

Мутации киназного домена гена *BCR-ABL* при хроническом миелолейкозе

Е.Ю. Чельшева, О.А. Шухов, О.В. Лазарева, А.Г. Туркина

РЕФЕРАТ

***BCR-ABL* kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia**

E.Y. Chelysheva, O.A. Shukhov, O.V. Lazareva, A.G. Turkina

SUMMARY

The production of the *BCR-ABL*-dependent kinase (protein p210) plays a key role in the leukemic cells transformation in chronic myeloid leukemia (CML). Actual approaches to CML treatment based on the use of tyrosine kinase inhibitors (TKI) have dramatically changed the prognosis and quality of life of patients. However, during more than a decade of using TKI it became obvious that a number of patients have tumor cells resistant to TKI. One of the reasons of resistance are the mutations in *BCR-ABL* kinase domain. Due to different mechanisms the efficiency of TKI may decrease. This article provides information about the clinical relevance of point mutations in kinase domain *BCR-ABL*, their role in the development of resistance in CML patients. We also inform about the mutation detection algorithms and the ways to overcome resistance in patients with point mutations of *BCR-ABL*.

Keywords: chronic myeloid leukemia, resistance, mutations of *BCR-ABL*.

National Research Center for Hematology, Moscow

Контакты: denve@bk.ru

Принято в печать: 4 апреля 2012 г.

При хроническом миелолейкозе (ХМЛ) ключевое значение в лейкозной трансформации клеток имеет продукция *BCR-ABL*-зависимой тирозинкиназы (белок p210). Современные принципы терапии ХМЛ, основанные на использовании ингибиторов тирозинкиназ (ИТК), радикально изменили прогноз и качество жизни пациентов. Однако более чем 10-летний опыт использования ИТК показал, что у ряда пациентов возникает резистентность опухолевых клеток к ИТК. Одной из причин развития резистентности служат мутации киназного домена *BCR-ABL*, посредством различных механизмов приводящие к снижению эффективности ИТК. В данной статье представлена информация о клиническом значении точечных мутаций киназного домена *BCR-ABL*, их роли в развитии резистентности у больных ХМЛ, алгоритмах выявления мутаций и способах преодоления резистентности.

Ключевые слова:

хронический миелолейкоз, резистентность, мутации *BCR-ABL*.

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение в клиническую практику специфических ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) привело к изменению прогноза у больных хроническим миелолейкозом (ХМЛ). Так называемое таргетное воздействие, направленное на блокирование активности *BCR-ABL*-тирозинкиназы, позволяет значительно уменьшить опухолевую массу. Получение полных цитогенетических ремиссий и персистенция лейкозного клона только в виде минимальной остаточной болезни у большинства пациентов при применении ИТК позволяют радикальным образом повысить эффективность лечения, снизить частоту прогрессии заболевания и существенно увеличить выживаемость больных ХМЛ [1, 2].

Стандартом терапии первой линии при ХМЛ в настоящее время считается иматиниб (Гливек®), при использовании которого стало возможным получить столь впечатля-

ющие результаты. Однако более чем 10-летний опыт применения иматиниба показал, что даже это высокоспецифическое лечение неодинаково эффективно для всех больных. Резистентность к терапии развивается на различных этапах лечения. Основой развития резистентности могут быть как несоблюдение протокола терапии и необоснованные перерывы в лечении, так и биологически обусловленные механизмы (*BCR-ABL*-зависимые или независимые), требующие дополнительного пристального внимания [3–10]. К сожалению, далеко не все механизмы резистентности при ХМЛ могут быть оценены в реальной клинической практике. Вклад некоторых из них до сих пор не до конца изучен, а полученные данные в ряде случаев противоречивы [5–8]. Однако, например, точечные мутации гена *BCR-ABL*, появление которых отмечено при трансформации из начального «дикого» опухолевого клона у больных ХМЛ в процессе

терапии, имеют доказанное клиническое значение для прогнозирования результатов лечения и могут быть выявлены с помощью доступных методов [11–13].

В данной публикации представлена обобщенная на сегодня информация о роли выявления мутаций киназного домена *BCR-ABL*, позволяющая оптимизировать терапию для каждого конкретного пациента. Имеющиеся сведения могут помочь при принятии решения о назначении ИТК второго поколения (ИТК2) нилотиниба и дазатиниба в случае неудачи первой линии терапии иматинибом. Указанные ИТК2 также зарегистрированы в качестве препаратов первой линии при ХМЛ. На разных стадиях клинических испытаний в настоящее время находятся и другие ИТК: ингибитор *BCR-ABL* и *SRC*-киназ бозутиниб, а также новый пан-*BCR-ABL* ИТК понатиниб. Эти лекарственные средства высокоактивны, способны подавлять активность мутантных форм *BCR-ABL*-тирозинкиназы.

Учитывая уже опубликованный ранее обзор, в котором было приведено детальное описание мутаций киназного домена *BCR-ABL* [14], в данном сообщении акцент сделан на понимание сути такого биологического явления, как точечные мутации. Приведены актуальные новые данные, рекомендации экспертов европейской организации European LeukemiaNet (ELN) по выявлению и мониторингу мутаций *BCR-ABL*. Также дана информация по частоте мутаций при применении ИТК2 в первой линии терапии, результатам использования новых экспериментальных средств у резистентных к лечению ИТК пациентов с мутациями *BCR-ABL*.

Роль гена *BCR-ABL* в опухолевой прогрессии при ХМЛ

В результате реципрокной транслокации t(9;22) и образования так называемой филадельфийской или Ph-хромосомы происходит слияние гена *ABL*, расположенного на длинном плече хромосомы 9, с геном *BCR*, локализованным на длинном плече хромосомы 22, в результате чего появляется слитный ген *BCR-ABL*. Продукция *BCR-ABL*-зависимой тирозинкиназы (белок p210) при ХМЛ играет ключевую роль в лейкозной трансформации клеток. Белок p210 *BCR-ABL* обладает постоянной высокой тирозинкиназной активностью, которая приводит к активации сигнальных путей, способствующих увеличению пролиферативной активности клеток, ингибированию апоптоза. Кроме того, белок p210 *BCR-ABL* уменьшает зависимость клеток от внешних механизмов регуляции и снижает клеточную адгезию.

Необходимо иметь в виду, что в зависимости от точек разрывов в гене *BCR* могут быть разные молекулярные варианты как гена *BCR-ABL*, так и белка *BCR-ABL*. Так, например, при разрыве в области m-bcr определяется белок p190, что наиболее характерно для Ph-позитивного острого лимфобластного лейкоза (Ph+ ОЛЛ); при разрыве в области μ -bcr — белок p230, служащий очень редкой находкой при ХМЛ.

По мере развития хронической фазы (ХФ) ХМЛ происходит накопление большой массы лейкозных клеток с аномальным геном *BCR-ABL*. Повышенная пролиферативная активность, усиление процессов репликации ДНК, снижение процессов репарации и накопление свободных радикалов служат основой повреждения ДНК, способствуют развитию геномной нестабильности и накоплению дополнительных генетических дефектов. Появляются мутации как в гене *BCR-ABL*, так и в других генах; дополнительные хромосомные aberrации с вовле-

чением Ph-хромосомы и/или без него; может произойти амплификация гена *BCR-ABL*; активируются дополнительные *BCR-ABL*-независимые онкогенные пути [53]. Все эти процессы лавинообразно усиливают онкогенный потенциал лейкозной клетки и обуславливают появление множественных резистентных клонов и прогрессию ХМЛ из ХФ в фазу акселерации (ФА) и бластного криза (БК).

Поэтому особо важным представляется применение терапии, направленной на максимально возможную эрадикацию *BCR-ABL*-положительных клеток, т. к. персистенция клеток с *BCR-ABL* лежит в основе формирования резистентных клонов при ХМЛ.

Мутации киназного домена гена *BCR-ABL*

Одним из маркеров геномной нестабильности при ХМЛ выступает наличие точечных мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*.

Точечная мутация — это замена или модификация одного нуклеотида, вызывающая изменение нуклеотидной последовательности гена. Это событие способно привести к замене отдельных аминокислот при синтезе белка, т. к. каждая аминокислота кодируется определенной последовательностью (триплетом) нуклеотидов. В некоторых случаях, когда одну и ту же аминокислоту может кодировать несколько сочетаний нуклеотидов, замены аминокислоты при конечном синтезе белка не происходит (молчащая мутация) и это событие не приводит к значимым последствиям. В других случаях возможно образование так называемого стоп-кодона и преждевременное окончание синтеза белка (нонсенс-мутация). Третий вариант — изменение последовательности нуклеотидов, в результате чего происходит замена аминокислоты (миссенс-мутация) (рис. 1).

Номенклатура обозначения мутаций киназного домена *BCR-ABL* указывает местоположение замененной аминокислоты (номер) в белке, какие аминокислоты были заменены одна на другую, например: M244V — замена метионина на валин в положении 244; L248R — замена лейцина на аргинин в положении 248.

Поскольку *BCR-ABL*-тирозинкиназа — белок с трехмерной пространственной структурой, взаимодействие между отдельными участками молекулы определяет ее конформацию. С этой точки зрения, замена отдельных аминокислот киназного домена *BCR-ABL*, способная изменить эту структуру, может значимо повлиять на изменение аффинности к ИТК и, в конечном итоге, на снижение эффективности терапии, селекцию резистентных мутантных клонов и прогрессию заболевания. Кроме того, может изменяться фосфорилирующая активность мутантной тирозинкиназы, активироваться дополнительные сигнальные пути. Высказываются предположения о том, что в ряде случаев мутации *BCR-ABL* служат не столько причиной изменения непосредственного взаимодействия лекарственной молекулы ИТК с *BCR-ABL*-зависимой

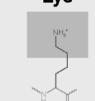
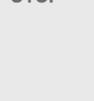
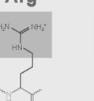
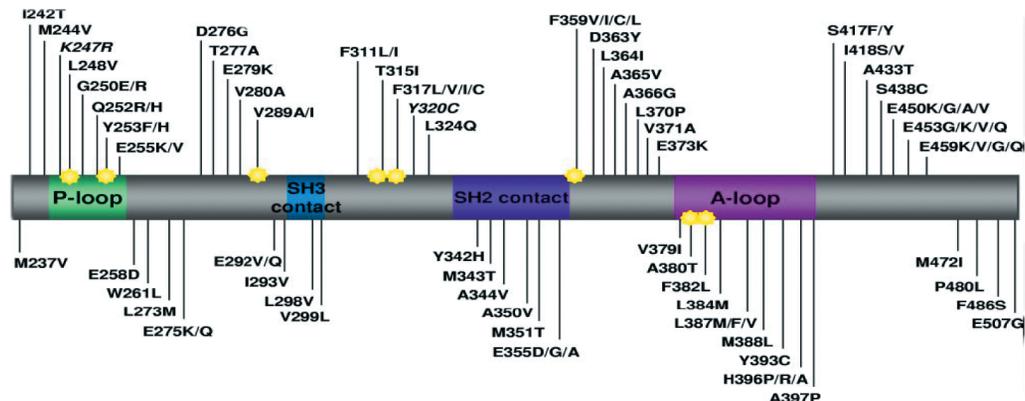
	Нет мутации	Точечные мутации			
		молчащая	нонсенс	миссенс	
ДНК	TTC	TTT	ATC	TCC	TGC
мРНК	AAG	AAA	UAG	AGG	ACG
белок	Lys	Lys	STOP	Arg	Thr
					

Рис. 1. Виды точечных мутаций

Рис. 2. Локализация мутаций киназного домена гена *BCR-ABL* [40]. Желтыми точками обозначены места непосредственного связывания с молекулой иматиниба



тирозинкиназой, сколько маркерами общей геномной нестабильности, при этом основную роль в прогрессировании и формировании резистентности играют *BCR-ABL*-независимые механизмы. В любом случае важно понимать то, какие именно мутантные клоны и каким образом способны повлиять на эффективность лечения при ХМЛ.

Локализация мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*

В киназном домене *BCR-ABL* к настоящему времени описано более 90 видов точечных мутаций [15, 16], выявленных у больных ХМЛ с резистентностью к иматинибу или полученных в экспериментах *in vitro* [17, 24, 25].

Расположение мутаций в той или иной части киназного домена *BCR-ABL* схематически изображено на рис. 2.

Регион P-loop (P-петля, или фосфатный домен) — это АТФ-связывающий участок тирозинкиназы, для которого характерно специфическое, стабилизирующее структуру белка пространственное расположение при так называемой неактивной конформации *BCR-ABL*. Мутации этой области (например, G250E, Y253F/H, Q255H/R) способны приводить к нарушению ее пространственной структуры и переводу *BCR-ABL* в активную конформацию, что может послужить ключевым фактором снижения ингибирования мутантного клона, т. к. иматиниб взаимодействует только с неактивной формой *BCR-ABL*-киназы.

Регион A-loop (A-петля, или активационный домен) — участок тирозинкиназы, который закрывает каталитический центр при сохранении неактивной конформации *BCR-ABL*. Мутации этого участка киназного домена (H396R, V379I, L387M) также способны изменить пространственное расположение петлевой структуры и переводить белок в активную конформацию.

Мутации в зоне каталитического домена (M351T, E355G, F359V), который участвует во взаимодействии с белками-регуляторами и передаче внутриклеточных сигналов, предположительно, могут стимулировать аномально высокую тирозинкиназную активность.

Клетки с разными мутациями сами по себе обладают различной трансформирующей способностью и неодинаковым онкогенным потенциалом. Так, например, установлено, что мутантный клон с T315I имеет более слабую киназную активность, чем «дикий» тип p210 *BCR-ABL*, а при мутациях E255K онкогенный потенциал увеличивается всего на 10–20%. Клетки с мутациями Y253F и E255V имеют онкогенный потенциал, сходный с «диким» типом, а Y253H, T315A, F317L и M351T — относительно более слабый [46]. По-видимому, разная активность мутантных клонов способна влиять на субстрат-специфичность и активацию разных нижележащих сигнальных путей [47].

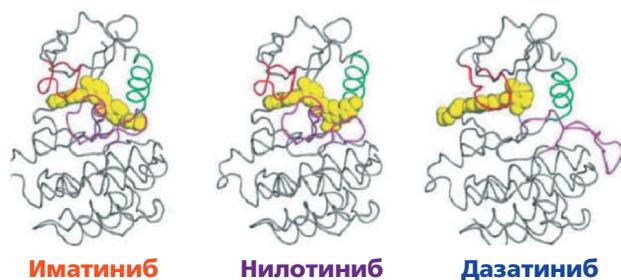


Рис. 3. Схематическое изображение пространственного взаимодействия иматиниба, нилотиниба и дазатиниба с *BCR-ABL*-тирозинкиназой (E. Weisberg et al. Nature Reviews Cancer 2007; 7: 345–56)

Вне зависимости от места локализации в киназном домене *BCR-ABL* также выделяют мутации в точках непосредственного связывания с иматинибом (Y253F/H, T315I, F317L и др.), т. к. иматиниб, действующий как конкурирующий ингибитор АТФ-связывающего домена, образует контакты минимум с 21 аминокислотой.

ИТК2 (нилотиниб и дазатиниб) имеют другую пространственную структуру и другие точки соединения с *BCR-ABL*-тирозинкиназой (рис. 3). Этот факт, по-видимому, служит одним из оснований для того, чтобы сохранять воздействие на мутантные клоны, равно как и доказанная более высокая ингибирующая активность ИТК2 по отношению к *BCR-ABL*-киназе.

Активность *in vitro* разных ИТК по отношению к клеткам с мутациями гена *BCR-ABL*

Вскоре после появления первых сообщений о возможности развития мутаций гена *BCR-ABL* были опубликованы данные по степени чувствительности *in vitro* разных мутантных клонов к воздействию иматиниба [18, 19], а позднее — дазатиниба, нилотиниба и еще одного нового ИТК бозутиниба [21]. Эффективность воздействия ИТК измеряли посредством определения 50%-й максимальной ингибирующей концентрации IC_{50} , т. е. концентрации лекарственных средств, способной снизить на 50% фосфорилирующую активность изолированной мутантной формы *ABL*-киназы (биохимический тест) либо пролиферативную активность Ph-позитивных клеточных линий (пролиферативный тест).

В литературе появились так называемые цветные таблицы, в которых по аналогии, например, со спектром чувствительности различных микроорганизмов к воздействию антибиотиков были наглядно представлены показатели IC_{50} по отношению к ингибирующему действию ИТК на клетки с мутациями киназного домена гена *BCR-ABL* [20, 21]. Чем выше требуемая ингибирующая концентрация, тем больше резистентность мутантного клона. Пример двух таблиц с IC_{50} приведен ниже (табл. 1).

Однако следует учесть, что при проведении этих исследований были использованы разные клеточные линии и время инкубации, а концентрация ИТК, способная ингибировать активность мутантного белка только на 50 %, возможно, не всегда отражает истинное количество погибших клеток. Подробный анализ ценности IC_{50} для выбора ИТК приведен в публикации S. Soverini и соавт. [23]. При сравнении данных, полученных *in vitro* разными авторами, отмечаются значимые противоречия, по-видимому обусловленные как раз тем, что величина IC_{50} не была четко стандартизированной и могла обозначать разные условия эксперимента и виды тестов (биохимический, пролиферативный). Кроме того, авторы по-разному представляли результаты определения IC_{50} : в виде концентрации (в нмоль/л) либо коэффициента, определяемого как отношение IC_{50} мутантной формы к «дикому» типу *BCR-ABL*. Также нет унифицированной градации самой чувствительности мутантных клонов к ИТК, поэтому применяют такие понятия, как высокая чувствительность, промежуточная чувствительность, низкая чувствительность, резистентность и высокая резистентность.

Так, например, по данным одной из приведенных выше таблиц Т. О'Наге и соавт. [20], клетки с мутацией G250E имеют промежуточную чувствительность к иматинибу и высокую чувствительность к нилотинибу и дазатинибу, тогда как, по данным других авторов [21], при мутации G250E требуются высокие ингибирующие концентрации иматиниба, нилотиниба, дазатиниба и бозутиниба, а мутация G250E отнесена к категории высокорезистентных. В дальнейшем, по результатам клинических испытаний нилотиниба и дазатиниба влияния данной мутации на эффективность лечения отмечено не было, поэтому она не фигурирует в перечне факторов, которые рекомендовано учитывать при выборе ИТК.

Попытка пересчитать результаты значений, полученных *in vitro* в соответствии с параметрами фармакокинетики (концентрация ИТК в плазме) для дазатиниба и нилотиниба, представленная P. Laneuville и соавт. [22], была действительно любопытной, однако вызвала дискуссию о том, насколько корректно использовать концентрацию препаратов в плазме, не соответствующую реальной внутриклеточной. Кроме того, в результате пересчетов и применения коэффициентов в представленной таблице явное преимущество оказалось на стороне одного препарата.

Очевидно, что результаты исследований *in vitro* ценны для предсказания чувствительности к лечению у больных с резистентностью к иматинибу, но вряд ли могут быть экстраполированы на ситуацию *in vivo*, при которой свой вклад в развитие резистентности вносят и другие факторы (например, клональная эволюция, активность белков-транспортёров, активация *BCR-ABL*-независимых сигнальных путей). Таблицы с данными исследований чувствительности к ИТК *in vitro* могут быть использованы как приблизительный ориентир при выборе терапии тем или иным ИТК, особенно при обнаружении у пациентов относительно редко встречающихся мутаций *BCR-ABL*, клиническая значимость которых еще не до конца ясна.

Важным итогом исследований *in vitro* стало обозначение спектра наиболее резистентных мутаций, при которых ожидается снижение эффективности терапии тем или иным ИТК, всеми авторами также отмечена крайне

высокая резистентность к воздействию ИТК для клеток с мутацией T315I, что впоследствии было подтверждено клиническими данными.

КЛИНИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ О ВЗАИМОСВЯЗИ МУТАЦИЙ ГЕНА *BCR-ABL* И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ИТК

По мере накопления информации о мутациях *BCR-ABL* выявлена их взаимосвязь с различной степенью резистентности к проводимому лечению ИТК. При обнаружении мутаций в области Р-петли киназного домена, по данным ранних исследований, был отмечен худший клинический прогноз [26]. В тот период еще не были доступны новые активные против мутантных клонов ИТК2, а у пациентов, продолжавших получать иматиниб, отмечалась прогрессия ХМЛ с летальным исходом. В более поздних публикациях [27] авторы показали, что общая выживаемость пациентов не зависит от локализации мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*, но четко коррелирует с фазой заболевания.

В 85 % случаев мутации гена *BCR-ABL* представлены 15 наиболее часто встречающимися вариантами: T315I, Y253F/H, E255K/V, M351T, G250E, F359C/V, H396R/P, M244V, E355G, F317L, M237I, Q252H/R, D276G, L248V, F486S. Мутации в области Р-петли и мутация T315I чаще выявлялись у пациентов с продвинутыми фазами ХМЛ (ФА и БК) и у больных с Rh+ ОЛЛ, а также наблюдались при прогрессии ХФ в ФА/БК [16].

На основании данных клинических исследований ИТК2 нилотиниба и дазатиниба было сформулировано окончательное резюме по клинически значимым мутациям *BCR-ABL*. Установлено, что при выявлении мутаций Y253F/H, E255K/V, F359V/C/I снижена эффективность лечения нилотинибом (исследование CAMN107A2101). Из 26 пациентов с этими мутациями ни у одного не был получен цитогенетический ответ [29]. При обнаружении мутаций F317L/V/I/C, V299L, Q252H, T315A не рекомендована терапия дазатинибом также в связи со сниженным лечебным эффектом (исследования START-R, START-C, CA180-034) [30–32].

Более того, при проведении терапии нилотинибом после неудачи лечения иматинибом среди наиболее часто встречающихся мутаций были отмечены Y253F/H, E255K/V, F359V/C/I, т. е. по мере проведения терапии произошла селекция клонов с предсказанной худшей чувствительностью к лечению; показано также появление мутации F311I [11, 29, 30]. При терапии дазатинибом наиболее частыми из вновь выявленных мутаций были F317L/V и V299L. Приблизительно с равной частотой встречалась мутация G250E, которая не влияла на результаты терапии, и пан-резистентная мутация T315I. Последняя обнаружена у 10 пациентов, причем у 6 из них были продвинутые фазы ХМЛ (ФА и БК), а 4 получали ранее лечение более чем двумя ИТК. Обнаружение мутации T315I было признано абсолютным противопоказанием к терапии иматинибом и ИТК2.

Таким образом, у пациентов с резистентностью к иматинибу и с мутациями *BCR-ABL* при проведении терапии нилотинибом или дазатинибом более высокий риск возникновения новых мутаций, резистентных к этим ИТК2 [33], и в связи с этим повышается вероятность дальнейшей прогрессии заболевания. Выбор ИТК2 необходимо проводить с учетом мутационного статуса у пациентов.

Частота развития мутаций гена *BCR-ABL* при терапии иматинибом

Частота мутаций *BCR-ABL* у резистентных к терапии иматинибом пациентов коррелирует с **фазой ХМЛ и объемом предшествующего лечения**. По данным исследовательской группы GIMEMA, мутации *BCR-ABL* были обнаружены у 27 % больных с ХФ-ХМЛ; у 14 % получавших иматиниб в первой линии терапии, у 31 % получавших иматиниб после неудачи терапии интерфероном- α , у 52 % — с ФА, у 75 % — с миелоидным БК и у 83 % — с лимфоидным БК/Ph+ ОЛЛ [28].

Анализ итальянской исследовательской группы GIMEMA (1439 пациентов с ХМЛ и Ph+ ОЛЛ, более 3000 анализов) в течение 7 лет показал, что **степень резистентности** к иматинибу также имеет значение [39]. Частота выявления мутаций *BCR-ABL* при развитии вторичной резистентности и потере ранее достигнутого цитогенетического или гематологического ответа составила 75 %, при первичной резистентности к иматинибу (критерии неудачи терапии European LeukemiaNet 2009) — 29 %. При росте уровня транскрипта *BCR-ABL* ≥ 1 log, потере большого молекулярного ответа (БМО), но сохранении полного цитогенетического ответа (ПЦО) мутации киназного домена *BCR-ABL* были выявлены в 5 % случаев. При росте уровня транскрипта *BCR-ABL* < 1 log и потере БМО мутации киназного домена гена *BCR-ABL* обнаруживались в 3 % случаев, а при росте уровня транскрипта *BCR-ABL* и сохранении БМО они не выявлялись. Таким образом, частота развития мутаций *BCR-ABL* коррелирует со степенью резистентности опухолевых клеток.

Частота развития мутаций гена *BCR-ABL* при лечении дазатинибом или нилотинибом в качестве первой линии терапии

Результаты применения ИТК2 нилотиниба и дазатиниба в качестве первой линии терапии ХМЛ в основном относятся к клиническим исследованиям II–III фазы [34–38]. По данным итальянской группы GIMEMA и американского центра M.D. Anderson Center, при терапии нилотинибом только у 2 пациентов, у которых впоследствии отмечена прогрессия ХМЛ до БК, выявлены мутации T315I и E255K [34, 35]. В других публикациях не описано, наблюдались ли при рецидиве заболевания мутации киназного домена *BCR-ABL*. Динамика получения ответа при применении ИТК2 была более быстрой, чем при терапии иматинибом [36, 37]. У большинства пациентов было достигнуто значительное подавление

опухолевого клона, что подтверждено высоким процентом достижения БМО. Ожидаемым эффектом может быть значительное снижение частоты выявления мутаций при применении ИТК2 в первой линии терапии, однако значимость оценки мутационного статуса для нилотиниба и дазатиниба в качестве терапии первой линии требует большего периода наблюдения.

ВЫЯВЛЕНИЕ И МОНИТОРИНГ МУТАЦИЙ ГЕНА *BCR-ABL*: РЕКОМЕНДАЦИИ ЭКСПЕРТОВ EUROPEAN LEUKEMIANET 2011

На основании обзора литературы и собственных данных эксперты международной организации European LeukemiaNet (ELN) в 2011 г. предложили свои рекомендации по мониторингу мутаций киназного домена *BCR-ABL* для больных ХМЛ [40].

Показания к исследованию мутаций у больных ХМЛ следующие.

- При первичной диагностике исследование рекомендовано **только** пациентам с ФА и БК; исследование больным в ХФ-ХМЛ на момент диагноза не показано.
- При проведении лечения иматинибом в качестве первой линии терапии выполнение исследования на мутации киназного домена гена *BCR-ABL*:
 - **обязательно** в случае **неудачи терапии** в соответствии с критериями ELN 2009 [54], т. е. при отсутствии достижения ответа в установленный срок, при потере достигнутой ранее ремиссии (полного гематологического ответа, ПЦО либо БМО) и/или при появлении дополнительных хромосомных аномалий в Ph+ клетках в любой момент лечения;
 - **рекомендовано** при **субоптимальном ответе** по критериям ELN 2009;
 - **рекомендовано** при росте уровня транскрипта *BCR-ABL* ($> 0,1\%$) и одновременной потере БМО.
- При проведении лечения нилотинибом или дазатинибом в качестве второй линии терапии исследование на мутации киназного домена гена *BCR-ABL* **обязательно** в случае потери ранее достигнутого ответа, а также **рекомендовано** на момент начала терапии и каждые 3 мес. до достижения БМО в дальнейшем.

На рис. 4 приведены рекомендованные экспертами ELN показания к выполнению анализа мутаций киназного домена *BCR-ABL*.

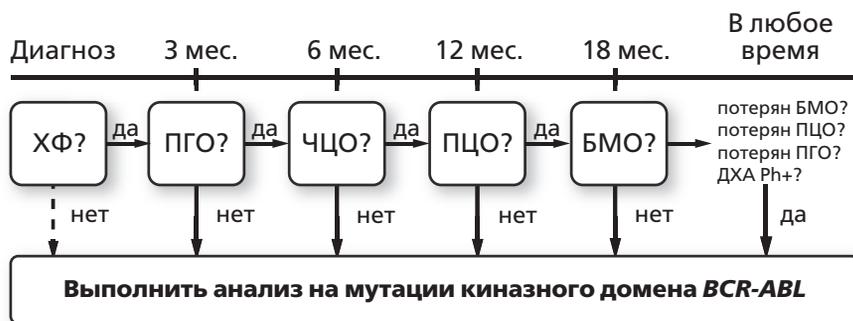


Рис. 4. Показания к анализу мутаций киназного домена *BCR-ABL* [40]

ПГО — полный гематологический ответ; ЧЦО — частичный цитогенетический ответ (Ph+ $\leq 35\%$ при стандартном цитогенетическом исследовании); ПЦО — полный цитогенетический ответ (Ph+ 0% при стандартном цитогенетическом исследовании); БМО — большой молекулярный ответ (*BCR-ABL* $\leq 0,01\%$), ДХА Ph+ — дополнительные хромосомные аберрации в Ph+ клетках.

Четких показаний и временных сроков по исследованию мутаций при лечении ИТК2 в первой линии терапии еще не разработано, требуется больший период наблюдения.

Рекомендованный экспертами ELN **метод рутинного исследования мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*** — прямое секвенирование. При доступности денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии этот метод рекомендован к применению перед выполнением секвенирования, т. к. позволяет провести пре-скрининг и выяснить, есть ли вообще в исследуемом образце мутация *BCR-ABL* (качественный анализ), и только в случае положительного ответа выполнить секвенирование. Пре-скрининг позволяет уменьшить количество анализов методом прямого секвенирования в случае получения отрицательных результатов (т. е. при отсутствии мутаций *BCR-ABL*) и несколько увеличивает чувствительность анализа (с 15–20 до 1–5 %) [50]. В целом относительно низкий порог чувствительности при прямом секвенировании в настоящее время признан более важным для принятия клинических решений, чем выявление мутаций *BCR-ABL* с помощью более чувствительных методов (например, аллель-специфическая ПЦР с чувствительностью 0,01 %), т. к. при этом очевидно доминирующее влияние мутантного клона. При выявлении мутантного клона на относительно низком уровне оказалось трудно предсказать, как скоро проявятся какие-либо изменения на клиническом уровне и не будет ли такой «низкопроцентный» клон элиминирован [48].

Мутация T315I

На сегодня мутация T315I считается единственной, при которой лейкозные клетки не восприимчивы к терапии иматинибом, нилотинибом, дазатинибом, бозутинибом. Мутация T315I, или замена аминокислоты треонина на изолейцин в положении 315 функциональной части киназного домена ABL, приводит к нарушению пространственного связывания с ИТК и потере связывающих ИТК водородных связей. Кроме пространственной преграды при выявлении T315I отмечено устранение активности самоингибирующих механизмов регуляции [41].

У больных ХМЛ и Ph+ ОЛЛ, резистентных ко всем ИТК, данная мутация встречается наиболее часто (30 %) [43]. По данным разных авторов, риск прогрессии в продвинутой фазе у больных с мутацией T315I не выше, чем у резистентных к ИТК больных без данной мутации. По-видимому, это обусловлено относительно слабой киназной активностью клеток с мутацией T315I [46]. Однако нужно иметь в виду, что персистенция клеток с мутантным *BCR-ABL* само по себе есть фактор геномной нестабильности и у резистентных больных закономерно приводит к прогрессии в продвинутой фазе болезни.

До последнего времени единственной эффективной терапией для больных с мутацией T315I считалась аллогенная трансплантация гемопоэтических кроветворных стволовых клеток (аллоТГСК). По данным ретроспективного исследования, у 222 пациентов с мутацией T315I, включенных в Европейский регистр EBMT и эпидемиологические регистры, вероятная выживаемость через 24 мес. после аллоТГСК составляла 59, 67, 30 и 25 % у больных ХМЛ в ХФ, ФА, БК и Ph+ ОЛЛ соответственно [49]. Эти результаты были даже лучше ожидаемых в общей когорте пациентов с мутацией T315I. При многомерном анализе не было выявлено никаких

существенно важных факторов, влияющих на общую выживаемость у пациентов с T315I после аллоТГСК, за исключением тех пациентов, которые были в фазе БК на момент трансплантации, и тех, кому была выполнена неродственная аллогенная трансплантация костного мозга (аллоТКМ).

При отсутствии возможности аллоТКМ пациентам с T315I, получавшим ИТК, эта терапия должна быть прекращена, чтобы остановить селекцию резистентного клона. Вариантами сдерживающего лечения с целью контролировать клинические проявления и предупредить прогрессию ХМЛ для таких больных могут быть подходы, которые использовались в эру до ИТК (циторедуктивная и цитостатическая терапия, интерферонотерапия), с учетом фазы болезни и клинического течения [51].

Имеются данные об эффективности экспериментальной терапии у больных с мутацией T315I. По данным F.J. Giles и соавт., при применении экспериментального препарата МК-0457, представляющего собой ингибитор киназы Аигога, удалось добиться клинического ответа у 3 больных ХМЛ с мутацией T315I, однако его использование осложняется развитием выраженной негематологической токсичности в большинстве случаев [42]. Есть сообщения об успешном применении омацетоксина у 66 пациентов в ХФ-ХМЛ с мутацией T315I: у 64 % пациентов клон с мутацией T315I не определялся, а 2-летняя выживаемость без прогрессирования составила 70 % [52].

Новые возможности в лечении больных ХМЛ и Ph+ ОЛЛ открывает ингибитор тирозинкиназ понатиниб (AP24534). Понатиниб — многоцелевой киназный ингибитор, разработанный в т. ч. для пациентов с мутацией T315I и с множественными мутациями киназного домена *BCR-ABL*. Структура препарата такова, что он не образует водородные связи с тирозином в положении 315 киназного домена *BCR-ABL* благодаря включению виниловых и этиловых связей в пуриновые основания скелета молекулы ингибитора и не препятствует его пространственному связыванию с белком [44]. В настоящее время проходит II фаза клинических исследований по применению понатиниба у больных ХМЛ и Ph+ ОЛЛ с резистентностью лейкозных клеток к терапии иматинибом и ИТК2, а также с мутацией T315I. У 57 % больных в ХФ-ХМЛ (*BCR-ABL*^{T315I}) удалось добиться большого цитогенетического ответа. У 27 % пациентов в БК-ХМЛ/Ph+ ОЛЛ (*BCR-ABL*^{T315I}) был достигнут большой гематологический ответ [45]. Появление нового препарата дает надежду на получение хорошего клинического эффекта у ранее леченных больных с резистентностью ко всем применяющимся на сегодня ИТК и которым по разным причинам не может быть выполнена аллоТКМ.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫБОРУ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ХМЛ С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К ИМАТИНИБУ С УЧЕТОМ МУТАЦИОННОГО СТАТУСА

Согласно существующим на сегодня данным исследований мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*, а также имеющимся возможностям терапии ХМЛ, можно рекомендовать следующий подход для больных с резистентностью к иматинибу:

- при выявлении мутаций F317L/V/I/C, T315A, V299L предпочтительнее терапия **нилотинибом**;
- при выявлении мутаций Y253H, E255K/V, F359V/C предпочтительнее терапия **дазатинибом**.

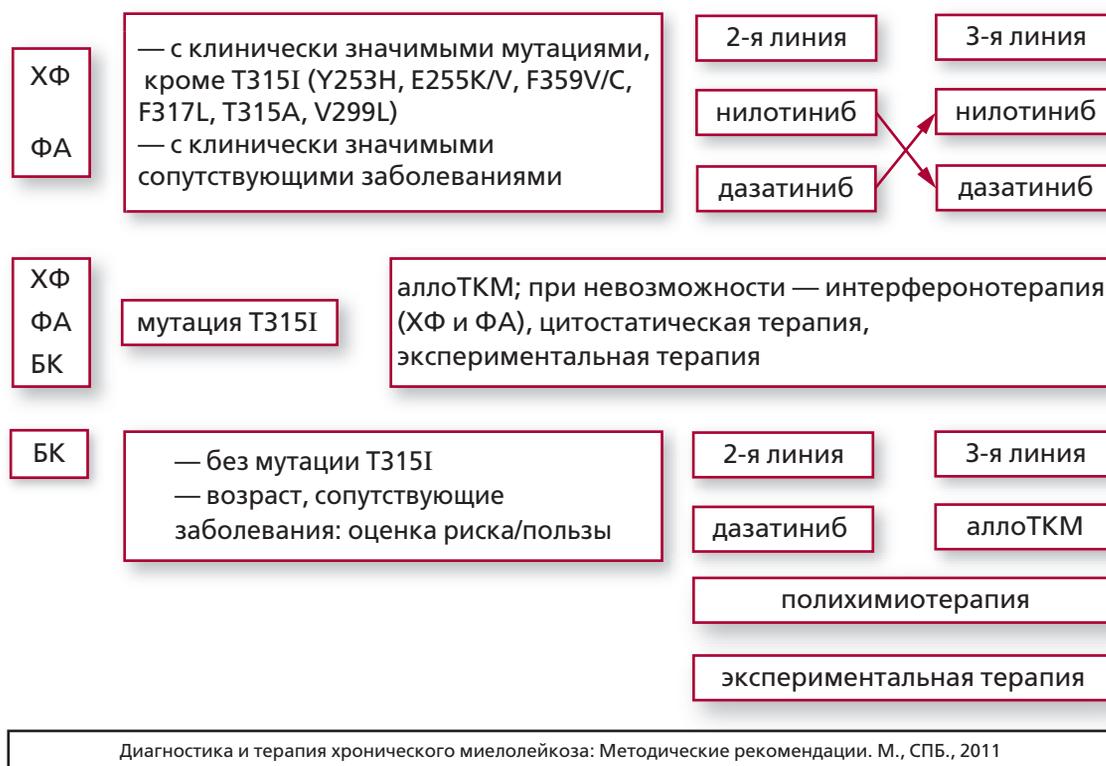


Рис. 5. Алгоритм выбора ингибиторов тирозинкиназ второго поколения при неудаче терапии иматинибом

Абсолютное противопоказание к терапии всеми ИТК (иматиниб, нилотиниб, дазатиниб, бозутиниб) — **мутация Т315I**. При выявлении данной мутации рекомендуется решать вопрос о поиске HLA-идентичного донора и выполнении аллоТГСК. В качестве альтернативного лечения при невозможности проведения аллоТГСК — терапия гидроксимочевинной, курсы малых доз цитарабина, курсы полихимиотерапии, интерферонотерапия, а также лечение в рамках клинических исследований.

Окончательный алгоритм принятия решений при выборе терапии у больных с резистентностью к иматинибу представлен на рис. 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ген *BCR-ABL* играет ключевую роль в патогенезе ХМЛ: активирует каскад сигнальных путей и меняет молекулярный гомеостаз, что приводит к развитию нерегулируемой клеточной пролиферации и снижению апоптоза. Геномная нестабильность и развитие мутаций киназного домена *BCR-ABL* — важный механизм резистентности при ХМЛ и Ph+ ОЛЛ. Наличие мутаций в настоящее время можно оценивать и мониторировать доступными методами. Однако очевидно, что *BCR-ABL*-зависимая тирозинкиназа взаимодействует со множеством других клеточных и генетических событий, которые с течением времени накапливаются и приводят к прогрессии заболевания до БК. Вклад *BCR-ABL*-зависимых и независимых механизмов резистентности у каждого конкретного пациента трудно оценить в рутинной клинической практике. Объяснить случаи резистентного течения ХМЛ только присутствием каких-либо мутантных клонов недостаточно, поэтому данные мутационного статуса у больных ХМЛ должны обязательно интерпретироваться в клиническом отношении.

Лучшее понимание механизмов, лежащих в основе резистентности при ХМЛ, дальнейшее накопление экс-

периментального и клинического опыта могут помочь в выборе стратегий терапии у больных ХМЛ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G. et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2408–17.
2. Deininger M., O'Brien S.G., Guilhot F. et al. International randomized study of interferon vs STI571 (IRIS) 8-year follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. *Blood* 2009; 114: 1126 (abstr).
3. Gambacorti-Passerini C., Zucchetti M., Russo D. et al. Alpha-1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin. Cancer Res.* 2003; 9(2): 625–32.
4. Wang L., Giannoudis A., Lane S. et al. Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008; 83(2): 258–64.
5. Домрачева Е.В., Захарова А.Е., Асеева Е.А. Прогностическое значение дополнительных цитогенетических аномалий при хроническом миелолейкозе. *Гематол. и трансфузиол.* 2005; 50(4): 37–41.
6. Мартынкевич И.С., Мартыненко Л.С., Иванова М.П. и др. Дополнительные хромосомные аберрации у больных хроническим миелолейкозом. *Гематол. и трансфузиол.* 2007; 52(2): 28–35.
7. Cortes J.E., Talpaz M., Giles F. et al. Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood* 2003; 101(10): 3794–800.
8. Куцев С.И., Морданов С.В., Зельцер А.Н. Прогностическое значение дополнительных хромосомных аномалий в Ph-позитивных клетках в терапии иматинибом хронического миелолейкоза. *Мед. генет.* 2009; 10: 27–33.
9. Donato N.J., Wu J.Y. et al. BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 2003; 101: 690–8.
10. Perrotti D., Jamieson C. et al. Chronic myeloid leukemia. Mechanisms of blastic transformation. *J. Clin. Invest.* 2010; 120(7): 2254–62.
11. Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003; 102: 276–83.
12. Cortes J., Jabbour E., Kantarjian H. et al. Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2007; 110: 4005–11.
13. Jabbour E., Kantarjian H., Jones D. et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 2006; 20: 1767–73.

14. Куцев С.И., Вельченко М.В. Значение анализа мутаций гена BCR-ABL в оптимизации таргетной терапии хронического миелолейкоза. *Клин. онкогематол.* 2008; 1(3): 190–9.
15. Branford S. Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2007: 376–83.
16. Apperley J.F. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* 2007; 8: 1018–29.
17. Deininger M., Buchdunger E., Druker B. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105(7): 2640–53.
18. Corbin A.S., La Rosee P., Stoffregen E.P. et al. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003; 101: 4611–4.
19. Shah N.P., Nicoll J.M., Nagar B. et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002; 2: 117–25.
20. O'Hare T., Eide C.A., Deininger M.W. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110: 2242–9.
21. Redaelli S., Piazza R., Rostagno R. et al. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 469–71.
22. Laneuville P., Dilea C., Yin O.Q. et al. Comparative in vitro cellular data alone are insufficient to predict clinical responses and guide the choice of BCR-ABL inhibitor for treating imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28: e169–e171, author reply e172.
23. Soverini S., Rosti G. et al. Choosing the best second-line tyrosine kinase inhibitor in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients harboring BCR-Abl kinase domain mutations: how reliable is the IC₅₀? *Oncologist* 2011; 16: 868–76.
24. Azam M., Latek R.R., Daley G.Q. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 2003; 112: 831–43.
25. Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.S. et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190–6.
26. Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003; 102: 276–83.
27. Jabbour E., Kantarjian H., Jones D. et al. Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 2006; 20: 1767–73.
28. Soverini S., Colarossi S., Gnani A. et al. Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12(24): 7374–9.
29. Hedges T., Saglio G., Branford S. et al. Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(25): 4204–10.
30. Muller M., Cortes J. et al. Dasatinib treatment of chronic-phase chronic myeloid leukemia: analysis of responses according to preexisting BCR-ABL mutations. *Blood* 2009; 114: 4944–53.
31. Shah N. Fine-tuning targeted therapy of CML. *Blood* 2009; 114(24): 4914–5.
32. Soverini S., Colarossi S. et al. Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematol.* 2007; 92(3): 401–4.
33. Soverini S., Gnani A., Colarossi S. et al. Philadelphia-positive patients who already harbor imatinib-resistant Bcr-Abl kinase domain mutations have a higher likelihood of developing additional mutations associated with resistance to second or third-line tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2009; 114(10): 2168–71.
34. Rosti G., Palandri F., Castagnetti F. et al. Nilotinib for the frontline treatment of Ph+ chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 114(24): 4933–8.
35. Cortes J.E., Jones D., O'Brien S. et al. Nilotinib as front-line treatment for patients with chronic myeloid leukemia in early chronic phase. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(3): 392–7.
36. Kantarjian H., Shah N.P., Hochhaus A.S. et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362(24): 2260–70.
37. Saglio G., Kim D.W., Issaragrisil S. et al. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2010; 362(24): 2251–9.
38. Cortes J.E., Jones D., O'Brien S. et al. Results of dasatinib therapy in patients with early chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(3): 398–404.
39. Soverini S., Gnani A. et al. *Haematologica* 2011; 96(s2): abstr. 486.
40. Soverini S., Hochhaus A. et al. BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 2011; 118(5): 1208–15.
41. Jakob R.E., Dumitrescu T.P. et al. Conformational disturbance in Abl kinase upon mutation and deregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106(5): 1386–91.
42. Giles F.J., Cortes J., Jones D. et al. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* 2007; 109: 500–2.
43. Soverini S., Gnani A., Benedittis C. et al. *Haematologica* 2011; 96(s2): abstr. 486.
44. O'Hare T., Shakespeare W.C., Zhu X. et al. AP24534, a Pan-BCR-ABL inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell* 2009; 16(5): 401–12.
45. Cortes J., Kim D.-W., Pinilla J. et al. Initial finding from the PACE Trial: a pivotal phase 2 study of ponatinib in patients with CML and Ph+ALL resistant or intolerant to dasatinib or nilotinib, or with the T315I mutation. Presented at the 53d Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH) San Diego CA, 11 December 2011. Abstract 109.
46. Skaggs B.J., Gorre M.E., Ryykin A. et al. Phosphorylation of the ATP-binding loop directs oncogenicity of drug-resistant BCR-ABL mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 19466–71.
47. Griswold I.J., MacPartlin M., Bumm T. et al. Kinase domain mutants of Bcr-Abl exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol. Cell Biol.* 2006; 26: 6082–93.
48. Willis S.G., Lange T., Demehri S. et al. High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naïve patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* 2005; 106(6): 2128–37.
49. Nicolini F., Basak G.W., Soverini S. et al. Allogeneic stem cell transplantation for patients harboring T315I BCR-ABL mutated leukemias. *Blood* 2011; 118(20): 5697–700.
50. Deininger M.W., McGreevey L., Willis S. et al. Detection of ABL kinase domain mutations with denaturing high-performance liquid chromatography. *Leukemia* 2004; 18(4): 864–71.
51. Ломаица Е.Г., Романова Е.Г., Горюнова Е.Н. и др. Длительное течение заболевания у больного хроническим миелолейкозом с мутацией T315I гена BCR-ABL. Клиническое наблюдение и обзор литературы. *Клин. онкогематол.* 2010; 3(4): 375–9.
52. Cortes J., Khoury H., Corm S. et al. Subcutaneous omacetaxine mepe-succinate in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (CML) patients (Pts) with the T315I mutation: Data from an ongoing phase II/III trial. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 15s, abstr. 7008.
53. Bixby D., Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Am. Soc. of Hematol. Ed. Book.* New Orleans, 2009: 461–76.
54. Baccarani M., Cortes J., Pane F. et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27(35): 6041–51.