócz modulacji układu immunologicznego, są również stosowane w hamowaniu procesu angiogenezy, którego podstawowym regulatorem jest VEGF. Bewacizumab, który jest skierowany przeciwko VEGF, już okazał się skuteczny w terapii pacjentów z rakiem jelita grubego i rakiem nerki. W badaniu II fazy, do którego włączono 62 pacjentów z czerniakiem nieoperacyjnym, oceniano skuteczność leczenia skojarzonego bewacizumabu i TMZ. Obiektywną odpowiedź zaobserwowano u 26% pacjentów, natomiast całkowity czas przeżywa wynoszący 3 miesiące zanotowano u 30% badanych [121].

Przeciwciałem o innym mechanizmie działania jest intetumumab (CNTO 95), który wiąże się z integrynami α_v , promującymi unaczynienie guzów. Wyniki badania II fazy, w którym 129 chorych na czerniaka w IV stadium zaawansowania randomizowano do czterech ramion: intetumumab w dawce 5 mg/kg m.c., intetumumab 10 mg/kg m.c., intetumumab 10 mg/kg m.c. z DTIC i wyłącznie DTIC, wykazały wyższość intetumumabu w dawce 10 mg/kg, zarówno stosowanego samodzielnie jak i z DTIC, nad monoterapią DTIC [79]. Mediana całkowitego czasu przeżycia w wymienionych grupach wynosiła odpowiednio 9,8, 14, 10,9 i 7,6 miesiąca, a czas wolny od progresji choroby był różny 1,8, 2,5, 1,4 i 1,4 miesiąca. Leczenie było dobrze tolerowane, a działania niepożądane były najbardziej uciążliwe w grupie otrzymującej tylko DTIC. Ze względu na niski profil toksyczności, planowane są dalsze badania z losowym doбором pacjentów. Pewne nadzieje związane są także z volociksimabem (M200), hamującym aktywność

integryny $\alpha_5\beta_1$ oraz etaracizumabem (Abeigrin), przeciwciałem skierowanym przeciwko $\alpha_v\beta_3$, których aktywność przeciwczerśniakowa została już dowiedziona w badaniach klinicznych II fazy [25,52].

PODSUMOWANIE

Przez dekady mediana przeżycia pacjentów z czerniakiem w fazie przerzutów była poniżej jednego roku. Przez wiele lat jedyną terapią zarejestrowaną przez FDA i EMA w leczeniu pacjentów z czerniakiem w stadium zaawansowanym była DTIC. TMZ wykazujący podobną skuteczność, ale mający przewagę w postaci zdolności do przekraczania bariery krew-mózg, jest stosowany w terapiach eksperymentalnych u pacjentów z pierwotnymi i wtórnymi nowotworami mózgu. Jednak stosowanie DTIC lub TMZ wiąże się z uzyskaniem odpowiedzi u zaledwie 10–15% pacjentów. Przyczyn chemiooporności komórek czerniaka należy upatrywać w zdolności systemów naprawy DNA do szybkiego usuwania uszkodzeń DNA indukowanych tymi związkami. Nieprawidłowa aktywność szlaków sygnałowych NF- κ B i p53, prowadząca do zaburzeń procesu apoptozy, może również ograniczać odpowiedź komórek nowotworowych na działanie chemioterapeutyków. Podejmowane próby kojarzenia DTIC i TMZ z innymi związkami dostarczyły wiele obiecujących wyników wstępnych, ale żadne z dotychczas przeprowadzonych randomizowanych badań klinicznych III fazy z losowym doбором pacjentów nie dowiodło wyższości chemioterapii wielolekowej nad monoterapią DTIC (tabela 1). Przez te lata powtarzały się przypadki całkowitej spontanicznej regresji choroby, co sugerowało nieprzeciętną skuteczność układu immunologicznego niektórych pacjentów. Stąd pojawiły się pomysły, aby w leczeniu pacjentów z czerniakiem zastosować strategię immunomodulacyjną. W latach 90 ub.w. FDA zaaprobowała dwie immunoterapie: IL-2 i IFN- α 2b w leczeniu pacjentów z czerniakiem. Jednak obie terapie, bardzo toksyczne, są skuteczne tylko u niewielkiej grupy pacjentów [45]. Dopiero rok 2011 przyniósł długo oczekiwany przełom w leczeniu pacjentów z zaawansowanym

czerniakiem. Uzyskano obiecujące wyniki stosowania ipilimumabu, przeciwciała monoklonalnego, które blokuje receptor CTLA-4, wzmacnia naturalną zdolność organizmu do walki z nowotworem. Chociaż obiektywna odpowiedź jest uzyskiwana tylko u niewielkiego odsetka pacjentów (10–20%), to pacjenci, którzy odpowiadają na leczenie żyją dłużej bez objawów choroby. Wydaje się, że wcześniej stosowane kryteria, takie jak całkowita lub częściowa odpowiedź trzeba będzie zastąpić innymi, aby móc ocenić skuteczność ipilimumabu. Podobne nadzieje budzi odkrycie vemurafenibu, swoistego inhibitora V600E BRAF. Oba leki zostały już zarejestrowane przez FDA i EMA jako leki pierwszego i/lub drugiego rzutu dla pacjentów z zaawansowanym czerniakiem. Kolejne terapie celowane lub stymulujące odpowiedź immunologiczną są oceniane w badaniach klinicznych III fazy. Wobec tytu nowych możliwości, wkrótce powinien zostać ustalony nowy schemat postępowania przy wyborze odpowiedniego leczenia pacjentów z czerniakiem w stadium zaawansowanym. Wydaje się, że będzie on uwzględniał analizę mutacji w *BRAF*, a w przyszłości również w *KIT* w celu ustalenia, czy możliwe jest zastosowanie terapii celowanej. Należy jednak pamiętać o możliwości pojawienia się oporności nabytej. Immunoterapia IL-2 będzie adresowana do pacjentów w dobrej kondycji z czerniakiem M1a lub M1b. Wydaje się, że terapia IL-2 pozostanie terapią z wyboru w wielu sytuacjach, gdyż w przeciwieństwie do terapii ipilimumabem, osoby odpowiadające na terapię IL-2 można zidentyfikować szybko, często już po 2 cyklach, a ponadto objawy niepożądane ustępują szybciej niż po ipilimumabie. Jeżeli stosowanie IL-2 będzie niemożliwe lub nieskuteczne, to zastosowany będzie ipilimumab. Rozpoczęto również nowe badania kliniczne skuteczności ipilimumabu z vemurafenibem i innymi inhibitorami BRAF. W ciągu kilku najbliższych lat należy oczekiwać rozstrzygnięcia, czy terapie te zastąpią DTIC czy też będą stosowane z tym lekiem. Z pewnością DTIC pozostanie lekiem referencyjnym w wielu badaniach klinicznych (tabela 2).

Tabela 2. DTIC w terapii skojarzonej (wybrane przykłady)

Rodzaj badania	Pozostałe leki	Wyniki	Piśmiennictwo
Terapie dwulekowe			
Czerniak przerzutowy (415 p)	semustyna (pochodna nitrozomocznika, metylo-CCNU)	brak wyników wskazujących na lepszą skuteczność terapii dwulekowej w porównaniu z terapią DTIC	[23]
Pilotażowe II fazy; czerniak przerzutowy (30 p)	cisplatyna	CR – 7%, PR – 30%	[44]
Randomizowane; czerniak przerzutowy (117 p)	tamoksifen	ORR – 28%; MS – 9 m	[21]
Randomizowane III fazy; czerniak przerzutowy (cz. z 771 p)	oblimersen	ORR – 13,5%; MS – 9,1 m; PFS – 2,6 m	[8]
Randomizowane II fazy; czerniak przerzutowy (cz. z 101 p)	sorafenib	MS – 45,6 w; PFS – 21,1 w	[76]
Randomizowane II fazy; czerniak przerzutowy (cz. z 112 p)	etaracizumab	ORR – 12,7%; MS – 9,4 m; PFS – 1,8 m; MDR – 4,2 m	[52]
Randomizowane II fazy; czerniak przerzutowy (cz. z 129 p)	intetumumab	MS – 10,9 m; PFS – 1,4 m	[79]

Tabela 2. (c.d.). DTIC w terapii skojarzonej (wybrane przykłady)

Terapie trójlejkowe			
Czeraniak przerzutowy (89 p)	karmustyna hydroksymocznik	brak wyników wskazujących na lepszą skuteczność	[24]
II faza; czereaniak zaawansowany (52 p)	cisplatyna, winblastyna (CVD)	CR – 4%, PR – 36%; MDR – 9 m; toksyczność	[65]
Czeraniak przerzutowy (cz. z 42 p)	cisplatyna, karmustyna (CDB)	ORR – 25%	[64]
Randomizowane III fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 211 p)	cisplatyna, karmustyna (CDB)	ORR – 21%; CR – 6%	[99]
Randomizowane III fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 102 p)	cisplatyna tamoksifen	ORR – 27%; CR – 7,7%; MS – 15,8 m	[97]
Randomizowane III fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 183 p)	cisplatyna, winblastyna (CVD)	ORR – 25%; CR- 2%; PFS – 2,4 m; MS – 9,2 m	[38]
Randomizowane III fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 363 p)	cisplatyna, IFN- α 2b	ORR – 22,8%; PFS – 3 m; MS – 9 m	[60]
Faza III; czereaniak przerzutowy (cz. z 395 p)	cisplatyna, winblastyna (CVD)	ORR – 13,8%; PFS – 2,9 m; MS – 8,7 m	[6]
Terapie cztero- i pięciolejkowe			
Randomizowane III fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 211 p)	cisplatyna, karmustyna, tamoksifen (CDBT; program Dartmouth)	ORR – 30%; CR – 3%	[99]
Randomizowane; czereaniak przerzutowy stadium IV (cz. z 102 p)	cisplatyna, tamoksifen, IFN- α 2b, IL-2	ORR – 44%; MS – 10,7 m; toksyczność	[97]
Randomizowane III fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 183 p)	cisplatyna, winblastyna (CVD), + dożylnie IL-2, podskórnice IFN- α 2b	ORR – 48%; CR – 7%; PFS – 4,9 m; MS – 11,9 m	[38]
Randomizowane III fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 363 p)	cisplatyna, IFN- α 2b, IL-2	ORR – 20,8%; PFS – 3,9 m; MS – 9 m	[60]
Faza III; czereaniak przerzutowy (cz. z 395 p)	cisplatyna, winblastyna (CVD), + IFN- α 2b, IL-2	ORR – 19,5%; PFS – 4,8 m; MS – 9 m	[6]
DTIC + przeciwciała			
Randomizowane II fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 112 p)	etaracizumab	ORR – 12,7%; PFS – 2,5 m; MS – 9,4 m	[52]
Randomizowane II fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 72 p)	ipilimumab	ORR – 14,3%; CR -5,7%; MS – 14,3 m	[53]
Randomizowane III fazy; czereaniak przerzutowy (cz. z 502 p)	ipilimumab	ORR – 15,2%; MS – 11,2; MDR – 19,3 m; toksyczność; badania trwają	[93]

CDB – cisplatyna, dakarbazyna, karmustyna; CDBT – cisplatyna, karmustyna, dakarbazyna, tamoksifen; CR (complete response) – całkowita odpowiedź; CVD – cisplatyna, winblastyna, dakarbazyna; cz. z – część z; m (month) – miesiąc; MDR (median duration of response) – mediana czasu trwania odpowiedzi; MS (median survival) – mediana przeżycia; ORR (overall response rate) – wskaźnik obiektywnej odpowiedzi; p (patient) – pacjent; PFS (progression-free survival) – czas przeżycia wolny od progresji; PR (partial response) – częściowa odpowiedź; w (week) – tydzień.

PIŚMIENNICTWO

[1] Abbas S., Bhoumik A., Dahl R., Vasile S., Krajewski S., Cosford N.D., Ronai Z.A.: Preclinical studies of celastrol and acetyl isogam-bogic acid in melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 6769–6778

[2] Agarwala S.S., Ferri W., Gooding W., Kirkwood J.M.: A phase III randomized trial of dacarbazine and carboplatin with and without tamoxifen in the treatment of patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 1999; 85: 1979–1984

- [3] Agarwala S.S., Kirkwood J.M.: Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma. *Oncologist*, 2000; 5: 144–151
- [4] Amaravadi R.K., Schuchter L.M., McDermott D.F., Kramer A., Giles L., Gramlich K., Carberry M., Troxel A.B., Letrero R., Nathanson K.L., Atkins M.B., O'Dwyer P.J., Flaherty K.T.: Phase II trial of temozolomide and sorafenib in advanced melanoma patients with or without brain metastases. *Clin. Cancer Res.*, 2009; 15: 7711–7718
- [5] Amiri K.I., Horton L.W., LaFleur B.J., Sosman J.A., Richmond A.: Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res.*, 2004; 64: 4912–4918
- [6] Atkins M.B., Hsu J., Lee S., Cohen G.I., Flaherty L.E., Sosman J.A., Sondak V.K., Kirkwood J.M.: Eastern Cooperative Oncology Group: Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26: 5748–5754
- [7] Baker S.D., Wirth M., Statkevich P., Reidenberg P., Alton K., Sartorius S.E., Dugan M., Cutler D., Batra V., Grochow L.B., Donehower R.C., Rowinsky E.K.: Absorption, metabolism, and excretion of 14C-temozolomide following oral administration to patients with advanced cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 309–317
- [8] Bedikian A.Y., Millward M., Pehamberger H., Conry R., Gore M., Trefzer U., Pavlick A.C., DeConti R., Hersh E.M., Hersey P., Kirkwood J.M., Haluska F.G.: Oblimersen Melanoma Study Group. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: 4738–4745
- [9] Bedikian A.Y., Papadopoulos N.E., Kim K.B., Hwu W.J., Homsy J., Glass M.R., Cain S., Rudewicz P., Vernillet L., Hwu P.: A phase IB trial of intravenous INO-1001 plus oral temozolomide in subjects with unresectable stage-III or IV melanoma. *Cancer Invest.*, 2009; 27: 756–763
- [10] Benimetskaya L., Ayyanar K., Kornblum N., Castanotto D., Rossi J., Wu S., Lai J., Brown B.D., Popova N., Miller P., McMicken H., Chen Y., Stein C.A.: Bcl-2 protein in 518A2 melanoma cells *in vivo* and *in vitro*. *Clin. Cancer Res.*, 2006; 12: 4940–4948
- [11] Benimetskaya L., Lai J.C., Khvorova A., Wu S., Hua E., Miller P., Zhang L.M., Stein C.A.: Relative Bcl-2 independence of drug-induced cytotoxicity and resistance in 518A2 melanoma cells. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 8371–8379
- [12] Bredel M., Bredel C., Juric D., Duran G.E., Yu R.X., Harsh G.R., Vogel H., Recht L.D., Scheck A.C., Sikic B.I.: Tumor necrosis factor- α -induced protein 3 as a putative regulator of nuclear factor- κ B-mediated resistance to O⁶-alkylating agents in human glioblastomas. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: 274–287
- [13] Breithaupt H., Dammann A., Aigner K.: Pharmacokinetics of dacarbazine (DTIC) and its metabolite 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) following different dose schedules. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1982; 9: 103–109
- [14] Britten C.D., Rowinsky E.K., Baker S.D., Agarwala S.S., Eckardt J.R., Barrington R., Diab S.G., Hammond L.A., Johnson T., Villalona-Calero M., Fraass U., Statkevich P., Von Hoff D.D., Eckhardt S.G.: A phase I and pharmacokinetic study of temozolomide and cisplatin in patients with advanced solid malignancies. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 1629–1637
- [15] Busch C., Geisler J., Lillehaug J.R., Lønning P.E.: MGMT expression levels predict disease stabilisation, progression-free and overall survival in patients with advanced melanomas treated with DTIC. *Eur. J. Cancer.*, 2010; 46: 2127–2133
- [16] Camacho L.H., Antonia S., Sosman J., Kirkwood J.M., Gajewski T.F., Redman B., Pavlov D., Bulanahagi C., Bozon V.A., Gomez-Navarro J., Ribas A.: Phase I/II trial of tremelimumab in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2009; 27: 1075–1081
- [17] Chapman P.B., Einhorn L.H., Meyers M.L., Saxman S., Destro A.N., Panageas K.S., Begg C.B., Agarwala S.S., Schuchter L.M., Ernstoff M.S., Houghton A.N., Kirkwood J.M.: Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 1999; 17: 2745–2751
- [18] Chapman P.B., Hauschild A., Robert C., Haanen J.B., Ascierto P., Larkin J., Dummer R., Garbe C., Testori A., Maio M., Hogg D., Lorigan P., Lebbe C., Jouary T., Schadendorf D., Ribas A., O'Day S.J., Sosman J.A., Kirkwood J.M., Eggermont A.M., Dreno B., Nolop K., Li J., Nelson B., Hou J., Lee R.J., Flaherty K.T., McArthur A.G.: BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.*, 2011; 364: 2507–2516
- [19] Chen M., Rose A.E., Doudican N., Osman I., Orlov S.J.: Celestrol synergistically enhances temozolomide cytotoxicity in melanoma cells. *Mol. Cancer Res.*, 2009; 7: 1946–1953
- [20] Chiarion Sileri V., Nortilli R., Aversa S.M., Paccagnella A., Medici M., Corti L., Favaretto A.G., Cetto G.L., Monfardini S.: Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. *Melanoma Res.*, 2001; 11: 189–196
- [21] Cocconi G., Bella M., Calabresi F., Tonato M., Canaletti R., Boni C., Buzzi F., Ceci G., Corgna E., Costa P., Lottici R., Papadia F., Sofra M.C., Bacchi M.: Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine plus tamoxifen. *N. Engl. J. Med.*, 1992; 327: 516–523
- [22] Cocconi G., Passalacqua R., Folidore S., Carlini P., Acito L., Maiello E., Marchi M., Gebbia V., Di Sarra S., Beretta M., Bacchi M.: Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine plus tamoxifen, or vindesine plus tamoxifen: a prospective randomized study. *Melanoma Res.*, 2003; 13: 73–79
- [23] Costanza M.E., Nathanson L., Schoenfeld D., Wolter J., Colsky J., Regelson W., Cunningham T., Sedransk N.: Results with methyl-CCNU and DTIC in metastatic melanoma. *Cancer*, 1977; 40: 1010–1015
- [24] Costanzi J.J., Vaitkevicius V.K., Quagliana J.M., Hoogstraten B., Coltman C.A.Jr, Delaney F.C.: Combination chemotherapy for disseminated malignant melanoma. *Cancer*, 1975; 35: 342–346
- [25] Cranmer L.D., Bedikian A.Y., Ribas A., O'Day S., Forero-Torres A., Yazji S., Kirkwood J.M.: Phase II study of volociximab (M200), an α 5 β 1 anti-integrin antibody in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: abstrakt 8011
- [26] Creagan E.T., Suman V.J., Dalton R.J., Pitot H.C., Long H.J., Veeder M.H., Vukov A.M., Rowland K.M., Krook J.E., Michalak J.C.: Phase III clinical trial of the combination of cisplatin, dacarbazine, and carmustine with or without tamoxifen in patients with advanced malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 1999; 17: 1884–1890
- [27] Czyż M., Jakubowska J.: ST1571 – terapia celowana. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 677–696
- [28] Czyż M., Lesiak-Mieczkowska K., Koprowska K., Szulawska-Mroczek A., Wozniak M.: Cell context-dependent activities of parthenolide in primary and metastatic melanoma cells. *Br. J. Pharmacol.*, 2010; 160: 1144–1157
- [29] Del Prete S.A., Maurer L.H., O'Donnell J., Forcier R.J., LeMarbre P.: Combination chemotherapy with cisplatin, carmustine, dacarbazine, and tamoxifen in metastatic melanoma. *Cancer Treat. Rep.*, 1984; 68: 1403–1405
- [30] Dronca R.S., Perez D.G., Allred J., Maples W.J., Creagan E.T., Pockaj B.A., Kaur J.S., Moore T.D., Marchello B.T., Markovic S.: N0675: NCCTG phase II study of temozolomide (TMZ) and everolimus (RAD001) therapy for metastatic melanoma (MM). *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: abstrakt 8572
- [31] Dummer R., Robert C., Chapman P.B., Sosman J.A., Middleton M., Bastholt L., Kemsley K., Cantarini M.V., Morris C., Kirkwood J.M.: AZD6244 (ARRY-142886) vs temozolomide (TMZ) in patients (pts) with advanced melanoma: An open-label, randomized, multicenter, phase II study. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 26: abstrakt 9033
- [32] Eggermont A.M., Kirkwood J.M.: Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur. J. Cancer*, 2004; 40: 1825–1836
- [33] Eggermont A.M., Robert C.: New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur. J. Cancer*, 2011; 47: 2150–2157
- [34] Eisen T., Ahmad T., Flaherty K.T., Gore M., Kaye S., Marais R., Gibbens I., Hackett S., James M., Schuchter L.M., Nathanson K.L., Xia C., Simantov R., Schwartz B., Poulin-Costello M., O'Dwyer P.J., Ratain M.J.: Sorafenib in advanced melanoma: a phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br. J. Cancer*, 2006; 95: 581–586
- [35] Eisen T., Marais R., Affolter A., Lorigan P., Robert C., Corrie P., Ottensmeier C., Chevreau C., Chao D., Nathan P.D., Jouary T., Harries M., Negrier S., Montegriffo E., Ahmad T., Gibbens I., James M.G., Strauss U.P., Prendergast S., Gore M.E.: Sorafenib and dacarbazine as first-line therapy for advanced melanoma: phase I and open-label phase II studies. *Br. J. Cancer*, 2011; 105: 353–359
- [36] Erichsen C., Jönsson P.E.: Venocclusive liver disease after dacarbazine therapy (DTIC) for melanoma. *J. Surg. Oncol.*, 1984; 27: 268–270
- [37] Essigmann J.M., Loechler E.L., Green C.L.: Genetic toxicology of O⁶ methylguanine. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1986; 209A: 433–440
- [38] Eton O., Legha S.S., Bedikian A.Y., Lee J.J., Buzaid A.C., Hodges C., Ring S.E., Papadopoulos N.E., Plager C., East M.J., Zhan F., Benjamin R.S.: Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J. Clin. Oncol.*, 2002; 20: 2045–2052

- [39] Facchetti F., Previdi S., Ballarini M., Minucci S., Perego P., La Porta C.A.: Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors. *Apoptosis*, 2004; 9: 573–582
- [40] Falkson C.I.: Experience with interferon alpha 2b combined with dacarbazine in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Med. Oncol.*, 1995; 12: 35–40
- [41] Falkson C.I., Ibrahim J., Kirkwood J.M., Coates A.S., Atkins M.B., Blum R.H.: Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.*, 1998; 16: 1743–1751
- [42] Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B., Ribas A., McArthur G.A., Sosman J.A., O'Dwyer P.J., Lee R.J., Grippo J.F., Nolop K., Chapman P.B.: Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2010; 363: 809–819
- [43] Flaherty L.E., Liu P.Y., Mitchell M.S., Fletcher W.S., Walker M.J., Goodwin J.W., Stephens R.L., Sondak V.K.: The addition of tamoxifen to dacarbazine and cisplatin in metastatic malignant melanoma. A phase II trial of the Southwest Oncology Group, (SWOG-8921). *Am. J. Clin. Oncol.*, 1996; 19: 108–113
- [44] Fletcher W.S., Green S., Fletcher J.R., Dana B., Jewell W., Townsend R.A.: Evaluation of cis-platinum and DTIC combination chemotherapy in disseminated melanoma. A Southwest Oncology Group Study. *Am. J. Clin. Oncol.*, 1988; 11: 589–593
- [45] Garbe C., Eigentler T.K., Keilholz U., Hauschild A., Kirkwood J.M.: Systematic review of medical treatment in melanoma: current status and future prospects. *Oncologist*, 2011; 16: 5–24
- [46] Gerard B., Aamdal S., Lee S.M., Leyvraz S., Lucas C., D'Incalci M., Bizzari J.P.: Activity and unexpected lung toxicity of the sequential administration of two alkylating agents – dacarbazine and fotemustine – in patients with melanoma. *Eur. J. Cancer*, 1993; 29A: 711–719
- [47] Gerulath A.H., Loo T.L.: Mechanism of action of 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide in mammalian cells in culture. *Biochem. Pharmacol.*, 1972; 21: 2335–2343
- [48] Haass N.K., Sproesser K., Nguyen T.K., Contractor R., Medina C.A., Nathanson K.L., Herlyn M., Smalley K.S.: The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) induces growth arrest in melanoma cells and tumor regression when combined with docetaxel. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 230–239
- [49] Hainsworth J.D., Ervin T., Friedman E., Priego V., Murphy P.B., Clark B.L., Lamar R.E.: Concurrent radiotherapy and temozolomide followed by temozolomide and sorafenib in the first-line treatment of patients with glioblastoma multiforme. *Cancer*, 2010; 116: 3663–3669
- [50] Hassel J.C., Sucker A., Edler L., Kurzen H., Moll I., Stresmann C., Spieth K., Mauch C., Rass K., Dummer R., Schadendorf D.: MGMT gene promoter methylation correlates with tolerance of temozolomide treatment in melanoma but not with clinical outcome. *Br. J. Cancer*, 2010; 103: 820–826
- [51] Hayward I.P., Parsons P.G.: Epigenetic effects of the methylating agent 5-(3-methyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide in human melanoma cells. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1984; 62: 597–606
- [52] Hersey P., Sosman J., O'Day S., Richards J., Bedikian A., Gonzalez R., Sharfman W., Weber R., Logan T., Buzoianu M., Hammershaimb L., Kirkwood J.M., Etaracizumab Melanoma Study Group: A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin alpha(v)beta(3), + or – dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer*, 2010; 116: 1526–1534
- [53] Hersh E.M., O'Day S.J., Powderly J., Khan K.D., Pavlick A.C., Cramer L.D., Samlowski W.E., Nichol G.M., Yellin M.J., Weber J.S.: A phase II multicenter study of ipilimumab with or without dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma. *Invest. New Drugs*, 2011; 29: 489–498
- [54] Ives N.J., Stowe R.L., Lorigan P., Wheatley K.: Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 5426–5434
- [55] Jansen B., Schlagbauer-Wadl H., Brown B.D., Bryan R.N., van Elsland A., Müller M., Wolff K., Eichler H.G., Pehamberger H.: bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat. Med.*, 1998; 4: 232–234
- [56] Jansen B., Wacheck V., Heere-Ress E., Schlagbauer-Wadl H., Hoeller C., Lucas T., Hoermann M., Hollenstein U., Wolff K., Pehamberger H.: Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet*, 2000; 356: 1728–1733
- [57] Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W.P.: MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, 2007; 6: 1079–1099
- [58] Kefford R., Arkenau H., Brown M.P., Millward M., Infante J.R., Long G.V., Ouellet D., Curtis M., Lebowitz P.F., Falchook G.S.: Phase I/II study of GSK2118436, a selective inhibitor of oncogenic mutant BRAF kinase, in patients with metastatic melanoma and other solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 2010; 28: abstrakt 8503
- [59] Kefford R.F., Thomas N.P., Corrie P.G., Palmer C., Abdi E., Kotasek D., Beith J., Ranson M., Mortimer P., Watson A.J., Margison G.P., Middleton M.R.: A phase I study of extended dosing with lomeguatrib with temozolomide in patients with advanced melanoma. *Br. J. Cancer*, 2009; 100: 1245–1249
- [60] Keilholz U., Punt C.J., Gore M., Krut W., Patel P., Lienard D., Thomas J., Proebstle T.M., Schmittel A., Schadendorf D., Velu T., Negrier S., Kleeberg U., Lehman F., Suci S., Eggermont A.M.: Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 6747–6755
- [61] Khan O.A., Gore M., Lorigan P., Stone J., Greystoke A., Burke W., Carmichael J., Watson A.J., McGown G., Thorncroft M., Margison G.P., Califano R., Larkin J., Wellman S., Middleton M.R.: A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer*, 2011; 104: 750–755
- [62] Kiliańska Z.M., Zołnierczyk J., Wesierska-Gadek J.: Biologiczna aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy)-1. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 344–363
- [63] Kirkwood J.M., Lorigan P., Hersey P., Hauschild A., Robert C., McDermott D., Marshall M.A., Gomez-Navarro J., Liang J.Q., Bulanhagui C.A.: Phase II trial of tremelimumab (CP-675,206) in patients with advanced refractory or relapsed melanoma. *Clin. Cancer Res.*, 2010; 16: 1042–1048
- [64] Lattanzi S.C., Tosteson T., Chertoff J., Maurer L.H., O'Donnell J., LeMarbre P.J., Mott L., DelPrete S.A., Forcier R.J., Ernstoff M.S.: Dacarbazine, cisplatin and carmustine, with or without tamoxifen, for metastatic melanoma: 5-year follow-up. *Melanoma Res.*, 1995; 5: 365–369
- [65] Legha S.S., Ring S., Papadopoulos N., Plager C., Chawla S., Benjamin R.: A prospective evaluation of a triple-drug regimen containing cisplatin, vinblastine, and dacarbazine (CVD) for metastatic melanoma. *Cancer*, 1989; 64: 2024–2029
- [66] Lesiak K., Sztiller-Sikorska M., Czyż M.: Czynniki transkrypcyjne w powstawaniu i progresji czerniaka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 576–595
- [67] Lev D.C., Onn A., Melinkova V.O., Miller C., Stone V., Ruiz M., McGary E.C., Ananthaswamy H.N., Price J.E., Bar-Eli M.: Exposure of melanoma cells to dacarbazine results in enhanced tumor growth and metastasis *in vivo*. *J. Clin. Oncol.*, 2004; 22: 2092–2100
- [68] Lev D.C., Ruiz M., Mills L., McGary E.C., Price J.E., Bar-Eli M.: Dacarbazine causes transcriptional up-regulation of interleukin 8 and vascular endothelial growth factor in melanoma cells: a possible escape mechanism from chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.*, 2003; 2: 753–763
- [69] Long G.V., Kefford R., Carr P., Brown M., Curtis M., Ma B., Lebowitz P., Kim K., Kurzrock R., Falchook G.: Phase 1/2 study of GSK2118436, a selective inhibitor of V600 mutant (Mut) Braf kinase: evidence of activity in melanoma brain metastases (Mets). *Ann. Oncol.*, 2010; 21: abstrakt LBA27
- [70] Luo J., Manning B.D., Cantley L.C.: Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*, 2003; 4: 257–262
- [71] Mackiewicz A., Wysocki P., Mackiewicz J., Wiznerowicz M., Kapcinska M., Laciak M., Rose-John S., Izzycki D.: Long term survival of high risk melanoma patients immunized with an allogeneic whole cell genetically modified vaccine (AGI-101) after complete resection. *Ann. Oncol.*, 2010; 21: viii401–viii407
- [72] Margolin K.A., Liu P.Y., Flaherty L.E., Sosman J.A., Walker M.J., Smith J.W. III, Fletcher W.S., Weiss G.R., Unger J.M., Sondak V.K.: Phase II study of carmustine, dacarbazine, cisplatin, and tamoxifen in advanced melanoma: a Southwest Oncology Group study. *J. Clin. Oncol.*, 1998; 16: 664–669
- [73] Markovic S.N., Geyer S.M., Dawkins F., Sharfman W., Albertini M., Maples W., Fracasso P.M., Fitch T., Lorusso P., Adjei A.A., Erlichman C.: A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer*, 2005; 103: 2584–2589

- [74] Marzolini C., Decosterd L.A., Shen F., Gander M., Leyvraz S., Bauer J., Buclin T., Biollaz J., Lejeune F.: Pharmacokinetics of temozolomide in association with fotemustine in malignant melanoma and malignant glioma patients: comparison of oral, intravenous, and hepatic intra-arterial administration. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 1998; 42: 433–440
- [75] McClay E.F., Mastrangelo M.J., Berd D., Bellet R.E.: Effective combination chemo/hormonal therapy for malignant melanoma: experience with three consecutive trials. *Int. J. Cancer*, 1992; 50: 553–556
- [76] McDermott D.F., Sosman J.A., Gonzalez R., Hodi F.S., Linette G.P., Richards J., Jakub J.W., Beeram M., Tarantolo S., Agarwala S., Frenette G., Puzanov I., Cranmer L., Lewis K., Kirkwood J., White J.M., Xia C., Patel K., Hersh E.: Double-blind randomized phase II study of the combination of sorafenib and dacarbazine in patients with advanced melanoma: a report from the 11715 Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26: 2178–2185
- [77] Middleton M.R., Grob J.J., Aaronson N., Fierbeck G., Tilgen W., Seiter S., Gore M., Aamdal S., Cebon J., Coates A., Dreno B., Henz M., Schadendorf D., Kapp A., Weiss J., Fraass U., Statkevich P., Muller M., Thatcher N.: Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2000; 18: 158–166
- [78] Newlands E.S., Stevens M.F., Wedge S.R., Wheelhouse R.T., Brock C.: Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat. Rev.*, 1997; 23: 35–61
- [79] O'Day S., Pavlick A., Loquai C., Lawson D., Gutzmer R., Richards J., Schadendorf D., Thompson J.A., Gonzalez R., Trefzer U., Mohr P., Ottensmeier C., Chao D., Zhong B., de Boer C.J., Uhlar C., Marshall D., Gore M.E., Lang Z., Hait W., Ho P.: A randomised, phase II study of intetumumab, an anti- $\alpha(v)$ -integrin mAb, alone and with dacarbazine in stage IV melanoma. *Br. J. Cancer*, 2011; 105: 346–352
- [80] Olie R.A., Hafner C., Küttel R., Sigrist B., Willers J., Dummer R., Hall J., Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U.: Bcl-2 and bcl-x_L antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages. *J. Invest. Dermatol.*, 2002; 118: 505–512
- [81] Ott P.A., Hamilton A., Min C., Safarzadeh-Amiri S., Goldberg L., Yoon J., Yee H., Buckley M., Christos P.J., Wright J.J., Polsky D., Osman I., Liebes L., Pavlick A.C.: A phase II trial of sorafenib in metastatic melanoma with tissue correlates. *PLoS One*, 2010; 5: e15588
- [82] Palma J.P., Rodriguez L.E., Bontcheva-Diaz V.D., Bouska J.J., Bukofzer G., Colon-Lopez M., Guan R., Jarvis K., Johnson E.F., Klinghofer V., Liu X., Olson A., Saltarelli M.J., Shi Y., Stavropoulos J.A., Zhu G.D., Penning T.D., Luo Y., Giranda V.L., Rosenberg S.H., Frost D.J., Donawho C.K.: The PARP inhibitor, ABT-888 potentiates temozolomide: correlation with drug levels and reduction in PARP activity *in vivo*. *Anticancer Res.*, 2008; 28: 2625–2635
- [83] Patel M., McCully C., Godwin K., Balis F.: Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of temozolomide. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1995; 14: 461a
- [84] Plummer E.R., Lorigan P., Evans J., Steven N., Middleton M., Wilson R., Snow K., Dewji R., Calvert H.: First and final report of a phase II study of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide (TMZ) in patients with metastatic malignant melanoma (MM). *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: abstrakt 8013
- [85] Plummer R., Jones C., Middleton M., Wilson R., Evans J., Olsen A., Curtin N., Boddy A., McHugh P., Newell D., Harris A., Johnson P., Steinfeldt H., Dewji R., Wang D., Robson L., Calvert H.: Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2008; 14: 7917–7923
- [86] Ranson M., Hersey P., Thompson D., Beith J., McArthur G.A., Haydon A., Davis I.D., Kefford R.F., Mortimer P., Harris P.A., Baka S., Seebaran A., Sabharwal A., Watson A.J., Margison G.P., Middleton M.R.: Randomized trial of the combination of lomeguatrib and temozolomide compared with temozolomide alone in chemotherapy naive patients with metastatic cutaneous melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2007; 25: 2540–2545
- [87] Rantanen T.: The cause of the Chinese sofa/chair dermatitis epidemic is likely to be contact allergy to dimethylfumarate, a novel potent contact sensitizer. *Br. J. Dermatol.*, 2008; 159: 218–221
- [88] Rao R.D., Windschitl H.E., Allred J.B., Lowe V.J., Maples W.J., Gornet M.K., Suman V.J., Creagan E.T., Pitot H.C., Markovic S.N.: Phase II trial of the mTOR inhibitor everolimus (RAD-001) in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2006; 24: abstrakt 8043
- [89] Reardon D.A., Vredenburgh J.J., Desjardins A., Peters K., Gururangan S., Sampson J.H., Marcello J., Herndon J.E. II, McLendon R.E., Janney D., Friedman A.H., Bigner D.D., Friedman H.S.: Effect of CYP3A-inducing anti-epileptics on sorafenib exposure: results of a phase II study of sorafenib plus daily temozolomide in adults with recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.*, 2011; 101: 57–66
- [90] Reid J.M., Kuffel M.J., Miller J.K., Rios R., Ames M.M.: Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes P450: the role of CYP1A1, CYP1A2, and CYP2E1. *Clin. Cancer Res.*, 1999; 5: 2192–2197
- [91] Ribas A., Hauschild A., Kefford R., Punt C.J., Haanen J.B., Marmol M., Garbe C., Gomez-Navarro J., Pavlov D., Marshall M.: Phase III, open-label, randomized, comparative study of tremelimumab (CP-675,206) and chemotherapy (temozolomide [TMZ] or dacarbazine [DTIC]) in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26: abstrakt LBA9011
- [92] Ribas A., Kim K.B., Schuchter L.M., Gonzalez R., Pavlick A.C., Weber J.S., McArthur G.A., Hutson T.E., Flaherty K.T., Moschos S.J., Lawrence D.P., Hersey P., Kefford R.F., Chmielowski B., Puzanov I., Li J., Nolop K.B., Lee R.J., Joe A.K., Sosman J.: BRIM-2: An open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAF V600E mutation-positive metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2011; 29: abstrakt 8509
- [93] Robert C., Thomas L., Bondarenko L., O'Day S., Weber J., Garbe C., Lebbe C., Baurain J.F., Testori A., Grob J.J., Davidson N., Richards J., Maio M., Hauschild A., Miller W.H. Jr, Gascon P., Lotem M., Harmankaya K., Ibrahim R., Francis S., Chen T.T., Humphrey R., Hoos A., Wolchok J.D.: Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2011; 364: 2517–2526
- [94] Rocca A., Minucci S., Tosti G., Croci D., Contegno F., Ballarini M., Nolè F., Munzone E., Salmaggi A., Goldhirsch A., Pelicci P.G., Testori A.: A phase I-II study of the histone deacetylase inhibitor valproic acid plus chemoimmunotherapy in patients with advanced melanoma. *Br. J. Cancer*, 2009; 100: 28–36
- [95] Roos W.P., Jöst E., Belohlavek C., Nagel G., Fritz G., Kaina B.: Intrinsic anticancer drug resistance of malignant melanoma cells is abrogated by IFN- β and valproic acid. *Cancer Res.*, 2011; 71: 4150–4160
- [96] Roos W.P., Kaina B.: DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.*, 2006; 12: 440–450
- [97] Rosenberg S.A., Yang J.C., Schwartzentruber D.J., Hwu P., Marincola F.M., Topalian S.L., Seipp C.A., Einhorn J.H., White D.E., Steinberg S.M.: Prospective randomized trial of the treatment of patients with metastatic melanoma using chemotherapy with cisplatin, dacarbazine, and tamoxifen alone or in combination with interleukin-2 and interferon alfa-2b. *J. Clin. Oncol.*, 1999; 17: 968–975
- [98] Ruka W. Czerniak skóry. W: *Onkologia Kliniczna*, M. Krzakowski, tom II, Warszawa, Wydawnictwo Medyczne Borgis, 2001, 290–338
- [99] Rusthoven J.J., Quirt I.C., Iscoe N.A., McCulloch P.B., James K.W., Lohmann R.C., Jensen J., Burdette-Radoux S., Bodurtha A.J., Silver H.K., Verma S., Armitage G.R., Zee B., Bennett K.: Randomized, double-blind, placebo-controlled trial comparing the response rates of carmustine, dacarbazine, and cisplatin with and without tamoxifen in patients with metastatic melanoma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.*, 1996; 14: 2083–2090
- [100] Saba H.I., Cruse C.W., Wells K.E., Klein C.J., Reintgen D.S.: Adjuvant chemotherapy in malignant melanoma using dacarbazine, carmustine, cisplatin, and tamoxifen: a University of South Florida and H. Lee Moffitt Melanoma Center Study. *Ann. Plast. Surg.*, 1992; 28: 60–69
- [101] Saunders P.P., Schultz G.A.: Role of 4-diazoimidazole-5-carboxamide in the action of the antitumor agent 5(4)-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-(5)carboxamide in *Bacillus subtilis*. *Biochem. Pharmacol.*, 1972; 21: 2065–2076
- [102] Schadendorf D., Ugurel S., Schuler-Thurner B., Nestle F.O., Enk A., Bröcker E.B., Grabbe S., Rittgen W., Edler L., Sucker A., Zimpfer-Rechner C., Berger T., Kamarashev J., Burg G., Jonuleit H., Tüttenberg A., Becker J.C., Keikavoussi P., Kämpgen E., Schuler G.: DC study group of the DeCOG. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann. Oncol.*, 2006; 17: 563–570
- [103] Seigler H.F., Lucas V.S. Jr, Pickett N.J., Huang A.T.: DTIC, CCNU, bleomycin and vincristine (BOLD) in metastatic melanoma. *Cancer*, 1980; 46: 2346–2348
- [104] Shealy Y.F., Struck R.F., Holum L.B., Montgomery J.A.: Synthesis of potential anticancer agents. XXIX 5-Diazoimidazole-4-carboxamide and 5-diazo-v-triazole-4-carboxamide. *J. Org. Chem.*, 1961; 26: 2396–2401

- [105] Shetty B.V., Schowen R.L., Slavik M., Riley C.M.: Degradation of dacarbazine in aqueous solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1992; 10: 675–683
- [106] Sinnberg T., Lasithiotakis K., Niessner H., Schittek B., Flaherty K.T., Kulms D., Maczey E., Campos M., Gogel J., Garbe C., Meier F.: Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide. *J. Invest. Dermatol.*, 2009; 129: 1500–1515
- [107] Skibba J.L., Ramirez G., Beal D.D., Bryan G.T.: Preliminary clinical trial and the physiologic disposition of 4(5)-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-5(4)-carboxamide in man. *Cancer Res.*, 1969; 29: 1944–1951
- [108] Su Y., Amiri K.I., Horton L.W., Yu Y., Ayers G.D., Koehler E., Kelley M.C., Puzanov I., Richmond A., Sosman J.A.: A phase I trial of bortezomib with temozolomide in patients with advanced melanoma: toxicities, antitumor effects, and modulation of therapeutic targets. *Clin. Cancer Res.*, 2010; 16: 348–357
- [109] Tawbi H.A., Villaruz L., Tarhini A., Moschos S., Sulecki M., Vivrette F., Shipe-Spotloe J., Radkowski R., Kirkwood J.M.: Inhibition of DNA repair with MGMT pseudosubstrates: phase I study of lomeguatrib in combination with dacarbazine in patients with advanced melanoma and other solid tumours. *Br. J. Cancer*, 2011; 105: 773–777
- [110] Tentori L., Leonetti C., Scarsella M., D'Amati G., Vergati M., Portarena I., Xu W., Kalish V., Zupi G., Zhang J., Graziani G.: Systemic administration of GPI 15427, a novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, increases the antitumor activity of temozolomide against intracranial melanoma, glioma, lymphoma. *Clin. Cancer Res.*, 2003; 9: 5370–5379
- [111] Tentori L., Muzi A., Dorio A.S., Scarsella M., Leonetti C., Shah G.M., Xu W., Camaioni E., Gold B., Pellicciari R., Dantzer F., Zhang J., Graziani G.: Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in PARP-1 silenced tumour cells increases chemosensitivity to temozolomide and to a N³-adenine selective methylating agent. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2010; 10: 368–383
- [112] Thallinger C., Skorjanec S., Soleiman A., Tzaneva S., Griss J., Rous W., Poepl W., Weinlich G., Karimian-Teherani D., Joukhadar C.: Orally administered rapamycin, dacarbazine or both for treatment of human melanoma evaluated in severe combined immunodeficiency mice. *Pharmacology*, 2008; 82: 233–238
- [113] Thallinger C., Wertzowa J., Poepl W., Kovar F.M., Pratscher B., Valent P., Quehenberger P., Joukhadar C.: Comparison of a treatment strategy combining CCI-779 plus DTIC versus DTIC monotherapy in human melanoma in SCID mice. *J. Invest. Dermatol.*, 2007; 127: 2411–2417
- [114] Thangasamy T., Sittadjody S., Limesand K.H., Burd R.: Tyrosinase overexpression promotes ATM-dependent p53 phosphorylation by quercetin and sensitizes melanoma cells to dacarbazine. *Cell Oncol.*, 2008; 30: 371–387
- [115] Thangasamy T., Sittadjody S., Mitchell G.C., Mendoza E.E., Radhakrishnan V.M., Limesand K.H., Burd R.: Quercetin abrogates chemoresistance in melanoma cells by modulating deltaNp73. *BMC Cancer*, 2010; 10: 282
- [116] Toshimitsu H., Yoshimoto Y., Augustine C.K., Padussis J.C., Yoo J.S., Angelica Selim M., Pruitt S.K., Friedman H.S., Ali-Osman F., Tyler D.S.: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase enhances the effect of chemotherapy in an animal model of regional therapy for the treatment of advanced extremity malignant melanoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 2010; 17: 2247–2254
- [117] Treudler R., Georgieva J., Geilen C.C., Orfanos C.E.: Dacarbazine but not temozolomide induces phototoxic dermatitis in patients with malignant melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2004; 50: 783–785
- [118] Utikal J., Leiter U., Udart M., Kaskel P., Peter R.U., Krähn G.M.: Expression of c-myc and bcl-2 in primary and advanced cutaneous melanoma. *Cancer Invest.*, 2002; 20: 914–921
- [119] Valentini A., Gravina P., Federici G., Bernardini S.: Valproic acid induces apoptosis, p16INK4A upregulation and sensitization to chemotherapy in human melanoma cells. *Cancer Biol. Ther.*, 2007; 6: 185–191
- [120] Valero T., Steele S., Neumüller K., Bracher A., Niederleithner H., Pehamberger H., Petzelbauer P., Loewe R.: Combination of dacarbazine and dimethylfumarate efficiently reduces melanoma lymph node metastasis. *J. Invest. Dermatol.*, 2010; 130: 1087–1094
- [121] von Moos R., Seifert B., Simcock M., Goldinger S.M., Gillessen S., Ochsenbein A., Michielin O., Cathomas R., Schläppi M., Moch H., Schraml P.H., Mjhc-Probst D., Mamot C., Schönewolf N., Dummer R.; on behalf of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). First-line temozolomide combined with bevacizumab in metastatic melanoma: a multicentre phase II trial (SAKK 50/07). *Ann. Oncol.* 2011; (w druku)
- [122] Vorobiof D.A., Bezwoda W.R.: A randomised trial of vindesine plus interferon-alpha 2b compared with interferon-alpha 2b or vindesine alone in the treatment of advanced malignant melanoma. *Eur. J. Cancer*, 1994; 30A: 797–800
- [123] Vuoristo M.S., Hahka-Kemppinen M., Parvinen L.M., Pyrhönen S., Seppä H., Korpela M., Kellokumpu-Lehtinen P.: Randomized trial of dacarbazine versus bleomycin, vincristine, lomustine and dacarbazine (BOLD) chemotherapy combined with natural or recombinant interferon-alpha in patients with advanced melanoma. *Melanoma Res.*, 2005; 15: 291–296
- [124] Warren K.E., Aikin A.A., Libucha M., Widemann B.C., Fox E., Packer R.J., Balis F.M.: Phase I study of O⁶-benzylguanine and temozolomide administered daily for 5 days to pediatric patients with solid tumors. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23: 7646–7653
- [125] Watson A.J., Middleton M.R., McGown G., Thorncroft M., Ranson M., Hersey P., McArthur G., Davis I.D., Thomson D., Beith J., Haydon A., Kefford R., Lorigan P., Mortimer P., Sabharwal A., Hayward O., Margison G.P.: O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase depletion and DNA damage in patients with melanoma treated with temozolomide alone or with lomeguatrib. *Br. J. Cancer*, 2009; 100: 1250–1256
- [126] Weber A., Kirejczyk Z., Potthoff S., Ploner C., Häcker G.: Endogenous noxa determines the strong proapoptotic synergism of the BH3-mimetic ABT-737 with chemotherapeutic agents in human melanoma cells. *Transl. Oncol.*, 2009; 2: 73–83
- [127] Wojciechowska U., Didkowska J., Zatoński W.: Nowotwory złośliwe w Polsce w 2008 roku. Centrum Onkologii Instytut. Warszawa, 2010
- [128] Yamini B., Yu X., Dolan M.E., Wu M.H., Darga T.E., Kufe D.W., Weichselbaum R.R.: Inhibition of nuclear factor-κB activity by temozolomide involves O⁶-methylguanine induced inhibition of p65 DNA binding. *Cancer Res.*, 2007; 67: 6889–6898
- [129] Yang J., Zaja-Milatovic S., Thu Y.M., Lee F., Smykla R., Richmond A.: Molecular determinants of melanoma malignancy: selecting targets for improved efficacy of chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.*, 2009; 8: 636–647

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.