

Значение анализа мутаций гена BCR-ABL в оптимизации таргетной терапии хронического миелолейкоза

С. И. Куцев, М. В. Вельченко

The role of BCR-ABL gene mutation analysis in the optimization of target therapy of chronic myeloid leukemia

S. Kutsev, M. Velchenko

SUMMARY

Imatinib mesylate is a potent and high selective inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase, which is established now as the standard of Philadelphia chromosome (Ph) positive chronic myeloid leukemia (CML) treatment. The treatment of patients with chronic phase of Ph (+)CML with imatinib has resulted in high rates of hematologic and cytogenetic responses. Nevertheless, primary and acquired resistance has been observed in few CML patients. Resistance to imatinib is associated with a heterogeneous mechanisms. The most frequently identified mechanism of imatinib resistance is BCR-ABL kinase domain gene point mutations that impair imatinib binding. Mutations prevent the activity of imatinib in different ways. New tyrosine kinase inhibitors (nilotinib, dasatinib) inhibit BCR-ABL more potently than imatinib and maintain activity against majority of imatinib resistant BCR-ABL mutants. The role of mutation analysis in changing of therapeutic strategy of imatinib resistant CML patients (switch on stem-cell transplantation program, imatinib dose escalation, changing therapy to new tyrosine kinase inhibitors) is discussed in this review.

Keywords:

chronic myeloid leukemia, BCR-ABL tyrosine kinase, mutations, tyrosine kinase inhibitors.

Rostov State Medical University

Контакты: kutsev@mail.ru

Принято в печать: 8 августа 2008 г.

РЕФЕРАТ

Новым стандартом терапии Ph-позитивного хронического миелолейкоза (ХМЛ) является применение иматиниба — селективного ингибитора BCR-ABL-тирозинкиназы. Лечение иматинибом пациентов в хронической фазе Ph-позитивного ХМЛ приводит к достижению гематологической и цитогенетической ремиссии с большой частотой. Однако у некоторых пациентов с ХМЛ наблюдается первичная или приобретенная резистентность к иматинибу. Механизмы развития резистентности различны, но наиболее частой причиной резистентности к иматинибу являются точечные мутации гена *BCR-ABL*, которые приводят к заменам аминокислот в белке BCR-ABL, что нарушает связывание с ним иматиниба и снижает эффективность препарата. Ингибиторы тирозинкиназ II поколения (нилотиниб, дазатиниб) значительно более эффективны, чем иматиниб. Более того, эти лекарственные вещества способны ингибировать большинство мутантных форм BCR-ABL-тирозинкиназы. В обзоре обсуждается возможность использования результатов мутационного анализа для выбора тактики терапии иматиниб-резистентных случаев ХМЛ.

Ключевые слова

хронический миелолейкоз, BCR-ABL-тирозинкиназа, мутации, ингибиторы тирозинкиназ.

ВВЕДЕНИЕ

Исключительная эффективность таргетной терапии иматинибом хронического миелолейкоза (ХМЛ) доказана в «ключевом» рандомизированном сравнительном исследовании IRIS и других клинических исследованиях.¹⁻⁷ Между тем опыт ведения пациентов с ХМЛ при использовании монотерапии иматинибом показал необходимость регулярного цитогенетического и/или молекулярно-генетического мониторинга ремиссии. В клиническом исследовании IRIS у вновь выявленных пациентов с ХМЛ, получающих терапию иматинибом в дозе 400 мг/сут, в 4 % случаев не удалось достичь полной гематологической ремиссии по истечении 3 мес. терапии, в 16 % случаев не удалось достичь большого цитогенетического от-

вета после 12 мес. терапии и в 23 % — после 18 мес. терапии.³ Таким образом, приблизительно 20–25 % пациентов с только что установленным диагнозом ХМЛ характеризуются субоптимальным ответом или резистентностью к иматинибу в дозе 400 мг/сут.³

Резистентные к иматинибу пациенты с ХМЛ должны быть выявлены как можно раньше в процессе лечения заболевания, когда терапевтическая интервенция еще может быть эффективна. Кроме того, большинство пациентов, ответивших на лечение иматинибом достижением полного цитогенетического ответа, имеют признаки минимальной остаточной болезни, выявляемые методом количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR) даже через 2–3 года после начала терапии.^{8,9} Данное обстоятельство предполагает воз-

возможность появления резистентности с течением времени и подтверждает необходимость регулярного цитогенетического и молекулярного мониторинга.

В результате поиска путей преодоления резистентности к иматинибу недавно появились новые препараты группы ингибиторов тирозинкиназ.¹⁰ Эти фармакологические субстанции оказались эффективными для достижения ремиссии у пациентов с первичной и вторичной резистентностью к иматинибу. II поколение ингибиторов тирозинкиназ обладает значительно большим терапевтическим потенциалом благодаря тому, что более эффективно ингибирует активность BCR-ABL-киназы. Более того, новые препараты значительно эффективнее подавляют активность мутантных форм BCR-ABL у иматиниб-резистентных пациентов. Определенные роли этих ингибиторов в лечении отдельных пациентов с ХМЛ будет зависеть от раннего выявления резистентности к иматинибу и, если возможно, выяснения ее причин.

Понятие резистентности к терапии иматинибом включает в себя, по меньшей мере, две дефиниции: первичную резистентность (или рефрактерность) и вторичную резистентность. Рефрактерность — это отсутствие гематологического ответа после 3 мес. терапии иматинибом в дозе 400 мг/сут, цитогенетического ответа — после 6 мес., частичного цитогенетического ответа — после 12 мес., полного цитогенетического ответа — после 18 мес. терапии. Вторичная, или приобретенная, резистентность определяется как потеря уже достигнутого гематологического, цитогенетического или молекулярного ответа либо прогрессирование заболевания с переходом в фазу акселерации или бластного криза.¹¹ По мнению Н. Kantarjian и соавт.,¹² пациент при утрате цитогенетического или молекулярного ответа на терапию иматинибом в дозе 400 мг/сут рассматривается как резистентный, если отсутствует эффект от терапии иматинибом в дозе 600 мг/сут и более как минимум после 3 мес. такого лечения.

МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ИМАТИНИБУ

Механизмы, лежащие в основе развития резистентности к иматинибу при ХМЛ, можно разделить на связанные и не связанные с BCR-ABL-тирозинкиназой. К механизмам резистентности, обусловленным изменением состояния BCR-ABL-тирозинкиназы, относят амплификацию, повышенную экспрессию и мутации гена *BCR-ABL*. Не связанные с BCR-ABL механизмы включают появление дополнительных хромосомных aberrаций, активацию BCR-ABL-независимых сигнальных путей (например, активацию членов семейства SRC-киназ, усиливающих пролиферацию и подавляющих апоптоз лейкоэмических клеток), избыточное связывание иматиниба с транспортными белками крови (например, связывание иматиниба с сывороточным α_2 -кислым гликопротеидом приводит к повышению концентрации иматиниба в плазме крови и снижению его внутриклеточной концентрации), повышенную экспрессию белка множественной лекарственной резистентности PGP (белок PGP является клеточным «насосом», выкачивающим из цитоплазмы лекарственные препараты).

Впервые в экспериментах *in vitro* было показано, что повышенная экспрессия *BCR-ABL* мРНК и белка BCR-ABL, в основе которой лежит амплификация гена или его повышенная транскрипция, является одним из механизмов развития резистентности к иматинибу.¹³⁻¹⁵

Спонтанная амплификация гена *BCR-ABL* описана *in vivo* у пациентов с ХМЛ при переходе хронической фазы в бластный криз в форме дубликации Ph-хромосомы или изолированной амплификации гена.^{16,17} По данным А. Hochhaus,¹⁸

множественные копии гена *BCR-ABL* методом флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) обнаружены у 2 из 7 обследованных больных ХМЛ с первичной резистентностью и не обнаружены ни у одного из 25 пациентов с ХМЛ при рецидиве. Интересно, что еще у 7 пациентов выявлено по две копии гена *BCR-ABL*, что оказалось следствием появления второй Ph-хромосомы. М. Gogge и соавт.¹⁹ с помощью FISH показали геномную амплификацию гена *BCR-ABL* у 3 из 9 пациентов с резистентной формой заболевания.

Однако, по мнению большинства исследователей, наиболее частой причиной резистентности к иматинибу являются точечные мутации гена *BCR-ABL*,^{8,20-26} которые приводят к замене аминокислот в белке BCR-ABL и, как следствие, к изменению конформации белка или структуры активного центра BCR-ABL-киназы. В результате аминокислотных замен иматиниб не способен эффективно связываться с BCR-ABL-киназой и оказывать на нее ингибирующее действие.

МУТАЦИИ ГЕНА BCR-ABL

Впервые мутации химерного гена *BCR-ABL* как причина резистентности к иматинибу были выявлены в работе М. Gogge и соавт.¹⁹ В группе из 9 пациентов в хронической фазе ХМЛ, достигших гематологической и даже полной цитогенетической ремиссии при терапии гливекком в дозе 400 мг/сут и затем утративших цитогенетический ответ в течение 2–6 мес., у 6 больных была обнаружена мутация T315I. Хотя выявление одинаковой мутации сразу у 6 из 9 пациентов вызвало удивление ряда гематологов,^{27,28} тем не менее в работе М. Gogge и соавт.¹⁹ впервые было доказано, что замена треонина на изолейцин в положении 315 белка BCR-ABL приводит к нарушению водородной связи между иматинибом и киназным доменом BCR-ABL. Как следствие, при мутации T315I наблюдается реактивация BCR-ABL-опосредованной сигнальной трансдукции даже на фоне высоких доз иматиниба.

Частота мутаций, приводящих к резистентности, у пациентов с ХМЛ зависит от фазы заболевания. Так, в исследовании итальянской рабочей группы GIMEMA был проведен мутационный анализ у 297 пациентов с первичной и вторичной резистентностью к иматинибу, мутации были выявлены у 127 из них, что составило 43%.²⁹ При этом мутации были обнаружены у 27% пациентов в хронической фазе, у 52% — в фазе акселерации, у 75% — с миелодным бластным кризом и у 85% больных с лимфоидным бластным кризом. Мутации были выявлены у 30% пациентов с первичной резистентностью и в 57% случаев вторичной (приобретенной) резистентности к иматинибу.

В настоящее время идентифицировано, по крайней мере, 90 точечных мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*, каждая из которых приводит к замене одной из 53 аминокислот в белке BCR-ABL-тирозинкиназы и обуславливает резистентность к иматинибу.³⁰ Различные мутации встречаются у резистентных к иматинибу пациентов с неодинаковой частотой. Т. Hughes и соавт. (2006) обобщили данные 20 опубликованных работ, проанализировав частоту различных мутаций у 245 пациентов (219 больных ХМЛ и 26 — с Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом).³¹ Чаше всего у резистентных пациентов с ХМЛ и Ph-позитивным острым лимфобластным лейкозом обнаруживают мутации E255K/V и M351T, а также мутацию T315I, устойчивую не только к иматинибу, но и к ингибиторам тирозинкиназ II поколения (рис. 1). По данным S. Soverini и соавт.,²⁹ мутации M244V, G250E, Y253F/H, E255K/V, T315I, M351T и F359V составляют 85% всех мутаций, ассоциированных с резистентностью к иматинибу.

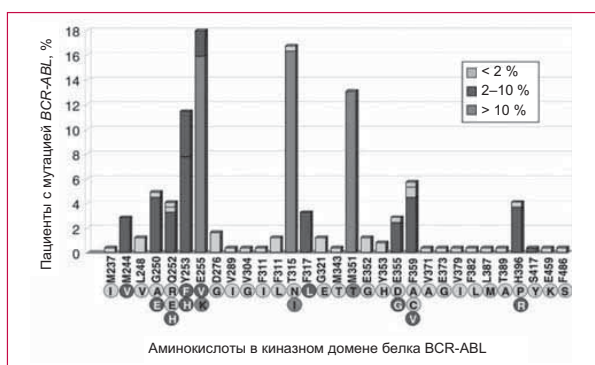


Рис. 1. Относительная частота мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*.31 В кружочках указаны аминокислоты, на которые происходит замена в результате обозначенной мутации

Некоторые наблюдения подтверждают, что возникновение мутаций киназного домена является частью механизма эволюции заболевания и не связано с терапией иматинибом.³² Так, частота выявления мутаций киназного домена значительно выше в фазах акселерации и бластного криза по сравнению с хронической фазой и увеличивается в зависимости от длительности заболевания.^{8,29}

Одной из изученных причин появления мутаций гена *BCR-ABL* является, как ни странно, повышенная активность самого белка *BCR-ABL*. Тирозинкиназа *BCR-ABL* индуцирует геномную нестабильность посредством различных механизмов, включая оксидативный стресс.³³ Активные формы кислорода, образующиеся в *BCR-ABL*-трансформированных клетках, обладают мутагенным свойством и вызывают мутации гена *BCR-ABL*. Чем дольше лейкоэмические клетки находятся под воздействием фермента *BCR-ABL*, обладающего повышенной тирозинкиназной активностью, тем больше риск появления мутаций гена *BCR-ABL*, дополнительных хромосомных aberrаций, прогрессии заболевания.^{8,34} После начала терапии ХМЛ иматинибом риск появления мутаций гена *BCR-ABL*, цитогенетической клональной эволюции и прогрессии заболевания быстро снижается, поскольку уменьшается количество клеток, находящихся под воздействием *BCR-ABL*-киназы.³²

Методы выявления мутаций гена *BCR-ABL*

Мутации киназного домена *BCR-ABL*, по данным разных авторов, обнаруживаются у 50–90 % пациентов с вторичной резистентностью. Различия данных о частоте мутаций обусловлены многими причинами, но наиболее очевидной является разница в чувствительности методов, использованных для выявления мутаций. В настоящее время для выявления мутаций киназного домена гена *BCR-ABL* используется несколько подходов (табл. 1).

Чувствительность выражена в процентах мутантных последовательностей, которые могут быть выявлены указанным методом. Оценка стоимости включает цену оборудования, необходимого для использования данного метода.

Таблица 1. Методы, используемые для выявления мутаций гена *BCR-ABL*³⁵

Метод	Чувствительность, %	Возможность определения всего спектра мутации	Количественная оценка мутантного клона	Стоимость/распространенность
Прямое ДНК-секвенирование	10–20	Да	Нет	\$/+++
Клонирование с последующим секвенированием	10	Да	Нет	\$\$/+
Денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография с последующим секвенированием	1–5	Да	Нет	\$\$\$/++
Пиросеквенирование	5	Да	Полуколичественная	\$\$/+
Двойной градиентный денатурирующий электрофорез	5	Да	Нет	\$\$/+
Алель-специфическая ПЦР	0,1	Нет	Нет	\$/+
Мультиплексный анализ однонуклеотидного полиморфизма и масс-спектрометрия	1,5–3	Да	Да	\$\$\$\$/+

Наиболее широко распространенным методом выявления мутаций гена *BCR-ABL* у резистентных пациентов является прямое секвенирование ДНК, позволяющее расшифровать первичную структуру гена. Из крови или костного мозга пациентов выделяют тотальную РНК, которую с помощью реакции обратной транскрипции (РТ-ПЦР) переводят в комплементарную ДНК (кДНК). Из полученной кДНК с помощью ПЦР амплифицируют ген *BCR-ABL* и затем его секвенируют.^{20,36,37} По мнению некоторых авторов, основным недостатком метода является довольно низкая чувствительность (10–20 %), которая может привести к ложноотрицательным результатам.

N. Shah и соавт.²¹ для оптимизации чувствительности детекции мутаций использовали метод субклонирования с последующим ДНК-секвенированием. В работе использовалась РТ-ПЦР-амплификация мРНК, выделенной из костного мозга или крови пациентов с ХМЛ. ПЦР-ампликоны клонировали и затем 10 независимых ПЦР-продуктов от каждого пациента секвенировали. Мутации считались обнаруженными, если они определялись в двух разных клонах от одного пациента. Таким образом, мутантные клоны составляли примерно 20 % общего пула *BCR-ABL* мРНК транскрипта, что соответствовало чувствительности метода прямого ДНК-секвенирования. Авторы анализировали 32 случая рецидива у пациентов с ХМЛ после достижения гематологической ремиссии при терапии гливексом в дозе 400 мг/сут. Мутации были обнаружены у 29 пациентов (15 из 16 в с миелоидным бластным кризом, 4 из 5 с лимфоидным бластным кризом, 10 из 11 в хронической фазе ХМЛ).

Метод аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) обладает очень высокой чувствительностью — 0,1–0,01 %. Это означает, что мутантный клон можно выявить, даже если он составляет всего лишь $1/1000$ общего объема лейкоэмических клеток. Однако в этом случае необходимо учитывать, что клиническое значение наличия такого низкопроцентного мутантного клона не вполне понятно.³⁵ Действительно, АС-ПЦР позволяет иногда выявить мутации киназного домена в небольшом проценте клеток даже до начала терапии ингибиторами тирозинкиназ. В некоторых случаях в процессе терапии происходит селекция и рост этих мутантных, резистентных к терапии клонов опухолевых клеток.³⁷ Тем не менее в других случаях выявление низкопроцентного клона клеток с мутацией до начала лечения не означает, что на фоне терапии произойдет экспансия именно мутантного клона (даже при обнаружении до начала терапии абсолютно резистентной мутации T315I).^{34,38} Для прогрессии необходимы какие-то дополнительные факторы. Возможное объяснение этому: мутации возникают в более дифференцированных клетках лейкозного пула и постепенно элиминируются, тогда как гемопоэз лейкоэмических клеток поддерживается стволовыми клетками.³²

К серьезным недостаткам АС-ПЦР относится возможность выявления в одной реакции только одной специфической мутации и невозможность исследовать весь ген *BCR-ABL*.

В последнее время все большее распространение получает метод, занимающий по своей чувствительности (1–5 %) промежуточное положение между прямым ДНК-секвенированием и АС-ПЦР. Это метод денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии для рутинного скрининга мутаций гена *BCR-ABL* с последующим подтверждающим ДНК-секвенированием обнаруженных мутантных аллелей. Обладая довольно высокой чувствительностью, этот метод позволяет определять весь спектр мутаций гена *BCR-ABL*.^{39,40}

Таким образом, на практике использование высокочувствительных методов определения мутаций киназного домена гена *BCR-ABL* в качестве методов скрининга мутаций представляется целесообразным. Выявление мутации, которая реально присутствует в небольшом проценте лейкоэмических клеток, может привести к принятию ошибочных терапевтических решений.³² Если же мутантный клон выявляется методом ДНК-секвенирования или методом клонирования с последующим секвенированием, можно с уверенностью говорить о доминировании мутантного клона лейкоэмических клеток.

Классификация мутаций гена *BCR-ABL*

В соответствии с классификацией N. Shah и соавт.,²¹ H. Kantarjian и соавт.,⁴¹ основанной на особенностях конформационных изменений белка *BCR-ABL*, мутации гена *BCR-ABL* можно разделить на две группы. Первая группа включает мутации, препятствующие контакту *BCR-ABL*-киназы и иматиниба, но не влияющие на пространственную организацию белка *BCR-ABL* (например, T315I, F317L, F359V). Замена какой-либо одной из 20 аминокислот активного центра киназного домена *BCR-ABL*, вовлеченного в связывание с иматинибом, приводит к уменьшению аффинности иматиниба к *BCR-ABL* или ингибированию пространственного связывания иматиниба.

Вторая группа включает мутации, которые изменяют конформацию белка *BCR-ABL* (M244V, G250E, G252H/R, Y253F/H, E255K, M351T, E355G, V379I, L387M, H396R).^{21,42} Структура *BCR-ABL*-киназы содержит две гибкие петлевые структуры: АТФ-связывающую (Р-петля) и активационную петлю (А-петля). Р- и А-петли характеризуются специфичным, стабилизирующим структуру белка, пространственным расположением при неактивной конформации *BCR-ABL*. Иматиниб, действующий как конкурирующий ингибитор АТФ-связывающего домена, интимо взаимодействует с киназным доменом *BCR-ABL*, образуя контакты минимум с 21 аминокислотой. Критически важным моментом для понимания ингибирующего действия иматиниба является то, что он взаимодействует с неактивной формой *BCR-ABL*-киназы, при которой активационная петля — наиболее важный регуляторный элемент, закрывает каталитический центр. Мутации в участке гена *BCR-ABL*, кодирующем Р- и А-петли, дестабилизируют их расположение так, что домен киназы не может перейти в неактивную пространственную организацию, необходимую для связывания с иматинибом.

M. Deininger, E. Buchdunger, B. Druker⁴³ предлагают классифицировать мутации гена *BCR-ABL* по месту расположения в той или иной части киназного домена *BCR-ABL*. Различные локализации мутаций обуславливают и разные функциональные изменения киназы. Киназный домен онкопротеина *BCR-ABL* идентичен домену киназы нормального белка *ABL* и может быть разделен на четыре составные части: Р-петля («АТФ-связывающий карман»), промежуточная последовательность, каталитический домен и А-петля (активационная петля). Используя этот подход, можно выделить мутации Р-петли, T315, M351, А-петли.

Мутации Р-петли. Р-петля — чрезвычайно гибкая, богатая аминокислотой глицином структура, выполняющая функцию связывания с молекулой АТФ в нормальном белке *ABL*. Она образована аминокислотами, занимающими в белке *ABL* позиции с 244-й по 255-ю. При связывании с иматинибом Р-петля белка *BCR-ABL* подвергается наибольшему конформационному видоизменению. Взаимодействие с иматинибом стабилизируется посредством водородных связей между аминокислотами, находящимися в положении Y253 и N322 белка *BCR-ABL*, при этом аминокислоты белка формируют вокруг иматиниба «гидрофобный цилиндр».

Основным последствием мутаций, затрагивающих аминокислоту в положении Y253, является разрушение водородной связи между аминокислотами в положении Y253 и N322.⁴³ Другие мутации Р-петли могут нарушать равновесие, необходимое для «подгонки» белка *BCR-ABL* под связывание с иматинибом.⁴⁴ Кроме того, эти мутации вызывают изменения физиологических механизмов регуляции клетки. Например, предполагается, что мутация Y253F препятствует связыванию домена *ABL* с физиологическими ингибиторами, что проявляется повышением киназной активности *BCR-ABL* в сравнении с диким типом *BCR-ABL*.⁴⁵

Мутация E255V/K, приводящая к замене глутамина на валин или лизин в положении 255, впервые была обнаружена С. Barthe и соавт.²⁷ у 1 из 12 пациентов с ХМЛ и ОЛЛ, у которых рецидив произошел на фоне терапии иматинибом. А. Hochhaus и соавт.²⁸ также выявили данную мутацию у 1 из 32 пациентов с ХМЛ, оказавшихся рефрактерными к терапии гливеком. Авторы показали, что в указанном случае мутация E255V приводит к реактивации *BCR-ABL*-киназы на фоне терапии иматинибом.

Мутации T315. Вторая группа мутаций затрагивает тронин в положении T315, формирующий водородные связи с иматинибом, и реже фенилаланин в положении F317, связывающий иматиниб посредством водородных связей. Замена треонина на изолейцин при мутации T315I препятствует не только образованию водородной связи с иматинибом,¹⁹ но и пространственному связыванию иматиниба.

Мутации M351. Несмотря на то что кристаллическая структура N-терминального региона *Abl*-киназы и механизмы ее физиологической регуляции уже известны,⁴⁶ до сих пор остается неясным, что лежит в основе резистентности к иматинибу при мутации M351T. Аминокислота метионин в положении 351 контактирует с SH2-доменом *ABL*-киназы, стабилизируя неактивную конформацию *ABL*. Хотя химерный белок *BCR-ABL* активен постоянно, механизмы его аутоингибирования частично сохраняются. Нарушение связи между SH2- и киназным доменом ослабляет аутоингибирование и переводит *ABL*-домен в активную конформацию, в результате которой иматиниб не может связаться.

Четвертая группа мутаций локализована в активационной петле (А-петле), образованной аминокислотами в положении с 381-го по 402-й. Пространственное расположение А-петли регулирует киназную активность. В активной, «открытой» позиции А-петля расположена вдали от каталитического центра киназы. Мутации А-петли препятствуют трансформации киназы в ее неактивную конформацию, которая необходима для связывания с иматинибом.

Помимо мутаций в так называемых горячих точках мутации наблюдаются во многих других позициях киназного домена. Данные, полученные в экспериментах *in vitro*, показывают, что некоторые мутации приводят к незначительной степени резистентности к иматинибу. Активность таких мутантных форм *BCR-ABL* почти не отличается от активности дикого типа *BCR-ABL*.⁴⁷ Маловероятно, чтобы *in vivo* эти мутации были способны вызвать высокий уровень резис-



стентности к иматинибу, если только не подключатся какие-либо дополнительные механизмы, обуславливающие резистентность. Поэтому некоторые мутации гена *BCR-ABL*, например F317L и F359V, являются причиной высокой степени резистентности только в том случае, если они сочетаются с другими мутациями. Очень важно, что повышение дозы иматиниба при этих мутациях зачастую приводит к достижению цитогенетической ремиссии.

По сути дела, как классификация мутаций Shah и Kaptaňap, основанная на особенностях конформационных изменений *BCR-ABL*-киназы в результате мутации, так и классификация Deninger, базирующаяся на анализе структуры белка *BCR-ABL*, являются структурно-функциональными классификациями. Изменение конформации всего белка *BCR-ABL* или структуры какого-либо его функционально важного участка приводит к изменению механизма работы *BCR-ABL*-тирозинкиназы. При этом снижается ингибирующее действие иматиниба.

Различная локализация мутаций в гене *BCR-ABL* и замена аминокислот в киназном домене *BCR-ABL* приводят к разным функциональным изменениям киназного домена и, как следствие, обуславливают разную степень резистентности к иматинибу. Тем не менее данные о значимости мутаций с различной локализацией для прогнозирования эффективности терапии иматинибом, их потенциальной роли в прогрессии заболевания и выживаемости пациентов с ХМЛ противоречивы.^{8,21,36}

Наибольшее клиническое значение имеет классификация мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*, основанная на изменении чувствительности мутантных форм белка *BCR-ABL* к иматинибу.⁴⁷ Эта классификация имеет исключительно функциональный характер. А. Corbin и соавт.⁴⁷ выделяют мутации, значительно или умеренно снижающие чувствительность *BCR-ABL*-киназы к иматинибу, и мутации, незначительно изменяющие чувствительность к иматинибу в тестах *in vitro*.

Для оценки влияния различных мутаций на связывание иматиниба с *BCR-ABL*-киназой используются:

биохимический тест киназной активности — определяется фосфорилирующая активность изолированной мутантной формы *ABL*-киназы в присутствии различных концентраций иматиниба *in vitro*;

пролиферативный тест — оценка пролиферативной активности клеточных линий, несущих мутантную форму *ABL*-киназы, в присутствии различных концентраций иматиниба *in vitro*.

Степень чувствительности к иматинибу как в биохимическом, так и пролиферативном тесте можно наглядно представить показателем IC_{50} (inhibitor concentration 50 %) — концентрацией иматиниба, снижающей на 50 % тирозинкиназную активность фермента *ABL* в биохимическом тесте и пролиферативную активность Ph-позитивных клеточных линий *in vitro*.

В настоящее время идентифицировано 90 мутаций гена *BCR-ABL*, которые приводят к замене 53 различных аминокислот в белке *BCR-ABL*.³⁰ Причинная связь этих мутаций с резистентностью к иматинибу доказана в экспериментах *in vitro* измерением показателя IC_{50} в пролиферативном и биохимическом тестах.

Результаты исследований показали, что степень чувствительности к иматинибу при различных мутациях варьирует, но всегда наблюдается повышение уровня IC_{50} . Однако, если для одних мутаций (например, T315I, E255K) значения IC_{50} достоверно коррелируют с клиническим течением заболевания, то для других мутаций клиническое значение этого показателя лишь относительно. Именно поэтому роль ряда

мутаций в развитии резистентности к иматинибу остается совсем ясной.

Тем не менее существующие данные об ингибирующей активности иматиниба и других ингибиторов тирозинкиназ в пролиферативном и биохимическом тестах *in vitro* являются единственными позволяющими охарактеризовать чувствительность к иматинибу *BCR-ABL*-киназы с наиболее частыми мутациями и их реальную роль в развитии резистентности.

Влияние наиболее частых мутаций гена *BCR-ABL* на ингибирующую активность иматиниба в тестах *in vitro*

Мутации в Р-петле могут наблюдаться довольно часто при выявленной резистентности к гливеку и прогрессии ХМЛ.

Фосфорилирующая активность *ABL*-киназного домена с мутацией **M244V**, обуславливающей замену метионина в положении 244 на валин, незначительно отличается от активности *ABL*-киназы дикого типа.^{21,36} Однако анализ чувствительности в тесте на пролиферативную активность, выполненный А. Corbin и соавт.,⁴⁷ показал увеличение IC_{50} в 3,2 раза, а в работе Т. О'Наге и соавт.³² было выявлено увеличение IC_{50} в 8 раз, что свидетельствует о снижении чувствительности к иматинибу и о роли этой мутации в развитии резистентности к иматинибу. По мнению А. Corbin и соавт.,⁴⁷ клинический ответ может быть восстановлен у пациентов при рецидиве с мутацией M244V назначением более высоких доз иматиниба. Однако данные Т. О'Наге и соавт.³² четко указывают на необходимость использования новых ингибиторов тирозинкиназ при обнаружении данной мутации у резистентных пациентов.

Мутация **L248R** (замена лейцина на аргинин в положении 248) обуславливает развитие высокого уровня резистентности, о чем свидетельствует повышение IC_{50} в тесте на пролиферативную активность более чем в 30 раз.⁴⁸

Мутация **G250E** (замена глицина в положении 250 на глутаминовую кислоту) характеризуется высоким уровнем повышения IC_{50} — в 25 раз в тесте определения чувствительности к иматинибу пролиферативной активности *BCR-ABL*-экспрессирующих клеточных линий и более чем в 10 раз в биохимическом тесте.^{21,32,47} Полученные данные свидетельствуют о роли мутации G250E в развитии резистентности к иматинибу.

Мутация **Q252H**, по данным N. Shah и соавт.,²¹ приводит к умеренному снижению чувствительности в биохимическом тесте, в связи с чем повышение дозы иматиниба в клинической практике должно приводить к преодолению резистентности к нему. Так, в тестах *in vitro* биохимическая чувствительность к иматинибу восстанавливалась при концентрации препарата 1–4 мкмоль.

Мутация **Y253F/H**, приводящая к замене тирозина в положении 253 на фенилаланин или гистидин, по данным S. Roumiantsev и соавт.,⁴⁵ N. Shah и соавт.,²¹ ассоциирована с промежуточным уровнем резистентности к иматинибу. S. Roumiantsev и соавт.⁴⁵ утверждают, что повышение дозы иматиниба позволяет преодолеть резистентность к иматинибу, возникающую при мутации Y253F. По крайней мере, в экспериментах *in vitro* активность *ABL*-киназы с мутацией Y253F удавалось значительно снизить при концентрации иматиниба 5 мкмоль, т. е. при том уровне, который на основе фармакокинетических данных достигался у пациентов в I фазе клинических исследований иматиниба. Однако, по данным M. Burgess и соавт.,⁴⁸ Т. О'Наге и соавт.,³² мутация **Y253H** приводит к значительному увеличению IC_{50} в пролиферативном тесте (более чем в 30 раз) и в биохимическом тесте на фосфорилирующую активность (в 18 раз). При этих



показателях IC_{50} трудно ожидать эффекта от эскалации дозы иматиниба.

Замена глутаминовой кислоты в позиции 255 на лизин (мутация **E255K**) ассоциируется с высокой степенью резистентности к иматинибу. В тестах на биохимическую активность изолированной мутантной ABL-киназы и пролиферативную активность BCR-ABL-экспрессирующих клеточных линий наблюдается значительное увеличение IC_{50} соответственно в 200 и 15–33 раза по сравнению с диким типом ABL.^{21,32,48} В случае мутации E255K данные тестов *in vitro* достоверно коррелируют с клиническим значением этой мутации в развитии резистентности к иматинибу и отсутствием эффекта от повышения дозы иматиниба у пациентов с ХМЛ.⁴⁹

По мнению A. Corbin и соавт.,²¹ другие мутации в киназном домене гена BCR-ABL, приводящие к замене аминокислот в Р-петле, приводят к более чем умеренному снижению чувствительности к иматинибу. Однако по неясным причинам пациенты с мутациями в Р-петле имеют особенно плохой прогноз по сравнению с пациентами с другими типами мутаций.⁴⁹

Интересны мутации **V299L** (замена валина в положении 299 на лейцин) и **F311L** (замена фенилаланина в положении 311 на лейцин), поскольку их роль в развитии клинической резистентности к иматинибу установлена определенно, но в тестах *in vitro* показано увеличение IC_{50} всего лишь в 2–3 раза и клеточные линии сохраняют высокую чувствительность к иматинибу.^{21,32,48} Нет сомнений в том, что при обнаружении этих мутаций у пациентов с признаками резистентности показано повышение дозы иматиниба до 600–800 мг/сут. Пациенты с мутацией F311L достигали гематологической ремиссии даже при стандартной терапии иматинибом в дозе 400 мг/сут, несмотря на то что клон клеток с этой мутацией увеличивался в процессе лечения.³⁷

Водородные связи между иматинибом и BCR-ABL-киназой устанавливаются с 21 аминокислотой, включая треонин в положении 315 (T315), фенилаланин в положениях 317 (F317) и 359 (F359).⁵⁰ Поэтому значение мутаций, затрагивающих точки контакта иматиниба и BCR-ABL-киназы, особенно велико.

По современным данным, мутация **T315I**, приводящая к замене треонина в положении 315 на изолейцин, обуславливает практически полное отсутствие чувствительности к иматинибу и высочайшую степень резистентности у пациентов с ХМЛ.^{19,21,29,47–49,51,52} Чувствительность снижается более чем в 200 раз по данным биохимического теста фосфорилирующей активности изолированной ABL-киназы и более чем в 33 раза по данным теста на пролиферативную активность по сравнению с чувствительностью к иматинибу ABL-тирозинкиназы дикого типа.⁴⁷ Резистентность к иматинибу при этой мутации гена BCR-ABL невозможно преодолеть эскалацией дозы иматиниба, так же как и терапией ингибиторами тирозинкиназ II поколения. Поэтому при наличии совместимого донора пациентам с мутацией T315I показана аллогенная трансплантация костного мозга практически безальтернативно.

В случае другой мутации, затрагивающей треонин в положении 315 — **T315A** (замена треонина на аланин), наблюдается лишь незначительное (в 2–4 раза) повышение IC_{50} в тестах *in vitro*, сохранение высокой чувствительности к иматинибу и преодоление резистентности повышением дозы иматиниба.⁴⁸

Мутация **F317L/V**, приводящая к замене фенилаланина в положении 317 на лейцин или валин, идентифицирована у небольшого числа пациентов с резистентностью к иматинибу, и ее появление обычно коррелирует не с первичной

резистентностью, а с утратой цитогенетического ответа на фоне изначально успешной терапии иматинибом.^{20,21} По современным данным, мутация F317L/V приводит к умеренному снижению чувствительности к иматинибу. Чувствительность мутантной ABL-киназы примерно в 8,3 раза меньше чувствительности ABL-киназы дикого типа по фосфорилирующей активности и в 2,6–13 раз — по пролиферативной активности.⁴⁷ По некоторым данным, пациенты с мутацией F317L/V характеризуются умеренной резистентностью к иматинибу, в связи с чем повышение дозы препарата должно приводить к преодолению резистентности.²¹ По другим данным, преодоление резистентности путем увеличения дозы иматиниба в случае мутации F317L невозможно.

Мутация **M351T**, по данным N. Shah и соавт.,²¹ T. O'Hare и соавт.,⁵² приводит к умеренному снижению чувствительности к иматинибу в тестах *in vitro*, которая восстанавливается при концентрации препарата *in vitro* 1–4 мкмоль (концентрация 4 мкмоль соответствует суточной дозе иматиниба 800 мг/сут). N. Shah и соавт.,²¹ S. Soverini и соавт.,⁴⁹ T. Ernst и соавт.⁵³ считают, что терапия высокими дозами иматиниба приведет к преодолению резистентности. Однако более эффективно результат достигается при применении ингибиторов тирозинкиназ II поколения.

Мутация **E355G** (замена глутаминовой кислоты в положении 355 на глицин) не изменяет чувствительности к иматинибу киназного домена ABL в биохимическом и пролиферативном тестах, по данным A. Corbin и соавт.,⁴⁷ что, по мнению авторов, не предполагает участия этой мутации в развитии рецидивов. Однако N. Shah и соавт.²¹ выявили умеренное, 4–8-кратное увеличение IC_{50} в тесте пролиферативной активности, что свидетельствует о роли этой мутации в развитии резистентности к иматинибу, которую, скорее всего, можно преодолеть назначением высоких доз препарата.

Мутация **F359V** (замена фенилаланина в положении 359 на валин) нарушает водородные связи между липеразиновым кольцом иматиниба и ABL-киназой и наблюдается изредка у пациентов с ХМЛ в рецидиве.²¹ Мутация F359V вызывает слабое снижение чувствительности к иматинибу — в 1,8 и 2,8 раза в биохимическом и пролиферативном тестах соответственно. Действительно ли такого рода мутации, обуславливающие легкую степень снижения чувствительности к иматинибу, могут вызывать рецидив у пациентов в цитогенетической ремиссии ХМЛ, неизвестно. Однако наиболее вероятно, что увеличение дозы иматиниба при мутации F359V и при других аналогичных по своему биологическому эффекту мутациях должно преодолевать резистентность.⁴⁷

Чувствительность к иматинибу ABL-киназы при наличии мутации **V379I** (замена валина в положении 379 на изолейцин) в тестах *in vitro* приблизительно такая же, как и ABL-киназы дикого типа. Поэтому неудивительно, что, несмотря на потерю цитогенетического ответа, пациенты с этой мутацией в хронической фазе ХМЛ сохраняют гематологический ответ.^{21,47} При этом клон с мутацией V379I может быть преобладающим.

Мутации активационной петли (А-петли) в общем характеризуются средней степенью резистентности, по данным P. La Rosee.⁵⁴

Мутации **H396P** и **H396R** (замена гистидина в положении 396 на пролин или аргинин) приводят к снижению чувствительности к иматинибу соответственно в 11,3 и 7,3 раза в биохимическом тесте, 8,6 и 10,8 раза в клеточном тесте на пролиферацию по сравнению с диким типом BCR-ABL.⁴⁷ Аналогичные данные приводят T. O'Hare и соавт.⁵² Эти данные недвусмысленно указывают на роль мутаций H396P и H396R в развитии резистентности к иматинибу у пациентов с ХМЛ.

Роль мутации **L387M** (замена лейцина в положении 387 на метионин) среди причин резистентности не столь очевидна.²¹ Эта мутация демонстрирует снижение чувствительности к иматинибу в 2–4 раза как в биохимическом тесте на фосфорилирующую активность, так и в тесте на пролиферативную активность.^{47,52}

Таким образом, выявленные мутантные формы ABL-киназы характеризуются различным уровнем чувствительности к иматинибу. Тем не менее А. Corbin и соавт.⁴⁷ подразделяют все выявленные мутации на две четко различимые группы по уровню чувствительности к иматинибу и, как следствие, степени резистентности пациентов к терапии иматинибом.

Первая группа включает в себя мутации T315I, G250E, E255K, H396R, H396R, значительно или умеренно снижающие чувствительность к иматинибу в тестах *in vitro*. При наличии этих мутаций в ABL-киназе IC₅₀ иматиниба всегда выше 1,46 мкмоль. Величина 1,46 мкмоль используется авторами в качестве порогового значения, поскольку именно эта концентрация иматиниба достигается в плазме крови при стандартной терапии в дозе 400 мг/сут.

Вторую группу составляют мутации F311L, E355G, F359V, V379I, L387M, незначительно изменяющие чувствительность к иматинибу в тестах *in vitro* и характеризующиеся значением IC₅₀ на уровне концентрации иматиниба в плазме крови 1,46 мкмоль или незначительно выше этого показателя. Поэтому эти мутации сохраняют чувствительность ABL-киназы на уровне клинически достижимой концентрации иматиниба в плазме крови, а увеличение его дозы приводит к достижению ремиссии.

В случае отсутствия эффекта от эскалации дозы иматиниба при наличии одной из мутаций второй группы речь может идти о сочетании мутации с каким-либо другим механизмом резистентности: ABL-киназозависимым или даже BCR-ABL-независимым. Например, мутации киназного домена, не влияющие на связывание иматиниба, могут нарушать взаимодействие ABL-киназы с другими сигнальными белками.⁴⁷ А. Hochhaus и соавт.³⁶ обнаружили различные комбинации мутаций киназного домена, клональной эволюции и сверхэкспрессии гена *BCR-ABL* у 18 % пациентов, резистентных к иматинибу.

Мутации гена *BCR-ABL* и ингибиторы тирозинкиназ II поколения

Появление ингибиторов тирозинкиназ II поколения — нилотиниба (тосигна) и дазатиниба (спрайсел), превосходящих по своей эффективности иматиниб, поставило гематологов перед очередной трудной проблемой оптимизации таргетной (целенаправленной) терапии ХМЛ.⁵⁵ Так, если иматиниб в качестве препарата первой линии терапии для пациентов с впервые диагностированным ХМЛ не вызывает ни у кого сомнений, то в случае рефрактерности или утраты ответа на терапию иматинибом необходимо выбрать один из двух зарегистрированных препаратов второй линии (тосигна или спрайсел). Учитывая, что одной из основных причин первичной и приобретенной резистентности являются мутации гена *BCR-ABL*, особое значение приобрели работы, посвященные анализу чувствительности различных мутантных форм BCR-ABL-тирозинкиназы к различным ингибиторам.

Результаты I фазы клинических исследований нилотиниба и дазатиниба в лечении резистентных к иматинибу пациентов с Ph-позитивными лейкозами были опубликованы в середине 2006 г.^{12,56} У иматиниб-резистентных пациентов с ХМЛ в хронической фазе терапия нилотинибом и дазатинибом позволила достичь гематологического ответа в 90 % случаев. В фазах акселерации и бластного криза 20–40 % пациентов оказались рефрактерными к дазатинибу и 30–

60 % — к нилотинибу.^{12,56} На этом этапе исследований авторы не обнаружили корреляционной связи между наличием мутаций гена *BCR-ABL* и ответом на проводимую терапию. Только мутация T315I обуславливала полную резистентность к проводимой терапии.

В этом же году появились предварительные результаты II фазы клинических исследований нилотиниба, показавших его высокую эффективность у пациентов с такими мутациями киназного домена *BCR-ABL*, как M244V, M351T, H396R, D276G + M351T, E355G + L387F.⁵⁷ Высокая чувствительность к нилотинибу мутантных форм BCR-ABL-киназы именно для этих мутаций была доказана результатами исследований *in vitro*. В то же время для 4 пациентов с мутациями Y253F + E255K, L248V, Y253H и F359V терапия нилотинибом оказалась менее успешной. Пониженная чувствительность к нилотинибу этих мутантных форм BCR-ABL-киназы также была продемонстрирована в тестах биохимической и пролиферативной активности.

Результаты II фазы клинических исследований дазатиниба подтвердили обнаруженную закономерность. У пациентов с мутациями, характеризующимися высокой чувствительностью к дазатинибу *in vitro*, цитогенетический ответ достигался чаще, чем у пациентов с менее чувствительными мутациями.⁵⁸⁻⁶⁰ Так, терапия дазатинибом пациентов с мутациями киназного домена гена *BCR-ABL* M244V, G250E, Y253H, E255K/V, F359V, H396R оказалась эффективной, а результаты исследований *in vitro* подтвердили чувствительность этих мутантных форм BCR-ABL-тирозинкиназы к дазатинибу. Напротив, терапия дазатинибом пациентов с мутациями T315A неэффективна, а при мутациях V299L, F317L, F317V менее успешна.

Таким образом, характер клинического ответа на терапию различными ингибиторами тирозинкиназ может быть обусловлен разной чувствительностью мутантных форм BCR-ABL-тирозинкиназы к препаратам, определяемой *in vitro*.³²

Результаты довольно многочисленных исследований *in vitro* показали, что чувствительность мутантных форм BCR-ABL-тирозинкиназы к иматинибу, нилотинибу и дазатинибу значительно варьирует в зависимости от вида мутации (табл. 2). В целом ингибиторы тирозинкиназ II поколения обладают более выраженной активностью против мутантных форм BCR-ABL-киназы, чем иматиниб,^{32,35} что демонстрируется таблицей чувствительности мутантных форм BCR-ABL к различным ингибиторам тирозинкиназ (см. табл. 2).

Профиль мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*, обуславливающих резистентность к дазатинибу и нилотинибу, не совпадает с профилем мутаций, вызывающих резистентность к иматинибу, т. к. структура ингибиторов II поколения отличается от структуры иматиниба. Молекула нилотиниба способна более эффективно, чем иматиниб, встраиваться в киназный домен BCR-ABL-тирозинкиназы в ее неактивной конформации. Именно поэтому нилотиниб значительно эффективнее иматиниба, причем при большинстве известных мутаций гена *BCR-ABL*, вызывающих резистентность к иматинибу.^{61,62} Дазатиниб способен взаимодействовать с BCR-ABL-тирозинкиназой в ее активной конформации, ингибируя ее поэтому в 300 раз более активно по сравнению с иматинибом. Однако для дазатиниба легко можно предсказать мутации, которые вызовут резистентность, — это мутации, затрагивающие аминокислоты в области контакта молекулы дазатиниба и киназного домена.⁶³ В любом случае ингибиторы тирозинкиназ II поколения нуждаются в изучении специфичности к различным мутациям *BCR-ABL*, вызывающим резистентность.

Доказательства эффективности этих препаратов при тех или иных мутациях должны быть получены как *in vitro*

Таблица 2. Чувствительность BCR-ABL-киназного домена к ингибиторам тирозинкиназ при различных мутациях гена BCR-ABL *in vitro*^{32*}

	Иматиниб, нмоль	Нилотиниб, нмоль	Дазатиниб, нмоль
Нет мутаций	260	13	0,8
M244V	2000	38	1,3
G250E	1350	48	1,8
Q252H	1325	70	3,4
Y253F	3475	125	1,4
Y253H	> 6400	450	1,3
E255K	5200	200	5,6
E255V	> 6400	430	11
V299L	540	Нет данных	18
F311L	480	23	13
T315A	971	61	125
T315I	> 6400	> 2000	> 200
F317L	1050	50	7,4
F317V	350	Нет данных	53
M351T	880	15	1,1
E355G	2300	Нет данных	1,8
F359V	1825	175	2,2
V379I	1630	51	0,8
L387M	1000	49	2
H396P	850	41	0,6
H396R	1750	41	1,3

* Значения чувствительности приведены в единицах IC₅₀.

- высокая чувствительность;
- умеренная чувствительность;
- отсутствие чувствительности.

(с использованием пролиферативного и биохимического тестов), так и *in vivo*. Общепринятой мерой измерения чувствительности ингибиторов тирозинкиназ *in vitro* является IC₅₀, которая определена для иматиниба практически при всех видах обнаруженных мутаций BCR-ABL. В то же время наши знания о значениях IC₅₀ нилотиниба и дазатиниба (см. табл. 2) ограничены и касаются лишь немногих мутаций BCR-ABL.^{10,48}

Знание вида мутации гена BCR-ABL и характерного для нее значения IC₅₀ иматиниба, нилотиниба и дазатиниба необходимо в клинической практике по нескольким причинам. Во-первых, возможна модификация терапии, проводимой резистентным пациентам с мутациями киназного домена BCR-ABL: повышение дозы иматиниба, или переход на терапию ингибиторами II поколения, или (в случае панрезистентной мутации T315I) перевод с консервативной терапии на программу трансплантации стволовых кроветворных клеток.¹¹ Во-вторых, в случае выявления новой мутации BCR-ABL обязательным является выяснение характерного для нее IC₅₀ и связи с клинической резистентностью в соответствующих базах данных,^{10,47,48,52,64} поскольку существуют мутации, вызывающие резистентность только в сочетании с другими механизмами ее развития. В последнем случае нет необходимости менять тактику терапии.

В настоящее время определено можно сказать, что мутации Q252H, T315A, F317L, F317V и V299L киназного домена гена BCR-ABL обуславливают пониженную чувствительность к дазатинибу. Мутации Y253F, Y253H, F359V, V379I характеризуются пониженной чувствительностью к нилотинибу. Таким образом, рациональный выбор препарата и его дозы для пациентов с иматиниб-резистентными формами ХМЛ во многом зависит от мутационного статуса гена BCR-ABL.

Обобщая данные литературы и учитывая свой собственный небольшой опыт мутационного анализа, можно предложить следующие ориентиры для использования результатов мутационного анализа в оптимизации терапии ХМЛ.

- Обнаружение мутаций M244V, G250E, Q252H, V299L, F311L, F317V, M351T, L387M, H396P, H396R является основанием для повышения дозы иматиниба до 600–800 мг/сут минимум на 3 мес. В случае отсутствия положительного результата возможен переход на терапию как нилотинибом, так и дазатинибом с предположительно одинаковой эффективностью.
- Обнаружение мутаций T315A и F317L также обуславливает необходимость повышения суточной дозы иматиниба до 600–800 мг/сут минимум на 3 мес. В случае отсутствия положительного результата необходим переход на терапию нилотинибом. Терапия дазатинибом не показана.
- Обнаружение мутаций E355G, F359V, V379I предполагает повышение суточной дозы иматиниба до 600–800 мг/сут минимум на 3 мес. В случае отсутствия результата наиболее вероятно эффективность дазатиниба. Терапия нилотинибом также возможна, но с меньшей вероятностью положительного эффекта.
- При мутациях E255K, E255V повышение дозы иматиниба неэффективно, поэтому необходимо сразу перейти на терапию ингибиторами тирозинкиназ II поколения. Возможен переход как на нилотиниб, так и на дазатиниб с предположительно одинаковой эффективностью.
- При мутациях Y253F, Y253H повышение дозы иматиниба также не имеет смысла, поэтому необходимо сразу перейти на терапию ингибиторами тирозинкиназ II поколения. Однако при этих мутациях вероятным преимуществом обладает дазатиниб. Терапия нилотинибом также возможна, но с меньшей вероятностью положительного эффекта.
- Детекция мутации T315I является однозначным показанием к трансплантации костного мозга или экспериментальной терапии.

Естественно, что при выборе тактики терапии резистентных к иматинибу пациентов врач учитывает не только результаты мутационного анализа и чувствительность выявленных мутаций к различным ингибиторам тирозинкиназ. При определении терапии имеют значение гематологическая и негематологическая токсичность препаратов, сопутствующие заболевания пациента, комплаентность пациента (приверженность больного к лечению и принимаемому препарату), другие клинические и социальные факторы. Однако при прочих равных условиях результаты мутационного анализа в большой степени объективируют выбор лечения.

К сожалению, в настоящий момент данные о чувствительности различных мутантных форм BCR-ABL к ингибиторам тирозинкиназ *in vitro* и в клинической практике немногочисленны и неполны. Выше мы рассмотрели значение для выбора терапии только наиболее частых мутаций. Однако нет сомнения, что клинические и лабораторные исследования ближайших лет восполнят этот пробел.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, мутации киназного домена гена BCR-ABL являются одной из основных причин резистентности к терапии иматинибом у некоторых пациентов с ХМЛ, что доказывается как данными, полученными *in vitro*, так и клиническими наблюдениями. Наиболее вероятно, что появление мутаций является результатом повышенной тирозинкиназной активности самого мутантного белка BCR-ABL и вероятность появления мутаций, а следовательно, и ухудшение прогноза заболевания увеличиваются по мере его прогрессирования. Так, частота обнаружения мутантных клонов в



фазе бластного криза в несколько раз выше таковой в хронической фазе. Об этом же свидетельствует снижение риска появления мутаций на фоне терапии иматинибом, поскольку редуцируется клон клеток, содержащих гиперактивную форму тирозинкиназы — BCR-ABL. В этой связи уже с молекулярно-биологических позиций становится очевидной клиническая значимость ранней диагностики и раннего начала терапии ХМЛ иматинибом.

Поиск мутаций гена *BCR-ABL* на момент постановки диагноза ХМЛ представляется нецелесообразным, т. к. в начале заболевания мутации редки. Даже если перед началом лечения будет выявлен клон клеток, имеющих мутацию гена *BCR-ABL*, этот клон не обязательно будет прогрессировать на фоне терапии иматинибом. Следовательно, мутационный анализ на данной стадии заболевания не имеет клинического значения.

Напротив, если в процессе лечения обнаружена гематологическая или цитогенетическая рефрактерность к иматинибу (первичная резистентность) либо потеря уже достигнутого гематологического, цитогенетического или молекулярного ответа (вторичная, т. е. приобретенная, резистентность), то любое из этих состояний пациента является показанием для анализа мутаций киназного домена гена *BCR-ABL*.

Мутационный анализ необходим для выяснения причин резистентности к иматинибу и поиска путей ее преодоления, определения прогноза течения заболевания (особенно в случае продолжения терапии иматинибом). Необходимо отметить, что клиническое значение будет иметь выявление только тех мутаций, связь которых с резистентностью к иматинибу уже доказана в тестах *in vitro* и характеризующихся повышенными значениями IC₅₀.

В мутационном анализе необходимо использовать методические подходы, позволяющие выявлять доминирующие мутантные клоны. Высокочувствительные методы детекции мутаций (АС-ПЦР) могут выявлять низкопроцентные мутантные клеточные клоны, не влияющие на течение заболевания. Наиболее приемлемым, на наш взгляд, является метод прямого ДНК-секвенирования с чувствительностью 10–20 %.

Обнаружение различных мутаций киназного домена гена *BCR-ABL* позволяет рационализировать тактику тера-

пии ХМЛ: повысить дозу иматиниба, или перейти на терапию ингибиторами тирозинкиназ II поколения, или рекомендовать экспериментальную терапию либо трансплантацию костного мозга.

Показания для определения мутационного статуса гена *BCR-ABL* можно детализировать следующим образом.

- Отсутствие полного гематологического ответа после 3 мес. терапии иматинибом (первичная гематологическая резистентность).
- Отсутствие частичного цитогенетического ответа после 6 мес. терапии иматинибом (первичная цитогенетическая резистентность).
- Отсутствие большого цитогенетического ответа после 12 мес. терапии иматинибом (первичная цитогенетическая резистентность).
- Отсутствие полного цитогенетического ответа после 18 мес. терапии иматинибом (первичная цитогенетическая резистентность).
- Потеря гематологического ответа (вторичная гематологическая резистентность).
- Потеря цитогенетического ответа (вторичная цитогенетическая резистентность).
- Потеря молекулярного ответа (повышение уровня экспрессии *BCR-ABL* на 0,5 log и более).
- До начала терапии ингибиторами тирозинкиназ II поколения (нилотиниб, дазатиниб).

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что при всей очевидной значимости мутационного анализа выбор тактики терапии ХМЛ на данный момент в первую очередь должен основываться на клинических данных (наличие у пациента сопутствующих заболеваний, гематологическая и негематологическая токсичность препаратов, комплаентность и т. д.) и только затем учитывать данные мутационного анализа. Исследования клинического значения, влияния тех или иных мутаций на эффективность терапии ХМЛ различными ингибиторами тирозинкиназ активно развиваются в последние годы. Но уже сейчас несомненно, что внедрение в практику не только цитогенетического и молекулярного мониторинга, но и анализа мутаций киназного домена гена *BCR-ABL* позволяет рационализировать таргетную терапию ХМЛ.⁶⁵

ЛИТЕРАТУРА

1. Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A. et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 645–52.
2. Kantarjian H., Cortes J., O'Brien S. et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. *Blood* 2003; 101: 97–100.
3. O'Brien S., Guilhot F., Larson R. et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 994–1004.
4. Goldman J., Melo J. Chronic myeloid leukemia: advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349: 1451–64.
5. Peggs K., Mackinnon S. Imatinib mesylate — the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 1048–50.
6. Туркина А. Г., Хорошко Н. Д., Дружкова Г. А. и др. Эффективность терапии иматиниба мезилатом (гливеком) в хронической фазе миелоплейоза. *Тер. арх.* 2003; 75(8): 62–7.
7. Kantarjian H., Cortes J., O'Brien S. et al. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with ima-

- tinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha. *Blood* 2004; 104: 1979–88.
8. 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.
9. Muller M., Gattermann N., Lahaye T. et al. Dynamics of BCR-ABL mRNA expression in first-line therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon alpha/ara-C. *Leukemia* 2003; 17: 2392–400.
10. Shah N., Tran C., Lee F. et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 2004; 305: 399–401.
11. Baccarani M., Saglio G., Goldman J. et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006; 108: 1809–20.
12. Kantarjian H., Giles F., Wunderte L. et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354(24): 2542–51.
13. Le Coutre P., Tassi E., Varella-Garcia M. et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 2000; 95: 1758–66.

14. Mahon F.-X., Deininger M., Schultheis B. et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000; 96: 1070–9.
15. Weisberg E., Griffin J. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 2000; 95: 3498–505.
16. Collins S. Breakpoints on chromosomes 9 and 22 in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia (CML): amplification of rearranged c-Abl oncogenes in CML blast crisis. *J. Clin. Invest.* 1986; 78: 1392.
17. Collins S., Groudmann M. Chronic myelogenous leukemia: amplification of a rearranged c-Abl oncogene in both chronic phase and blast crisis. *Blood* 1987; 69: 893.
18. Hochhaus A. Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. *Semin. Hematol.* 2003 Apr; 40(2 Suppl 2): 69–79.
19. Gorre M., Mohammed M., Ellwood K. et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293: 876–80.
20. Branford S., Rudzki Z., Walsh S. et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Philadelphia acute lymphoblastic leukemia who devel-



op imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002; 99(9): 3472–5.

21. *Shah N., Nicoll J., 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.
22. *Gambacorti-Passerini C., Gunby R., Piazza R.* et al. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Lancet Oncol.* 2003; 4: 75–85.
23. *Kreil S., Mueller M., Hanfstein B.* et al. Management and clinical outcome of CML patients after imatinib resistance associated with ABL kinase domain mutations. *Blood* 2003; 102: 71a.
24. *Shah N., Sawyers C.* Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 2003; 22: 7389–95.
25. *Al-Ali H., Heinrich M., Lange T.* et al. High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol. J.* 2004; 5: 55–60.
26. *Hochhaus A., La Rosee P.* Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* 2004; 18: 1321–31.
27. *Barthe C., Cony-Makhoul P., Melo J. V.* et al. Roots of Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy. *Science* 2001; 293: 2163a.
28. *Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.* et al. Roots of Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy. *Science* 2001; 293: 2163a.
29. *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.
30. *Branford S.* Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2007: 376–83.
31. *Hughes T., Deininger M., Hochhaus A.* et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 2006; 108(1): 28–37.
32. *O'Hare T., Eide C. A., Deininger M.* Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110(7): 2242–9.
33. *Sattler M., Verma S., Shrikhande G.* et al. The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(32): 24273–8.
34. *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.
35. *Baccarani M., Pane F., Saglio G.* Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2008; 93(2): 161–7.
36. *Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.* et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190–6.
37. *Roche-Lestienne C., Soenen-Cornu V., Gradel-Dujflos N.* et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002; 100: 1014–8.
38. *Khorashad J., Anand M., Marin D.* et al. The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia* 2006; 20: 658–63.
39. *Deininger M., McGreevey L., Willis S.* et al. Detection of ABL kinase domain mutations with denaturing high-performance liquid chromatography. *Leukemia* 2004; 18: 864–71.
40. *Soverini S., Martinelli G., Amabile M.* et al. Denaturing-HPLC-based assay for detection of ABL mutations in chronic myeloid leukemia patients resistant to Imatinib. *Clin. Chem.* 2004; 50: 1205–13.
41. *Kantarjian H., Talpaz M., Giles F.* et al. New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance. *Ann. Intern. Med.* 2006; 14: 913–23.
42. *Azam M., Latek R., Daley G. Q.* Mechanisms of autoinhibition and STI-571 imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 2003; 112: 831–43.
43. *Deininger M., Buchdunger E., Druker B.* The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105(7): 2640–53.
44. *Cowan-Jacob S., Guez V., Fendrich G.* et al. Imatinib (STI571) resistance in chronic myelogenous leukemia: molecular basis of the underlying mechanisms and potential strategies for treatment. *Mini Rev. Med. Chem.* 2004; 4: 285–99.
45. *Roumiantsev S., Shah N., Gorre M.* et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 10700–5.
46. *Hantschel O., Nagar B., Guettler S.* et al. A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* 2003; 112: 845–57.
47. *Corbin A., La Rose P., Stoffregen E.* et al. Several BCR-ABL kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003; 101(11): 4611–4.
48. *Burgess M., Skaggs B., Shah N.* et al. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 3395–400.
49. *Soverini S., Martinelli G., Rosti G.* et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 4100–9.
50. *Nagar B., Bornmann W., Pellicena P.* et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res.* 2002; 62: 4236–43.
51. *Corbin A., Buchdunger E., Pascal F.* et al. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 32214–9.
52. *O'Hare T., Walters D., Stoffregen E.* et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005; 65: 4500–5.
53. *Ernst T., Erben P., Miller M.* et al. Dynamics of BCR-ABL mutated clones prior to hematologic or cytogenetic resistance to imatinib. *Haematologica* 2008; 93(2): 186–92.
54. *La Rosee P., Corbin A., Stoffregen E.* et al. Activity of the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (Gleevec, STI571). *Cancer Res.* 2002; 62: 7149–53.
55. *Ломана Э. Г., Заруцкий А. Ю.* Нилотиниб — новый этап успеха в терапии хронического миелолейкоза. *Онкогематология* 2007; 4: 67–72.
56. *Talpaz M., Shah N., Kantarjian H.* et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354(24): 2531–41.
57. *Hochhaus A., Erben P., Branford S.* et al. Hematologic and Cytogenetic Response Dynamics to Nilotinib (AMN107) Depend on the Type of BCR-ABL Mutations in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia (CML) after Imatinib Failure. *Blood* 2006; 108: 225a, abstr. 749.
58. *Cortes J., Rousselot P., Kim D.* et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood* 2007; 109(8): 3207–13.
59. *Guilhot F., Apperley J., Kim D.* et al. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood* 2007; 109(10): 4143–50.
60. *Hochhaus A., Kantarjian H., Baccarani M.* et al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood* 2007; 109(6): 2303–9.
61. *Von Bubnoff N., Manley P., Mestan J.* et al. Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood* 2006; 108: 1328–33.
62. *Ray A., Cowan-Jacob S., Manley P.* et al. Identification of BCR-ABL point mutations conferring resistance to the Abl kinase inhibitor AMN107 (nilotinib) by a random mutagenesis study. *Blood* 2007; 109: 5011–5.
63. *Tokarski J., Newitt J., Chang C.* et al. The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* 2006; 66: 5790–7.
64. *Melo J., Chuah C.* Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett.* 2007; 249: 121–32.
65. *Sherbenou D., Druker B.* Applying the discovery of the Philadelphia chromosome. *J. Clin. Invest.* 2007; 117(8): 2067–74.