

Эволюция методов  
молекулярной диагностики  
хронического миелолейкоза

А.В. Мисюрин



1960 год: Ph-хромосома

## A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia

P.C. Nowell, D.A. Hungerford

University of Pennsylvania,  
Philadelphia

### A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia

In seven cases thus far investigated (five males, two females), a minute chromosome has been observed replacing one of the four smallest autosomes in the chromosome complement of cells of chronic granulocytic leukemia cultured from peripheral blood. No abnormality was observed in the cells of four cases of acute granulocytic leukemia in adults or of six cases of acute leukemia in children. There have been several recent reports of chromosome abnormalities in a number of cases of human leukemia [including two of the seven cases reported here: Nowell and Hungerford, *J. Natl. Cancer Inst.*, **25**, 85 (1960)], but no series has appeared in which there was a consistent change typical of a particular type of leukemia.

Cells of the five new cases were obtained from peripheral blood (and bone marrow in one instance), grown in culture for 24–72 hours, and processed for cytological examination by a recently developed air-drying technique (Moorhead, et al., *Exptl. Cell Research*, in press). The patients varied from asymptomatic untreated cases to extensively treated

cases of several years duration in terminal myeloblastic crisis. All seven individuals showed a similar minute chromosome, and none showed any other frequent or regular chromosome change. In most of the cases, cells with normal chromosomes were also observed. Thus, the minute is not a part of the normal chromosome constitution of such individuals.

The findings suggest a causal relationship between the chromosome abnormality observed and chronic granulocytic leukemia.

PETER C. NOWELL

*School of Medicine,  
University of Pennsylvania*

DAVID A. HUNGERFORD

*Institute for Cancer Research*

Nowell & Hungerford, 1960 Science 132.1497

# 1973: translocation of chromosomal material



National Medal of Science

Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243, 290-293, 1973

...suggesting that there may be a hitherto undetected translocation between the long arm of **22** and the long arm of **9**, producing the 9q+ chromosome...

# (Качество диагностики) И (Эффективность терапии)

1960 - открыли Филадельфийскую хромосому

(Nowell P., Hungerford D.)

1973 - Ph-хромосома - результат транслокации t(9;22)

(Rowley JD)

1983 - ген *abl* вовлечен в транслокацию t(9;22)

(Bartram CR, de Klein A)

1984 - изучена область BCR 22 хромосомы

(Groffen J, Stephenson J, Heisterkamp N)

1990 - *bcr-abl* - онкогенная тирозинкиназа

(Lugo TG, Pendergast AM)

1990 - индукция ХМЛ у мышей геном p210 *bcr-abl* из Ph

(Daley G, Van Etten R)

1995/7 - STI571 (иматиниб) ингибитор тирозинкиназы *bcr-abl*

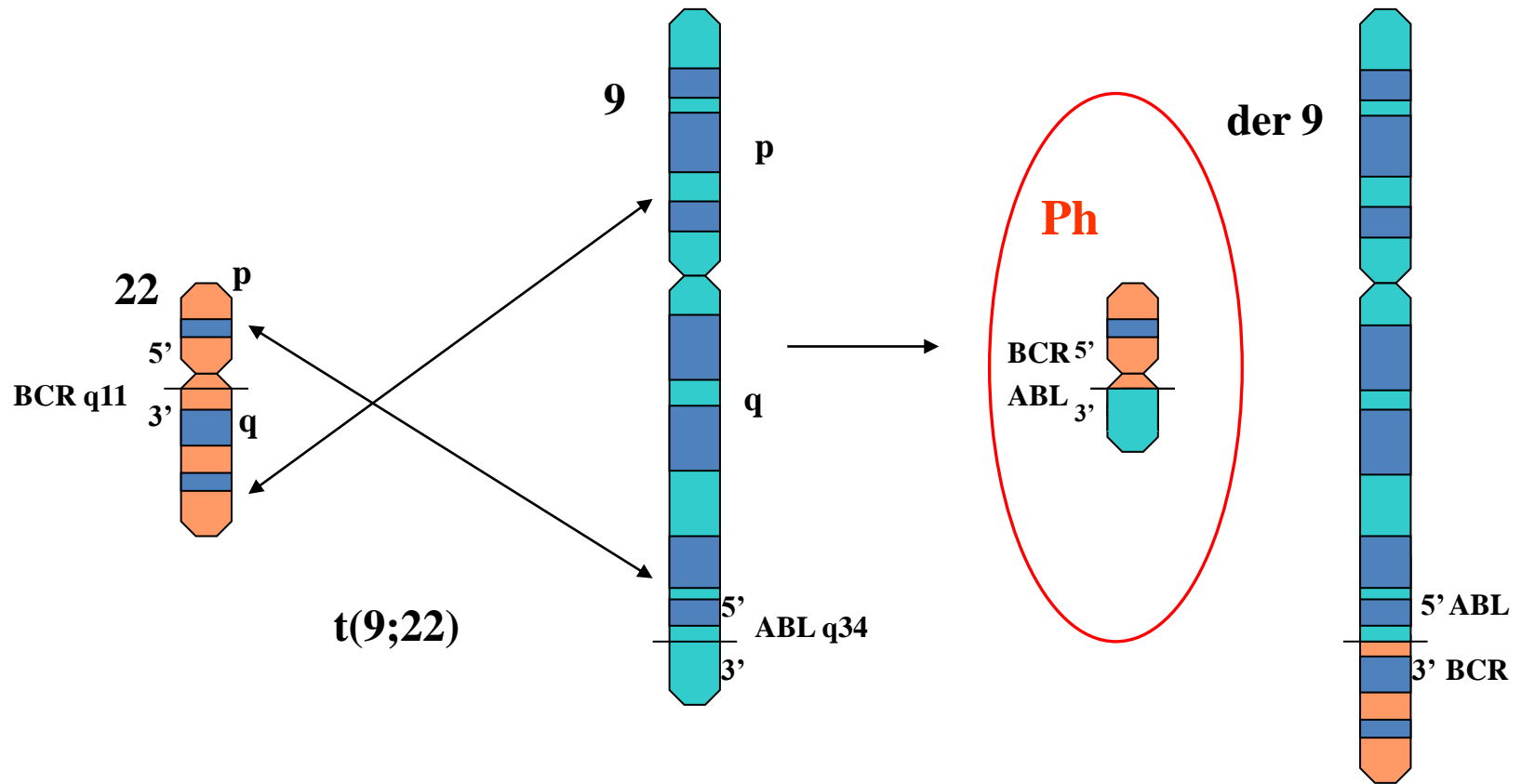
(David Baltimore, Owen N. Witte, Alex Matter, Nicholas B. Lydon, Brian J. Druker)

2004 – резистенность к иматинибу преодолена при помощи дазатиниба

(Shah NP, Tran C, Lee FY, Chen P, Norris D, Sawyers CL.)



# Транслокация t(9;22)

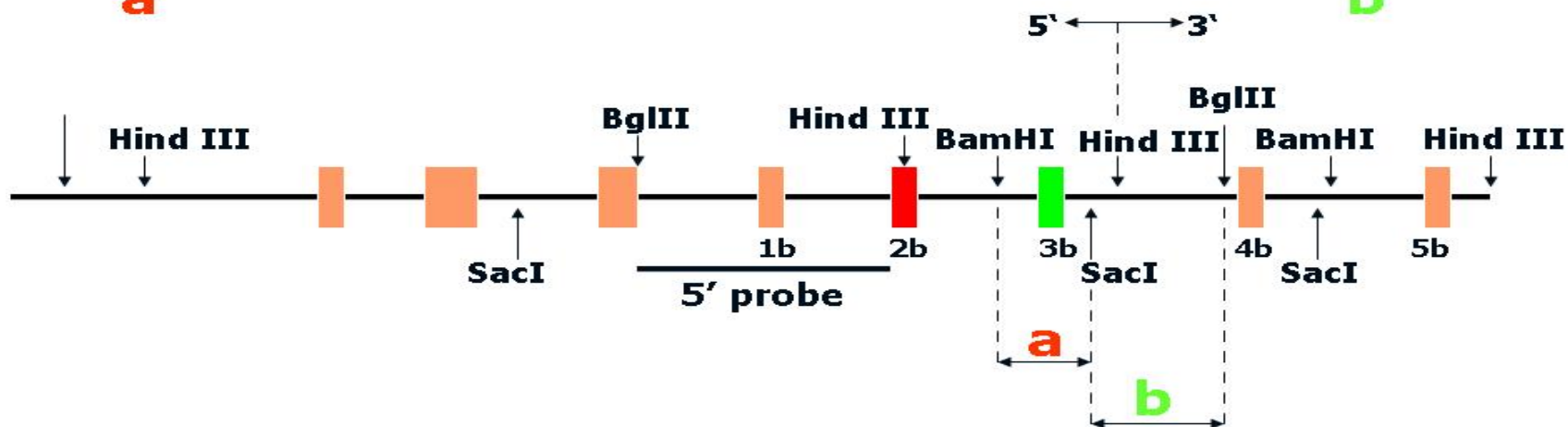


# Анализ перестроек гена BCR/ABL методом гибридизации по Саузерну



**a**

**b**





УДК 577.215.037

## НОВЫЕ ТОЧКИ РАЗРЫВА ТРАНСЛОКАЦИИ t(9;22) ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ

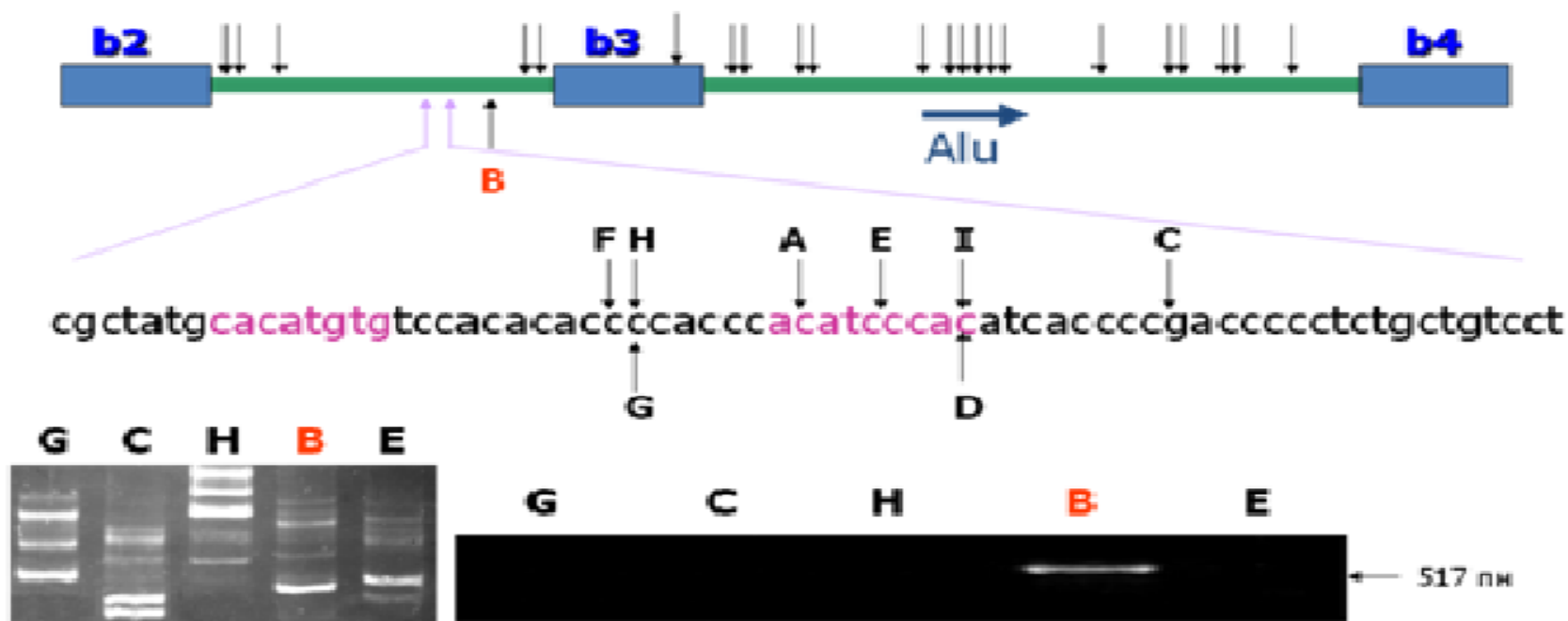
© 1999 г. А. В. Мисюрин<sup>#</sup>, В. Л. Сурин, А. Ф. Тагиев

Гематологический научный центр РАМН,  
125167, Москва, Новозыковский пр., 4а

Поступило в редакцию 18.03.98 г. Принято к печати 05.10.98 г.

Изучено 9 новых точек разрыва (участков слияния) генов *BCR* и *ABL* в составе химерного онкогена *BCR/ABL* при транслокации t(9;22) у больных хроническим миелолейкозом. Впервые обнаружены совпадающие точки разрыва у разных больных в генах *BCR* и *ABL*. Фрагменты ДНК, содержавшие точки разрыва *BCR/ABL*, были амплифицированы при помощи ПЦР-прогулки на основе модификации метода ПЦР со случайным отжигом праймеров, названной обратной праймерной прогулкой.

Ключевые слова: t(9;22); точки разрыва; хронический миелолейкоз; ПЦР-прогулка.



ORIGINAL ARTICLE

Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR–ABL indicate distinct mechanisms of formation

J Score<sup>1</sup>, MJ Calasanz<sup>2</sup>, O Ottman<sup>3</sup>, F Pane<sup>4,5</sup>, RF Yeh<sup>6</sup>, MA Sobrinho-Simões<sup>7</sup>, S Kreil<sup>1</sup>, D Ward<sup>1</sup>, C Hidalgo-Curtis<sup>1</sup>, JV Melo<sup>7</sup>, J Wiemels<sup>6</sup>, B Nadel<sup>8</sup>, NCP Cross<sup>1,9</sup> and FH Grand<sup>1,9</sup>

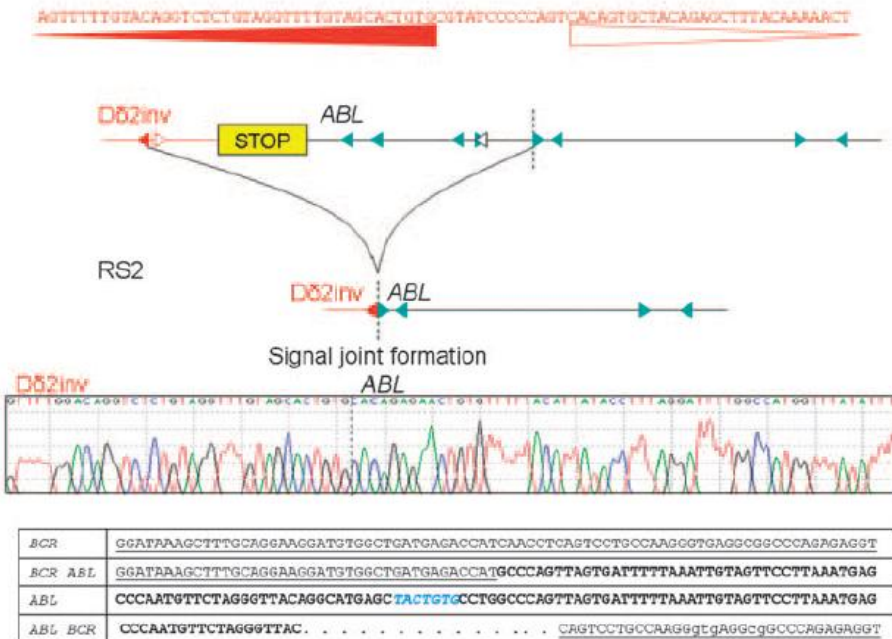
<sup>1</sup>Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury and Human Genetics Division, University of Southampton School of Medicine, Southampton, UK; <sup>2</sup>Department of Genetics, School of Science, University of Navarra, Pamplona, Spain; <sup>3</sup>Department of Hematology and Oncology, Goethe University, Frankfurt, Germany; <sup>4</sup>Division of Hematology, University of Naples Federico II, Naples, Italy; <sup>5</sup>CEINGE—Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy; <sup>6</sup>Department of Epidemiology and Biostatistics, University of California-San Francisco, San Francisco, CA, USA; <sup>7</sup>Department of Haematology, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, Imperial College, London, UK and <sup>8</sup>Centre d’Immunologie de Marseilles, France

We sought to understand the genesis of the t(9;22) by characterizing genomic breakpoints in chronic myeloid leukemia (CML) and BCR–ABL-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). BCR–ABL breakpoints were identified in p190 ALL (n=25), p210 ALL (n=25) and p210 CML (n=32); reciprocal breakpoints were identified in 54 cases. No evidence for significant clustering and no association with sequence motifs was found except for a breakpoint deficit in repeat regions within BCR for p210 cases. Comparison of reciprocal breakpoints, however, showed differences in the patterns of deletion/insertions between p190 and p210. To explore the possibility that recombinase-activating gene (RAG) activity might be involved in ALL, we performed extra-chromosomal recombination assays for cases with breakpoints close to potential cryptic recombination signal sequence (cRSS) sites. Of 13 ALL cases tested, 1/10 with p190 and 1/3 with p210 precisely recapitulated the forward BCR–ABL breakpoint and 1/10 with p190 precisely recapitulated the reciprocal breakpoint. In contrast, neither of the p210 CMLs tested showed functional cRSSs. Thus, although the t(9;22) does not arise from aberrant variable (V), joining (J) and diversity (D) (V(D)J) recombination, our data suggest that in a subset of ALL cases RAG might create one of the initiating double-strand breaks.

Leukemia (2010) 24, 1742–1750; doi:10.1038/leu.2010.174; published online 12 August 2010

Keywords: BCR–ABL; breakpoints; RAG

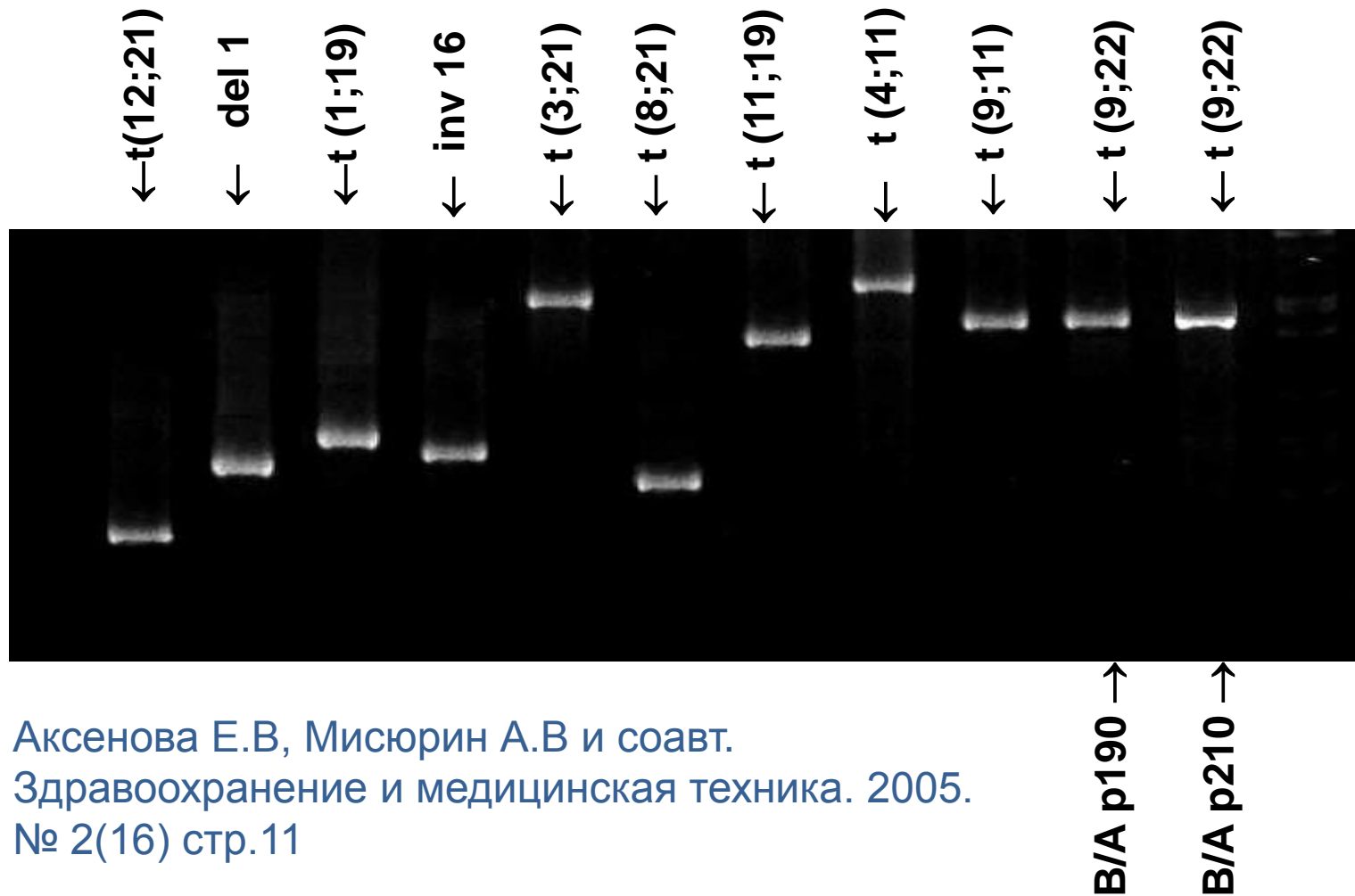
BCR	TTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGGATCGCTTGAGCTCAGGAGTTGGAGACCAGCCGACCAACATGGTGA AACCCCTGTGTCT
BCR ABL	TTTGGGAGGCTGAGGCAGGTGGATCGCTCGAGCTCAGGAG CACAGAGAACTGTGTTTTTACATCATACCTTTAGGATTT
ABL	TCTGTTAGGAATCTGGAGCAAATCCTATTCTTTTGAAG CACAGAGAACTGTGTTTTTACATTATACCTTTAGGATTT
ABL BCR	MLPA failed





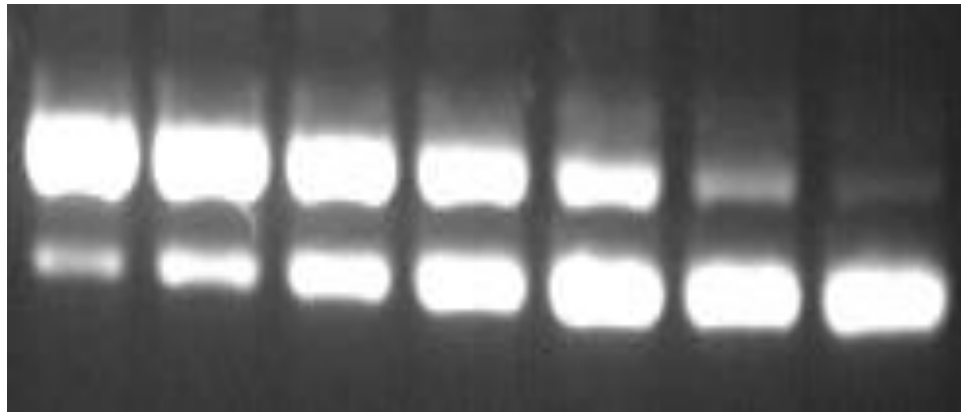
# Качественный анализ:

## ОТ ПЦР-диагностика химерных онкогенов



Аксенова Е.В, Мисюрин А.В и соавт.  
Здравоохранение и медицинская техника. 2005.  
№ 2(16) стр.11

# Количественное определение экспрессии BCR/ABL методом конкурентной ПЦР



**Внутренний**  
← **стандарт**

← **Bcr/Abl**

←  $5 \times 10^5$

←  $1 \times 10^5$

←  $5 \times 10^4$

←  $1 \times 10^4$

←  $5 \times 10^3$

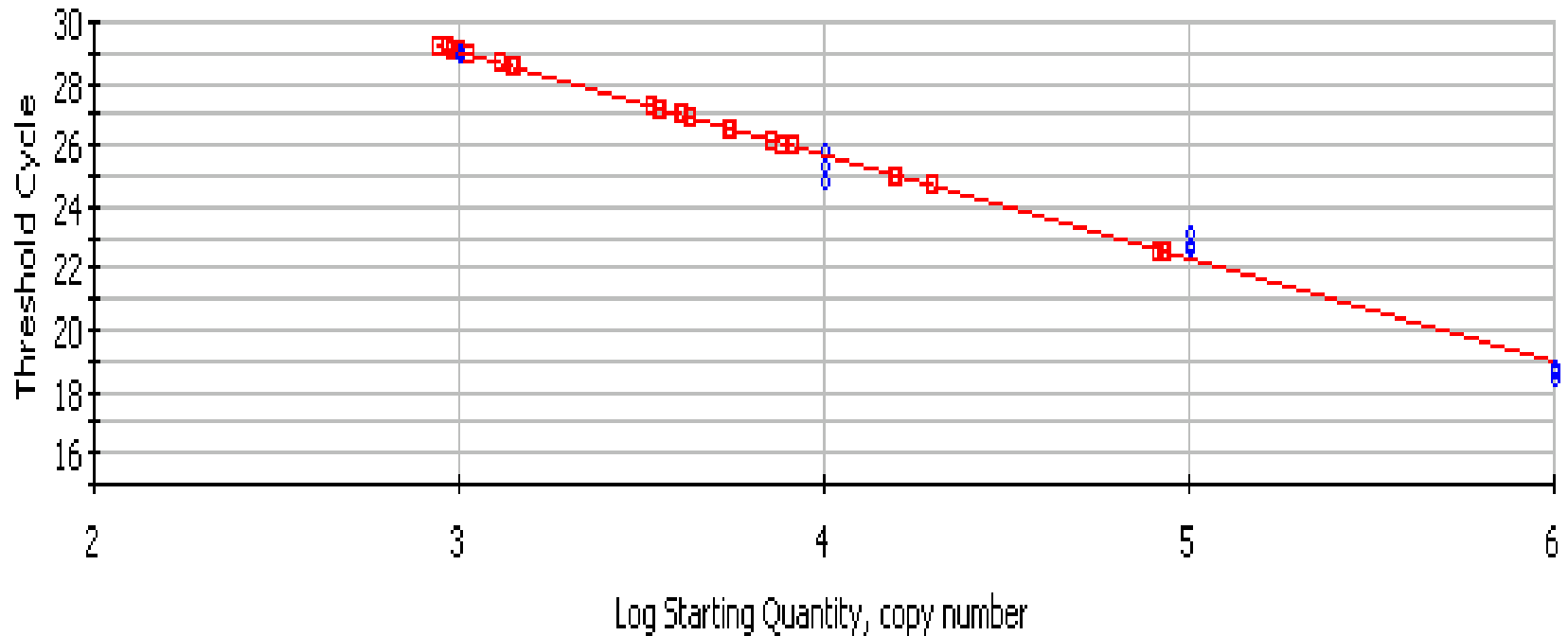
←  $1 \times 10^3$

←  $5 \times 10^2$

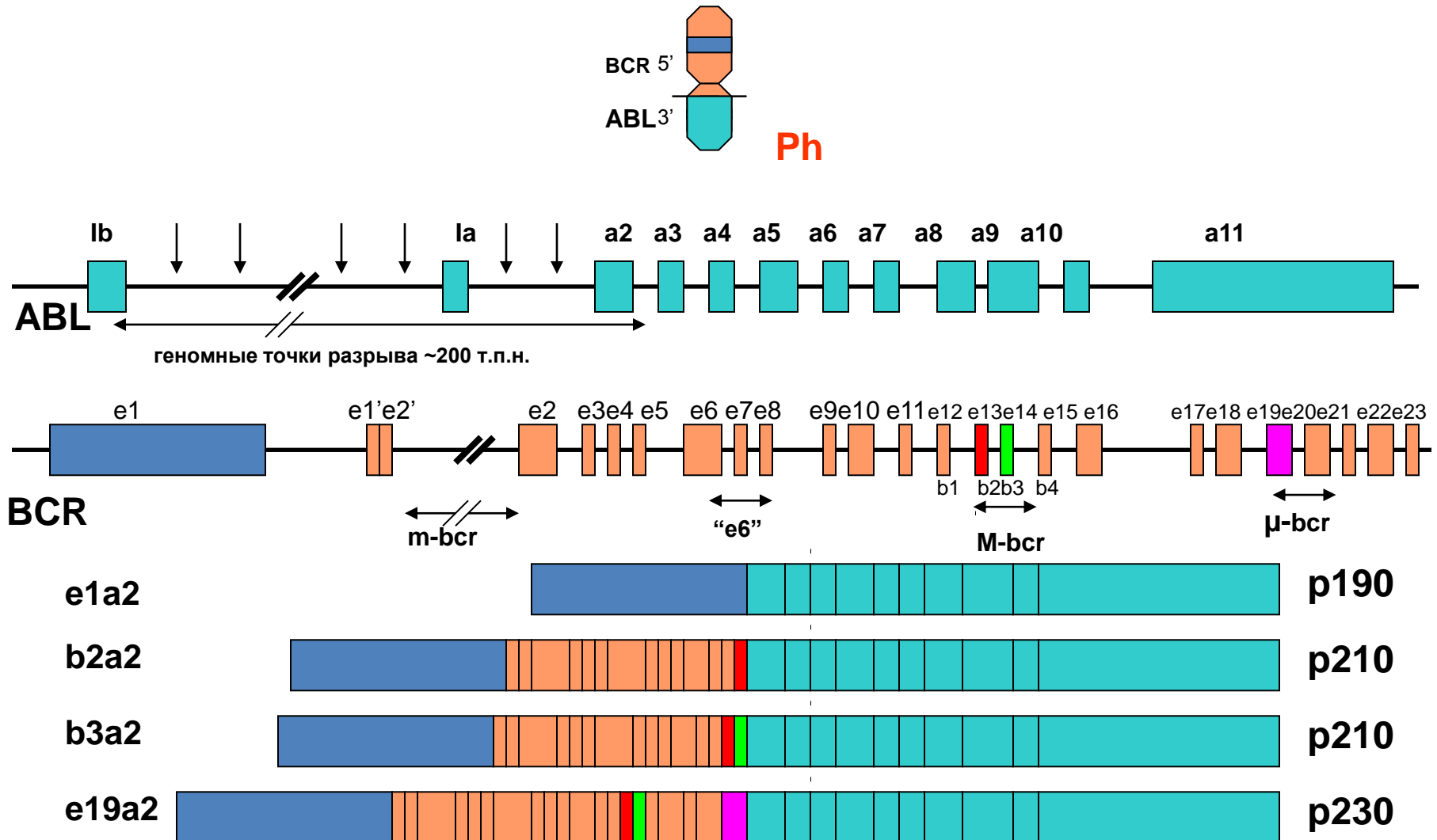
# Количественный анализ: ПЦР в реальном времени

Correlation Coefficient: 0.994 Slope: -3.360 Intercept: 39.132  $Y = -3.360 X + 39.132$   
PCR Efficiency: 98.4 %

□ Unknowns  
○ Standards



# Варианты химерного онкогена BCR/ABL



# Возможные варианты транскрипции химерного онкогена BCR/ABL

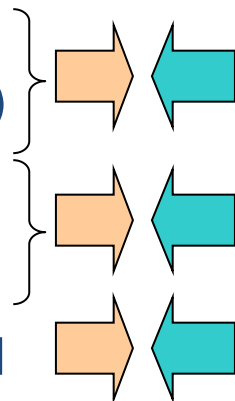
**Могут слиться без нарушения рамки считывания**

## Экзоны BCR

e1, e6, e12(b1), e13(b2),  
e14(b3), e19(c3), e20(c4)

e2, e3, e5, e7, e8, e10, e11,  
e15, e16, e17, e22

e9, e21



## Экзоны ABL

a2, a3, a7

a4, a8, a9, a10, a11

a5, a6

**Встречаются в эксперименте**

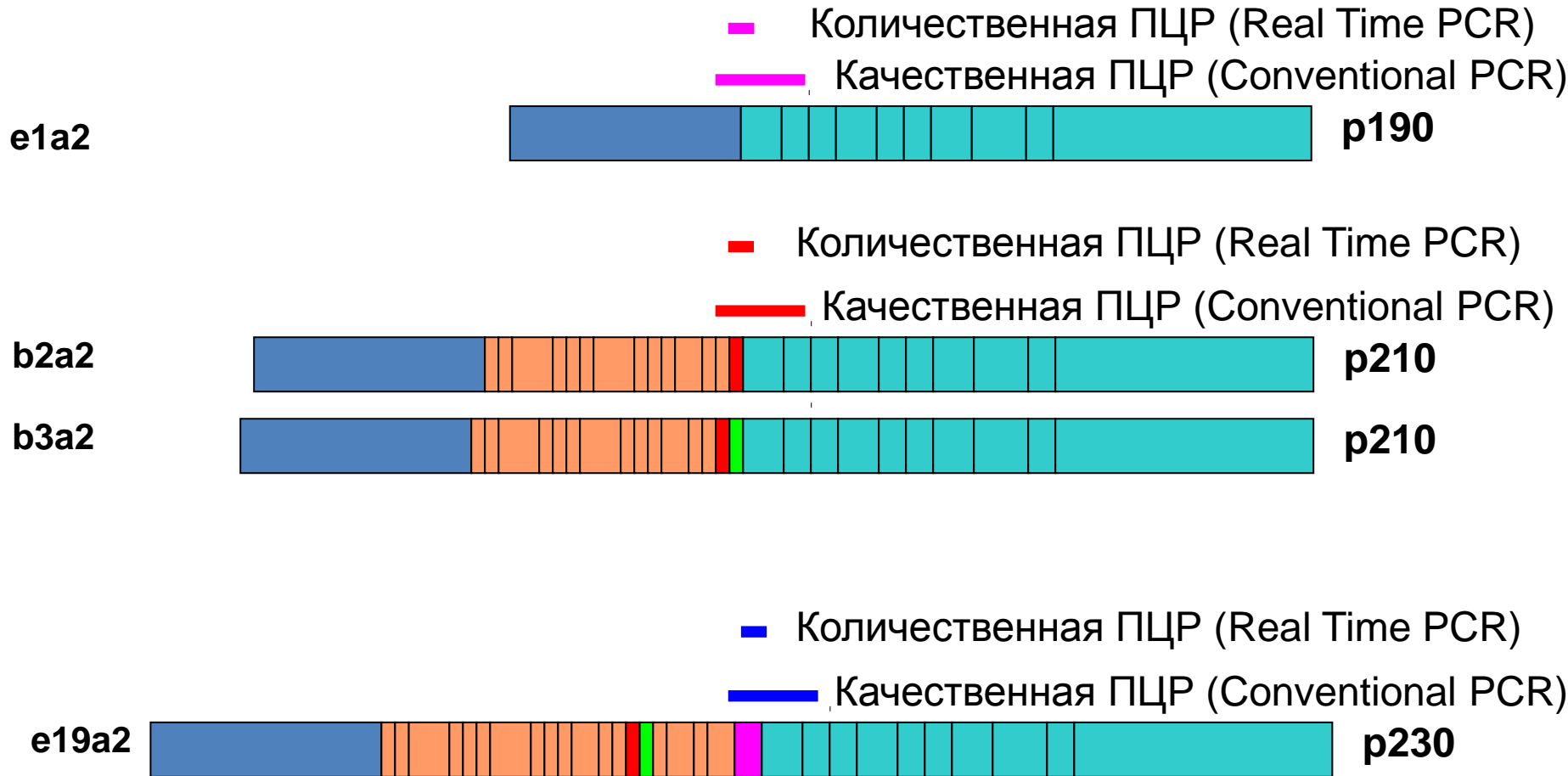
b2a2, b3a2 }  
b2a3, b3a3 } M-bcr

e1a2 }  
e1a3 } m-bcr

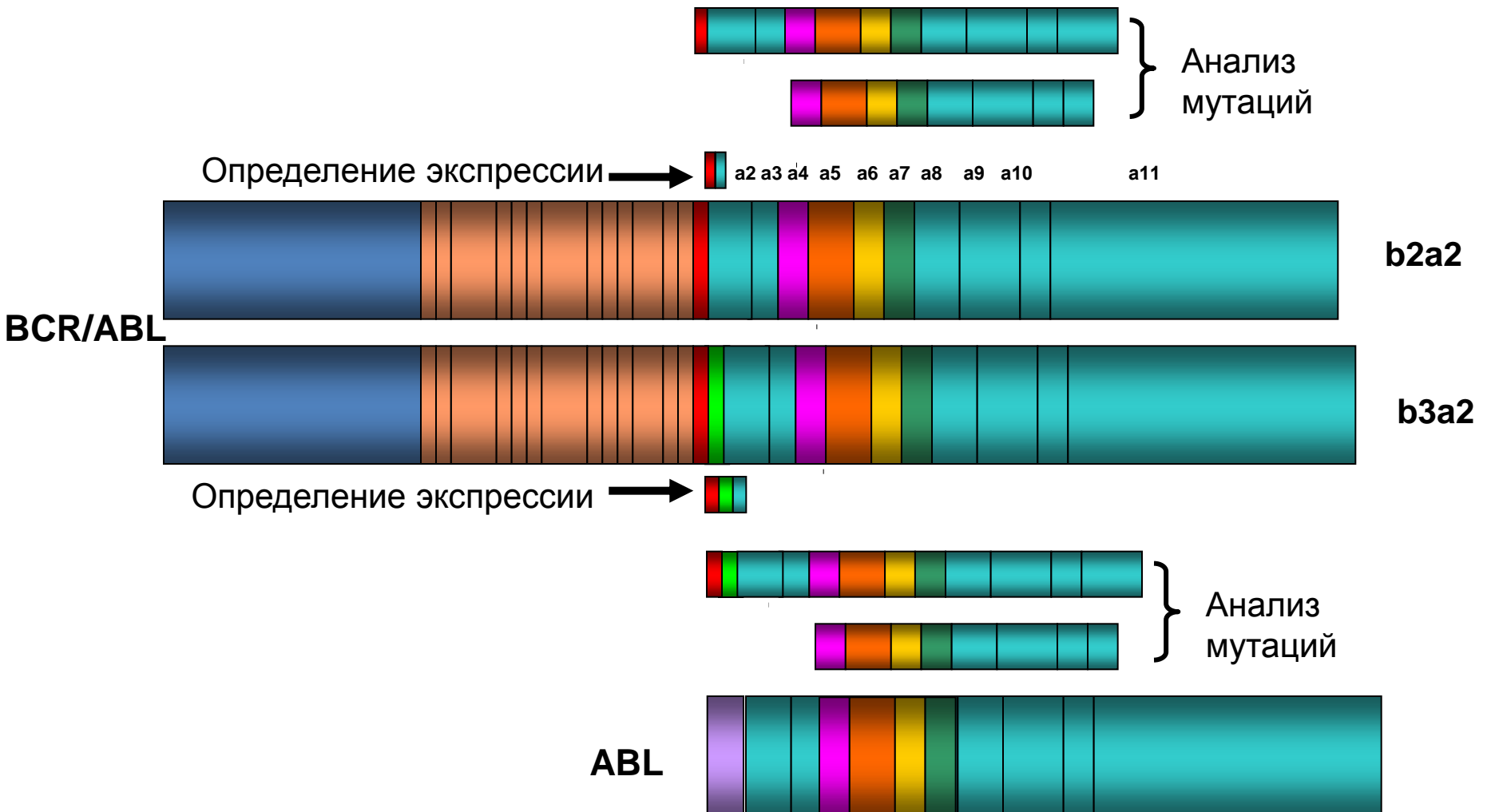
e19a2 } μ-bcr

e6a2

# Качественная и количественная ПЦР при анализе экспрессии гена BCR/ABL: разница в длине фрагментов и охвате экзонов



# Анализ мутаций гена BCR/ABL

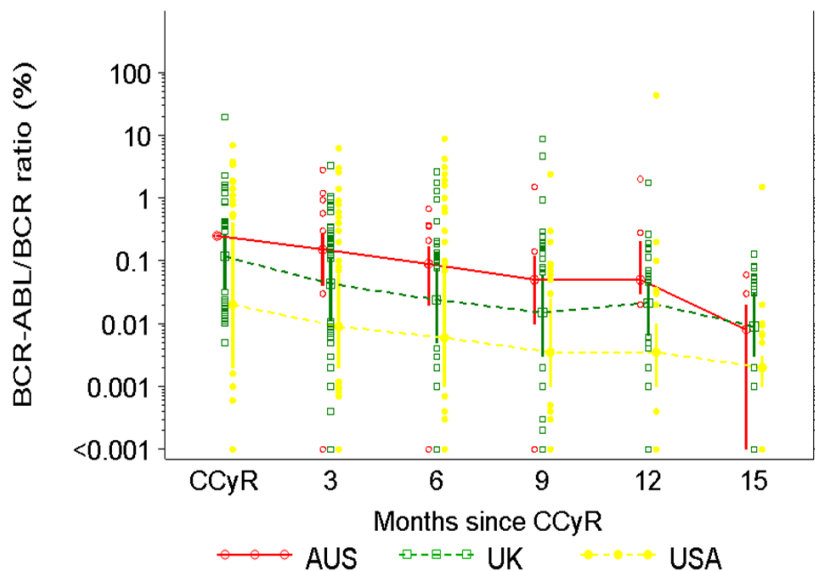


# Исследование IRIS: нормализация результатов на основе 30 общих образцов крови больных ХМЛ

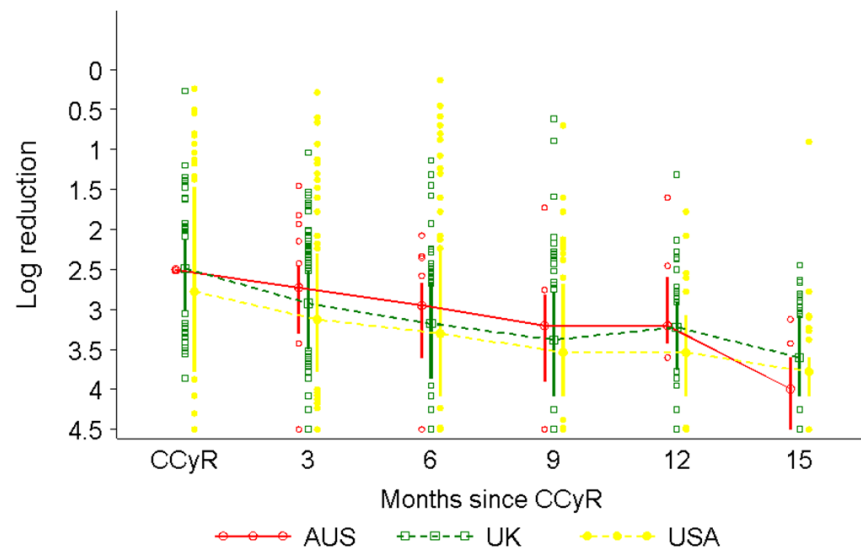
ORIGINAL ARTICLE

## Frequency of Major Molecular Responses to Imatinib or Interferon Alfa plus Cytarabine in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia

Tim P. Hughes, M.D., Jaspal Kaeda, Ph.D., Susan Branford, Zbigniew Rudzki, Ph.D., Andreas Hochhaus, M.D., Martee L. Hensley, M.D., Insa Gathmann, M.Sc., Ann E. Bolton, B.Sc.N., Iris C. van Hooissen, B.Sc.N., John M. Goldman, D.M., and Jerald P. Radich, M.D. for the International Randomised Study of Interferon versus STI571 (IRIS) Study Group  
N Engl J Med 2003; 349:1423-1432 | [October 9, 2003](#)



До нормализации



После нормализации



Международная шкала (International Scale)  
(Bethesda 2005, Blood 2006)

BCR-ABL/контрольный ген x100 %

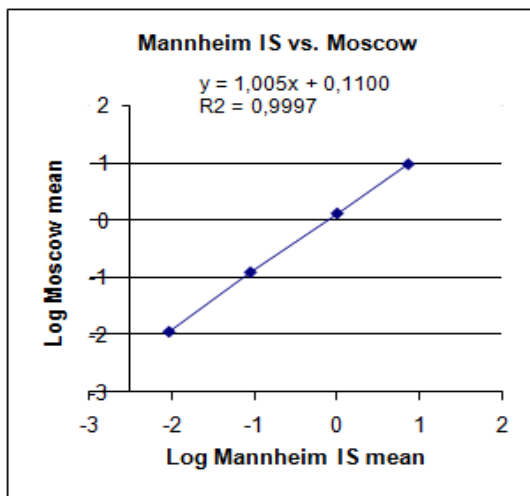
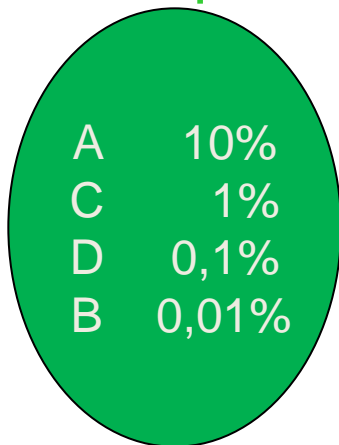
Базальный уровень= 100%, MMR = 0,1%

Фактор конверсии (conversion factor, CF) = 0,1%/MMR%

Необходимость обмена образцами

## Расчет фактора конверсии Москва относительно Mannheim

1step

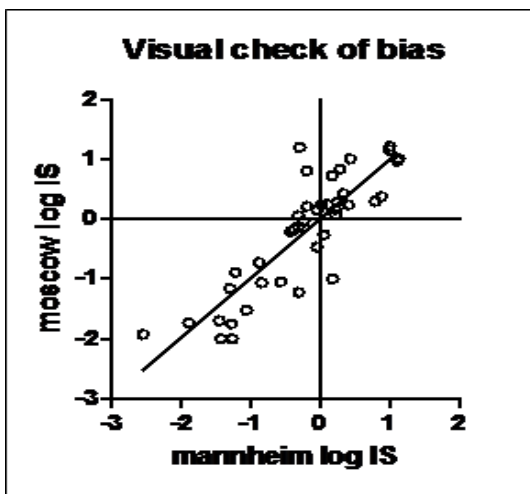


R2= 0,9997  
R2>0,98

Предварительный  
CF= 0,7852

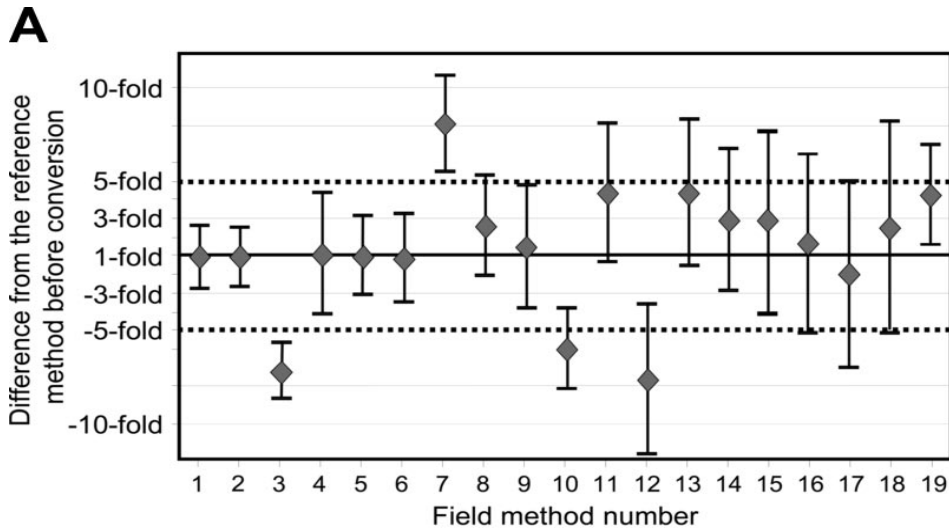
2 step

40 образцов  
клеток б-ных ХМЛ  
в Тризоле

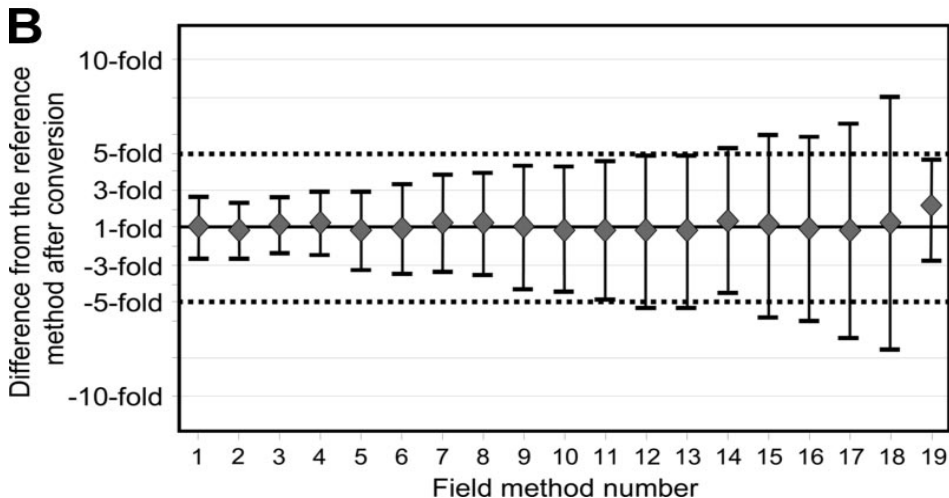


CF= 0,9631

# Различия между результатами разных лабораторий до и после конверсии



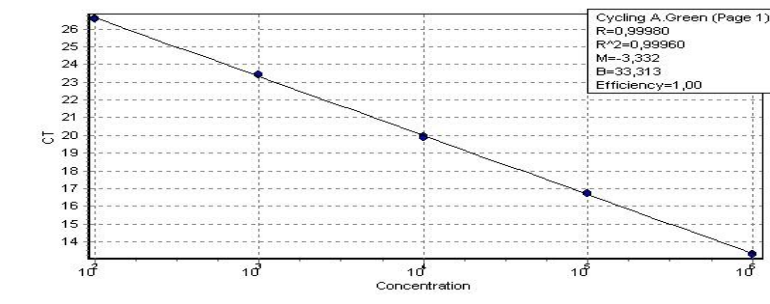
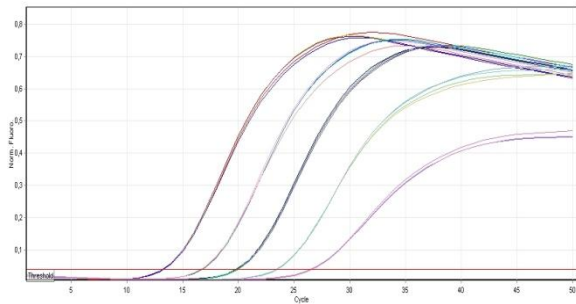
До конверсии –  
различия в средних от -7,7 раз до +8,1 раз



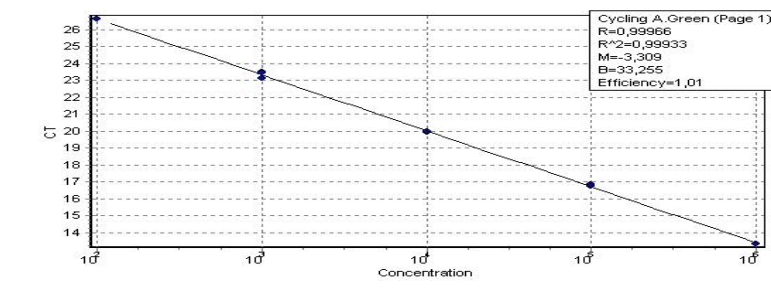
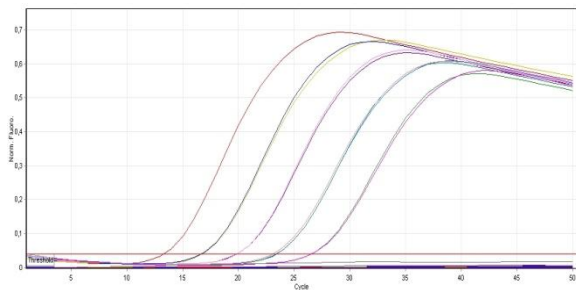
После конверсии –  
различия в средних  $\pm 1,2$  раза  
(17 из 19)  
Разброс варьирует

# Стабильность контрольных плазмид VCR/ABL+ABL (Онкоскрин™, ООО «ГеноТехнология» (Москва, Россия)

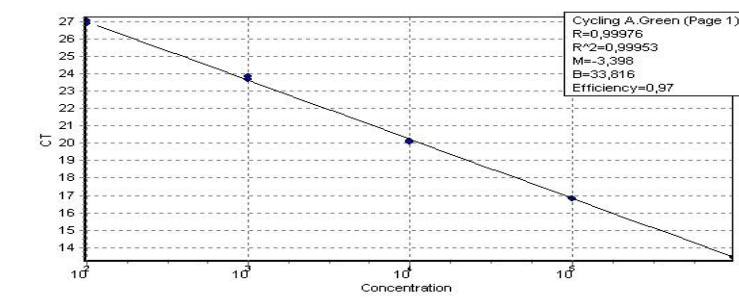
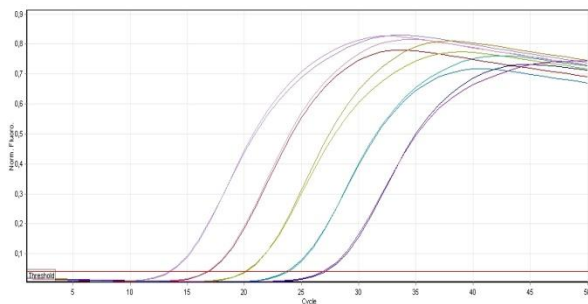
27.03.2008



18.09.2008



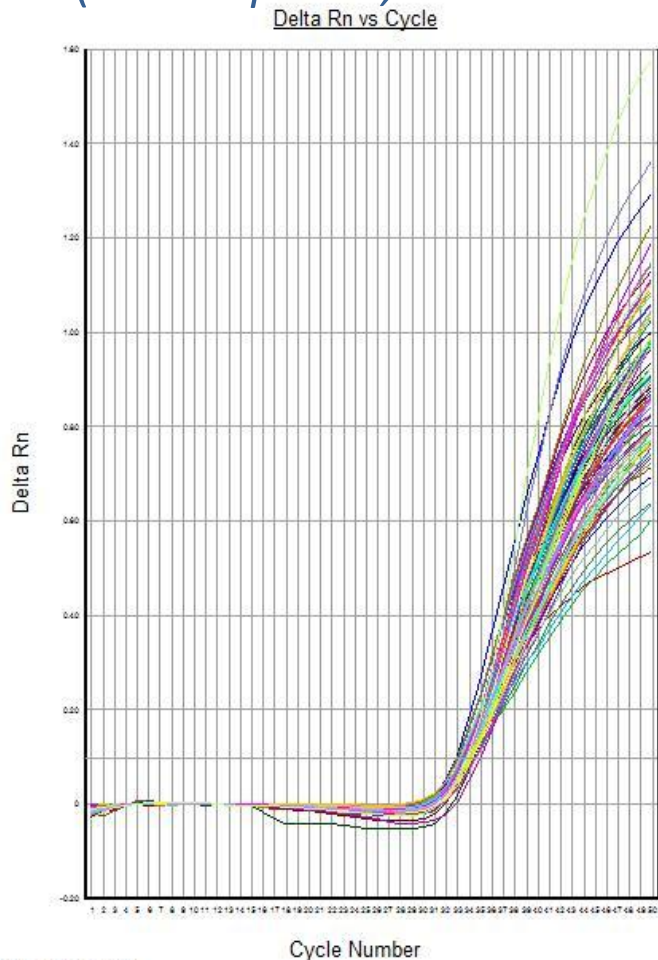
23.03.2009



Аксенова Е.В., Мисюрин А.В. и соавт. Клиническая онкогематология, 2010, №2, стр.160-165

# Воспроизводимая чувствительность тест-системы для количественного анализа экспрессии BCR/ABL

(Онкоскрин™, ООО «ГеноТехнология» (Москва, Россия)



Selected Detector: All  
Well(s): A1-H12  
Document: 30.03.10\_ba\_10\_cop\_mkl (Absolute Quantification)

Плазмида BCR/ABL+ABL  
10 копий/1  $\mu$ l

96 повторов

(прибор AB 7500)

Ст Mean = 33,95

Ст SD = 0,63

CV % = 1,86

(Рекомендации EAC:

CV % < 5%)

**1,86 % < 5 %**

# Молекулярный ответ

Полный (ПМО)

мРНК BCR-ABL не определяется методом количественной ПЦР в реальном времени и/или методом ПЦР с вложенными праймерами в двух последовательно взятых образцах крови адекватного качества (чувствительность более  $10^4$ )

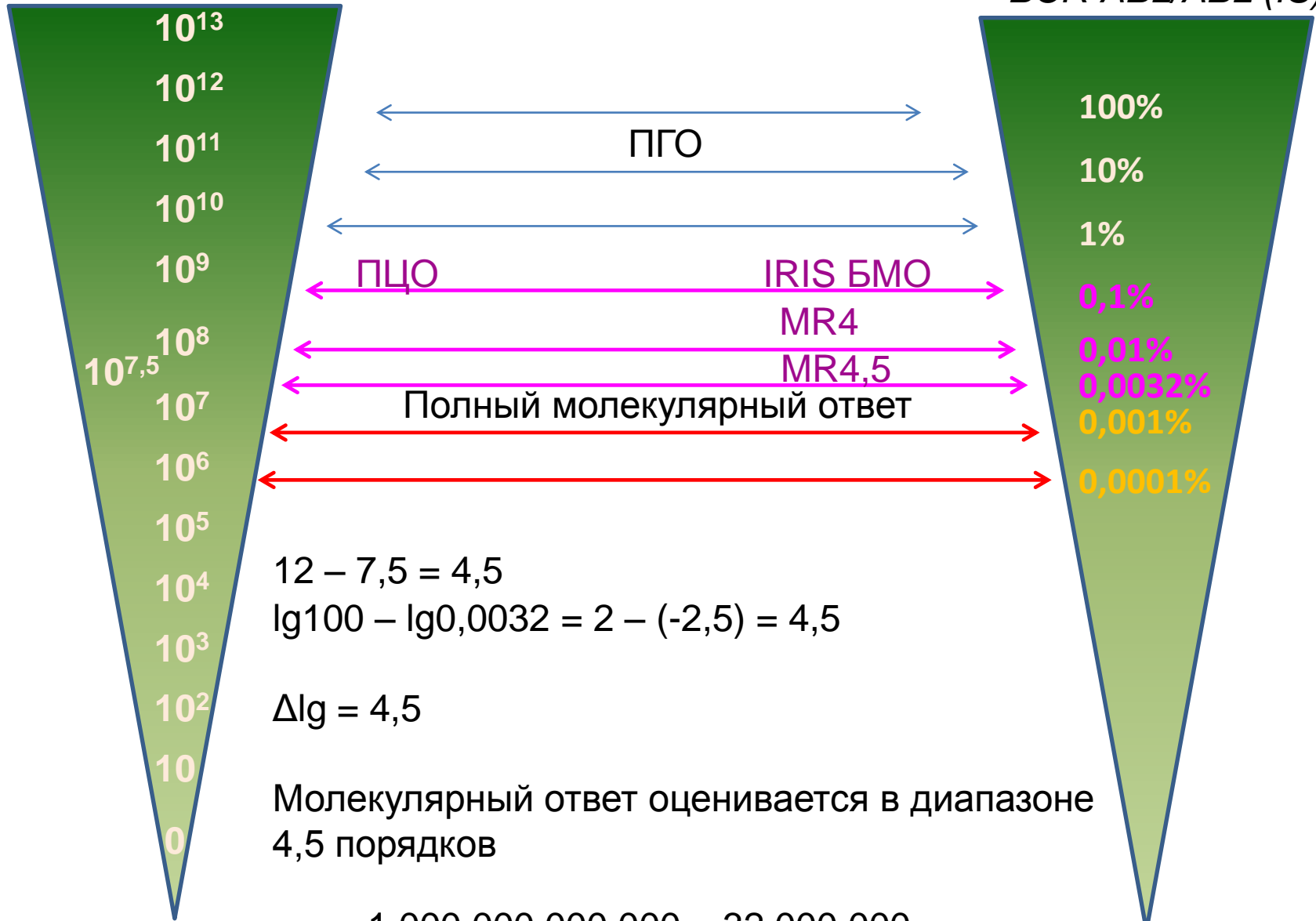
Большой (БМО)

Отношение BCR-ABL к ABL (или другим конститутивным генам) 0,1 % и менее по международной шкале

# Международная шкала (IS) оценки молекулярного ответа

Лейкозные клетки

*BCR-ABL/ABL (IS)*

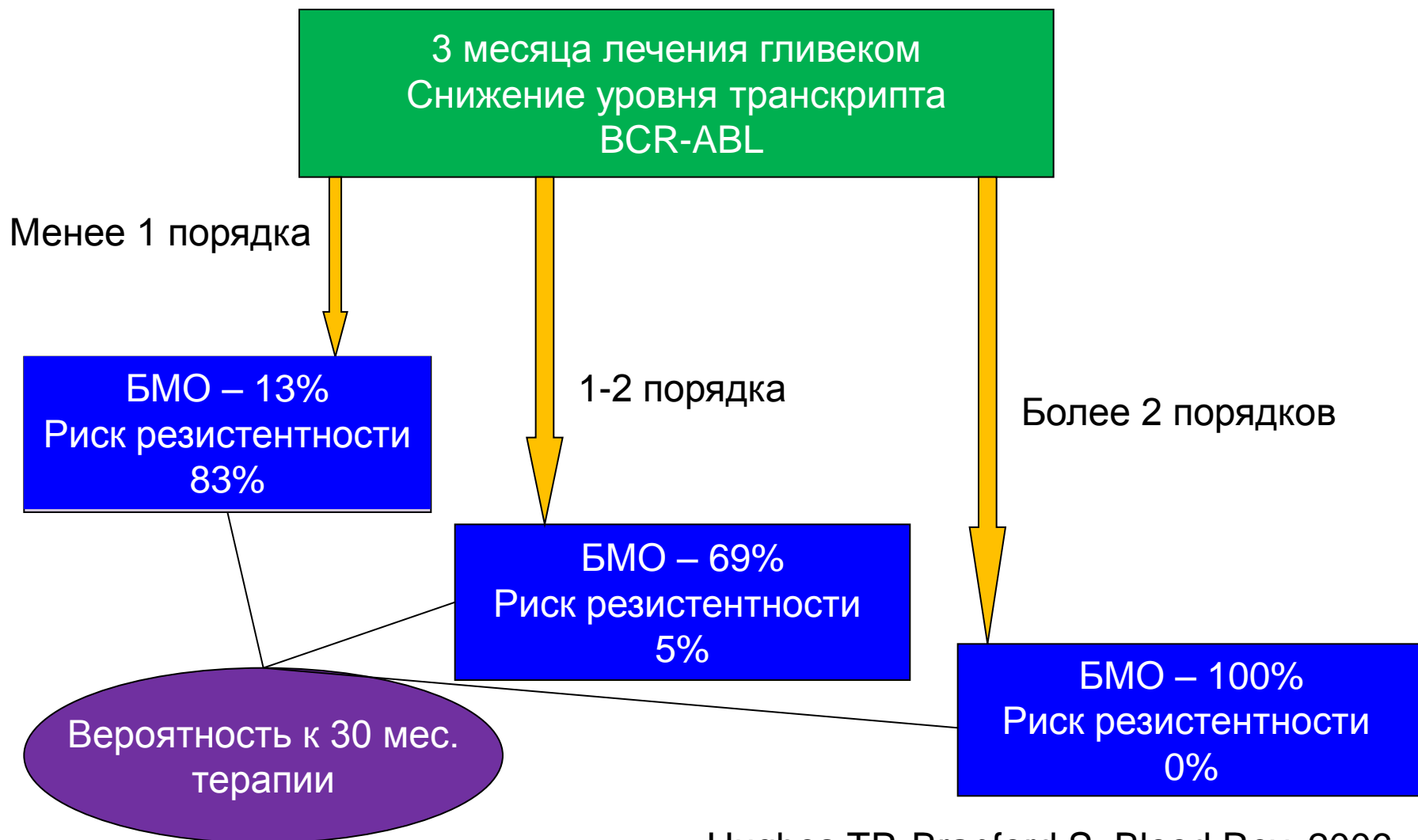


1 000 000 000 000 – 32 000 000

Hughes et al. Blood. 2006;108:28-37

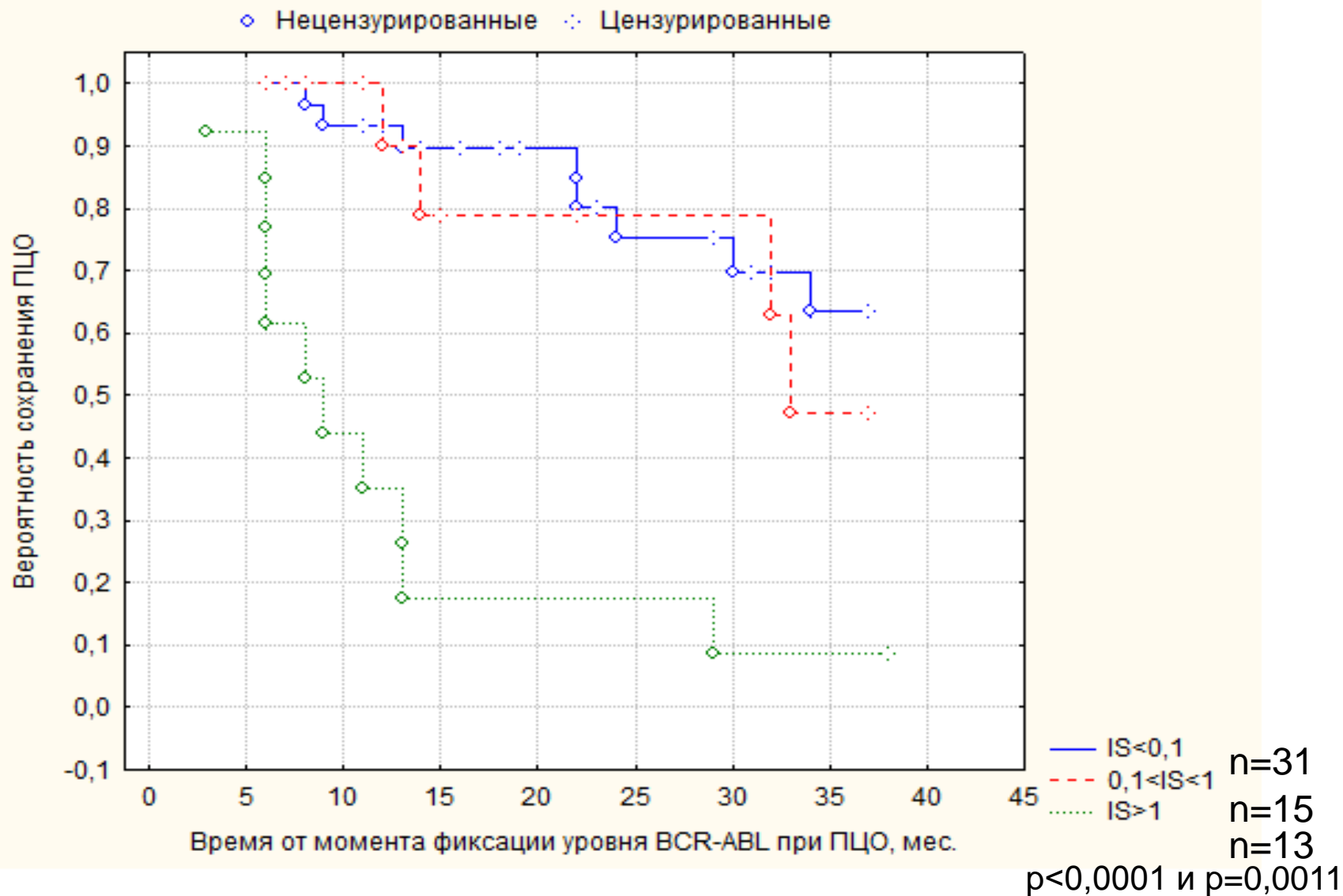
O'Hare et al. Nature Reviews Cancer. 2012;12, 513-26

# IRIS: предсказательная ценность МО



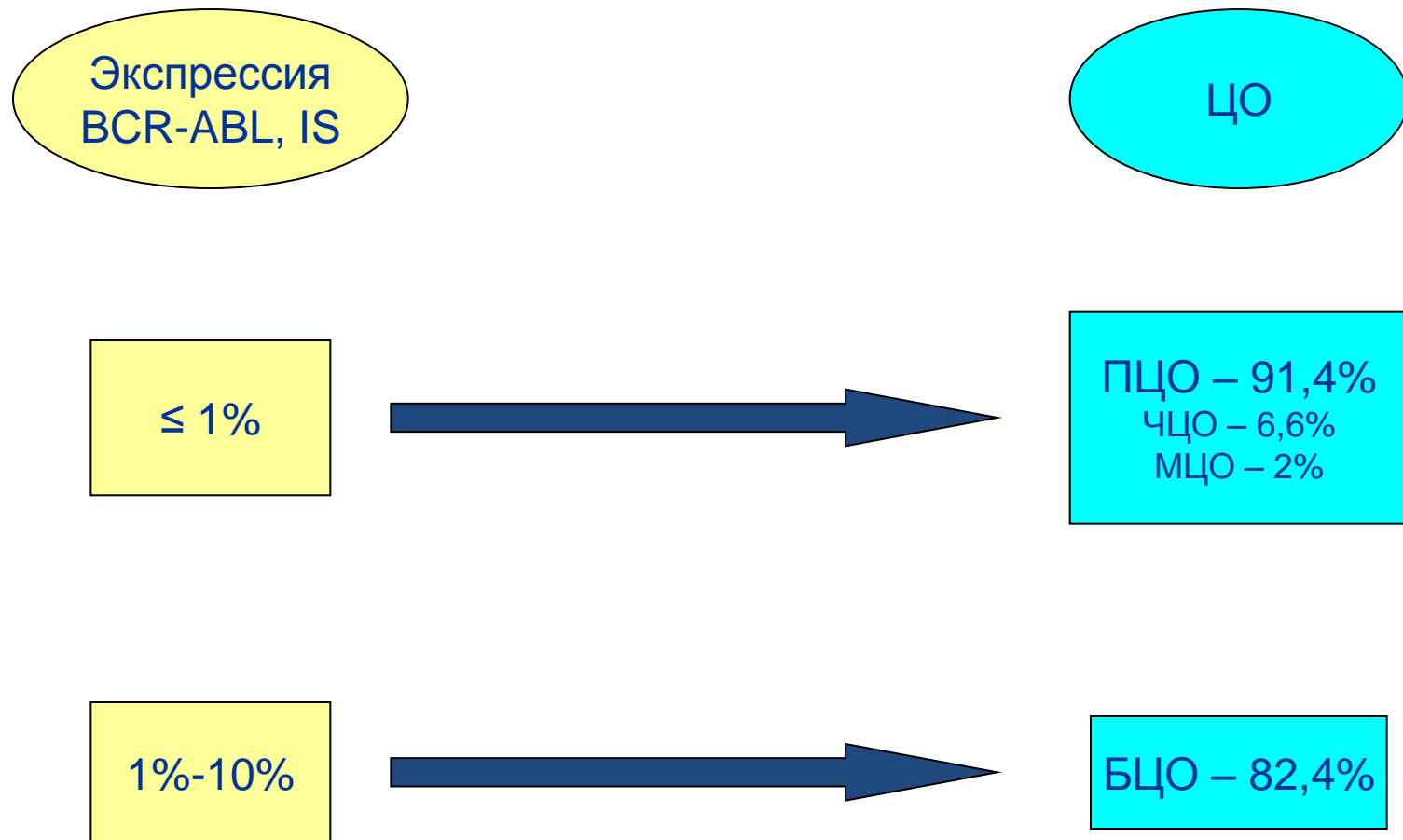


# Вероятность сохранения ПЦО у больных ХФ ХМЛ с разным уровнем экспрессии *BCR-ABL*

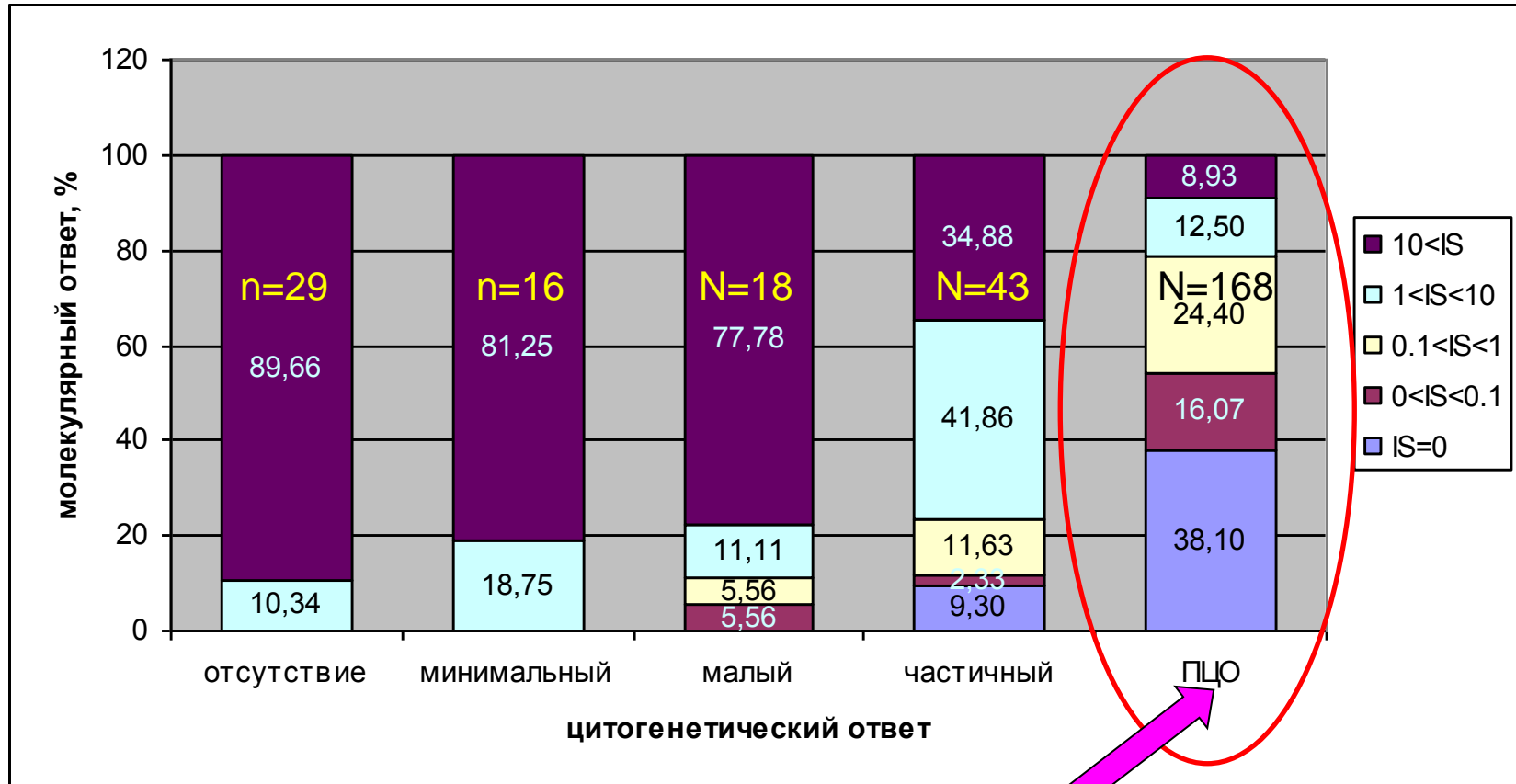


Е.В.Аксенова, А.В. Мисюрин и соавт. Клиническая онкогематология, 2010, №2, стр.151-159

# Сопоставление экспрессии BCR-ABL и цитогенетического ответа при ХМЛ

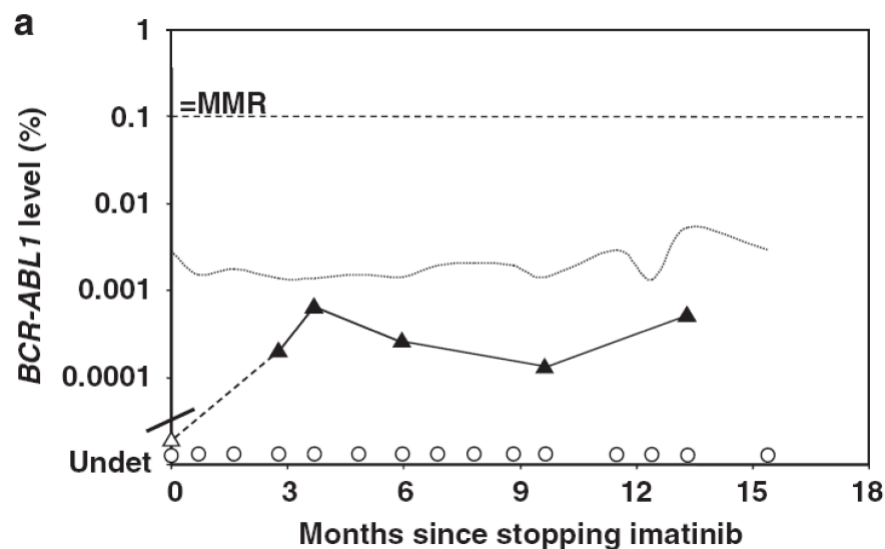


# Сопоставление ЦО и МО

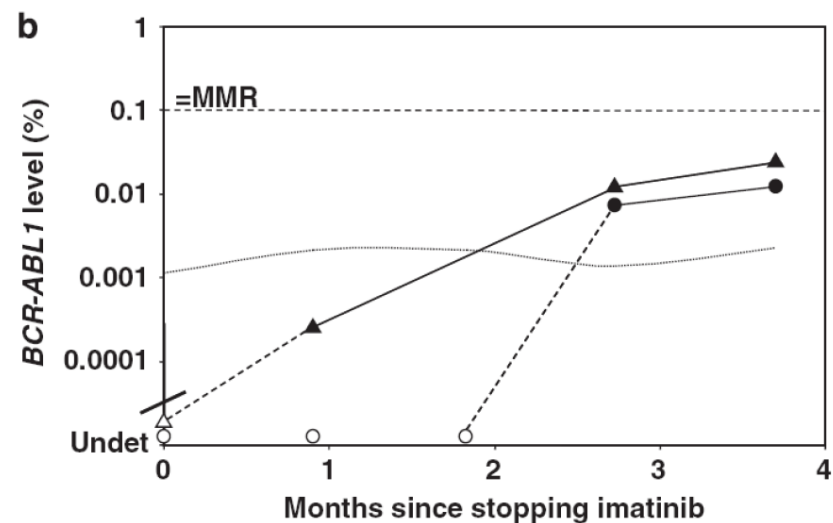


**Группа пациентов с ПЦО неоднородна по уровню экспрессии BCR-ABL**

# Использование ДНК для мониторинга ХМЛ: новое хорошо забытое старое



Стоп-иматиниб: 2 года ПМО, но сохранение ДНК-позитивности



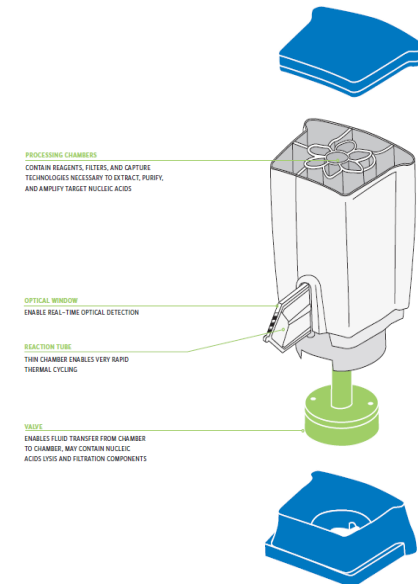
Стоп-иматиниб: быстрое развитие ДНК-, а затем и РНК-позитивности

Ross, et al. Leukemia. 2010;24(10):1719-24

Sobrinho-Simoes et al. Blood. 2010;116(8):1329-35

# Система GeneExpert (Cepheid)

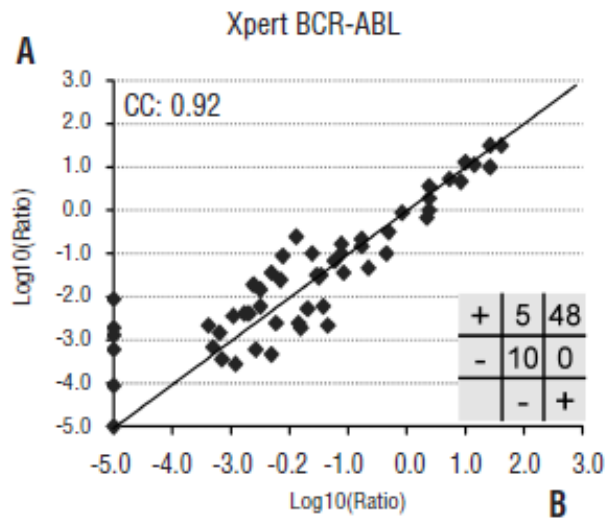
The cornerstone of the GeneXpert® System is Cepheid's patented, self-contained, single-use cartridges.



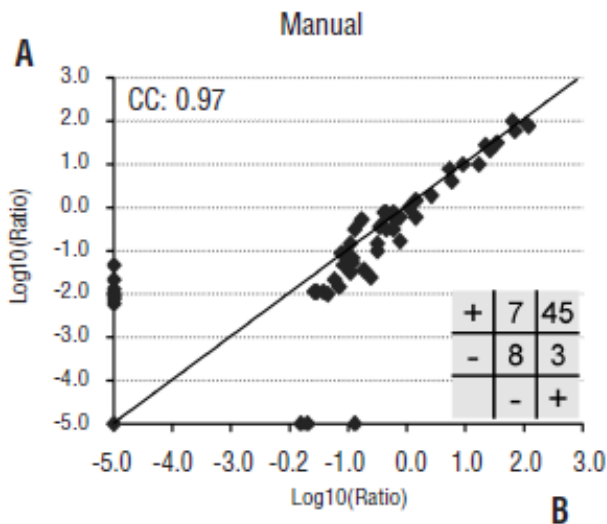
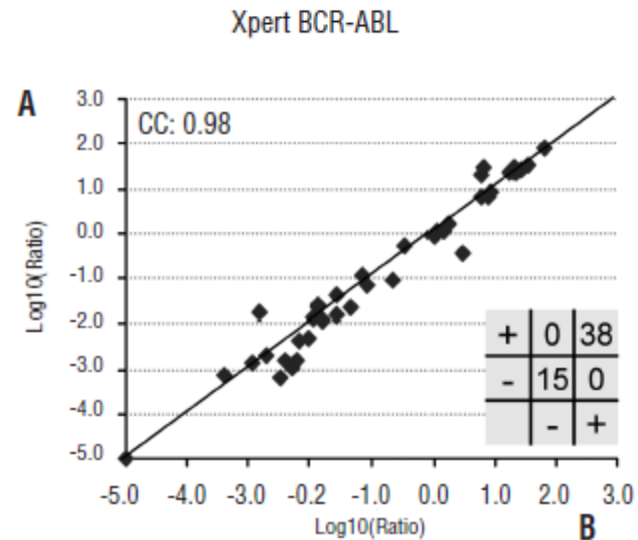
Jobbagy *et al* .JMD April 2007, Vol. 9, No. 2  
J-M. Cayuela *et al*. Haematologica 2011; 96(5)

# GeneExpert vs. “manual” RQ PCR BCR-ABL

24 часа



6 часов



GeneExpert:

1. Экономически оправдан при <300 образцов в год
2. CF необходимо определять для каждой новой партии картриждей
3. Сравним по чувствительности и воспроизводимости с RQ PCR

Несколько исследований больных ХМЛ в ХФ, получавших терапию иматинибом (ИТК1), показали необходимость достижения быстрого и глубокого молекулярного и цитогенетического ответов для наилучших долгосрочных результатов лечения:

– Hammersmith (imatinib): больные, с уровнем BCR-ABL <10% в 3 месяца и ~1% в 6 месяцев имели существенно лучшую 8-летнюю ВБП, бессобытийную и общую выживаемость

Marin D, et al. J Clin Oncol 2012;30:232-238

– CML Study IV (imatinib): больные, с уровнем BCR-ABL ≤10% and ≥ЧЦО в 3 и ≤1% и ПЦО в 6 месяцев имели лучшую 5-летнюю ВБП и общую выживаемость

Hanfstein B, et al. Leukemia 2012;26:2096-2102

– SPIRIT 2 (dasatinib): больные, получавшие дасатиниб в качестве 1 линии терапии, в случае достижения уровня экспрессии BCR-ABL ≤10% в 3 месяца терапии имели наилучшие показатели ПЦО, БМО и МО4.5 к 2 годам наблюдения

Marin D, et al. Blood 2012;120:291-294

## Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS)

Timothy P. Hughes, Andreas Hochhaus, Susan Branford, Martin C. Müller, Jaspal S. Kaeda, Letizia Foroni, Brian J. Druker, François Guilhot, Richard A. Larson, Stephen G. O'Brien, Marc S. Rudoltz, Manisha Mone, Elisabeth Wehrle, Vijay Modur, John M. Goldman, Jerald P. Radich and on behalf of the IRIS investigators

Table 3. Long-term outcomes (estimated rates at 7 years with 95% CIs) by molecular response level at 6, 12, and 18 months (landmark analyses)

Landmark, % (95% CI)	<i>BCR-ABL</i> ratio (IS) categories					Log-rank <i>P</i>	
	MMR	No MMR			Total no MMR	Comparing MMR vs no MMR	Comparing MMR vs > 0.1 to ≤ 1%
	≤ 0.1%	> 0.1 to ≤ 1.0%	> 1.0 to ≤ 10%	> 10%	> 0.1%		
<b>6 mo</b>	n = 86	n = 89	n = 44	n = 39	n = 172		
EFS rate, %	85.1 (76; 94)	92.8 (87; 98)	85.2 (74; 96)	56.3 (39; 74)	83.5 (78; 89)	ns	ns
Without AP/BC	96.2 (92; 100)	98.4 (95; 100)	95.2 (89; 100)	75.8 (60; 92)	93 (89; 97)	ns	ns
OS rate	90.3 (83; 97)	93.0 (88; 98)	100 (100; 100)	68.2 (53; 83)	89 (85; 94)	ns	ns
<b>12 mo</b>	n = 153	n = 90	n = 36	n = 25	n = 151		
EFS rate	91 (85; 97)	91.7 (86; 98)	64.1 (48; 80)	52.5 (31; 74)	79.4 (73; 86)	.001†	ns‡
Without AP/BC	99 (97; 100)*	95.5 (91; 100)	83.4 (70; 97)	76 (57; 95)	89.9 (85; 95)	.0004†	.048‡
OS rate	92.5 (88; 97)	96.7 (93; 100)	85.7 (74; 97)	65.5 (46; 85)	89.2 (84; 94)	ns	ns
<b>18 mo</b>	n = 164	n = 48	n = 25	n = 16	n = 89		
EFS rate	94.9 (91; 99)	86.4 (76; 97)	62.3 (43; 82)	58.0 (30; 87)	75.3 (66; 85)	< .001†	.014‡
Without AP/BC	99.1 (98; 100)	95.7 (90; 100)	82.6 (67; 98)	81.5 (58; 100)	90.1 (84; 97)	< .001†	.054
OS rate	94.9 (91; 99)	95.7 (90; 100)	84.0 (70; 98)	80.8 (61; 100)	89.8 (84; 96)	ns	ns



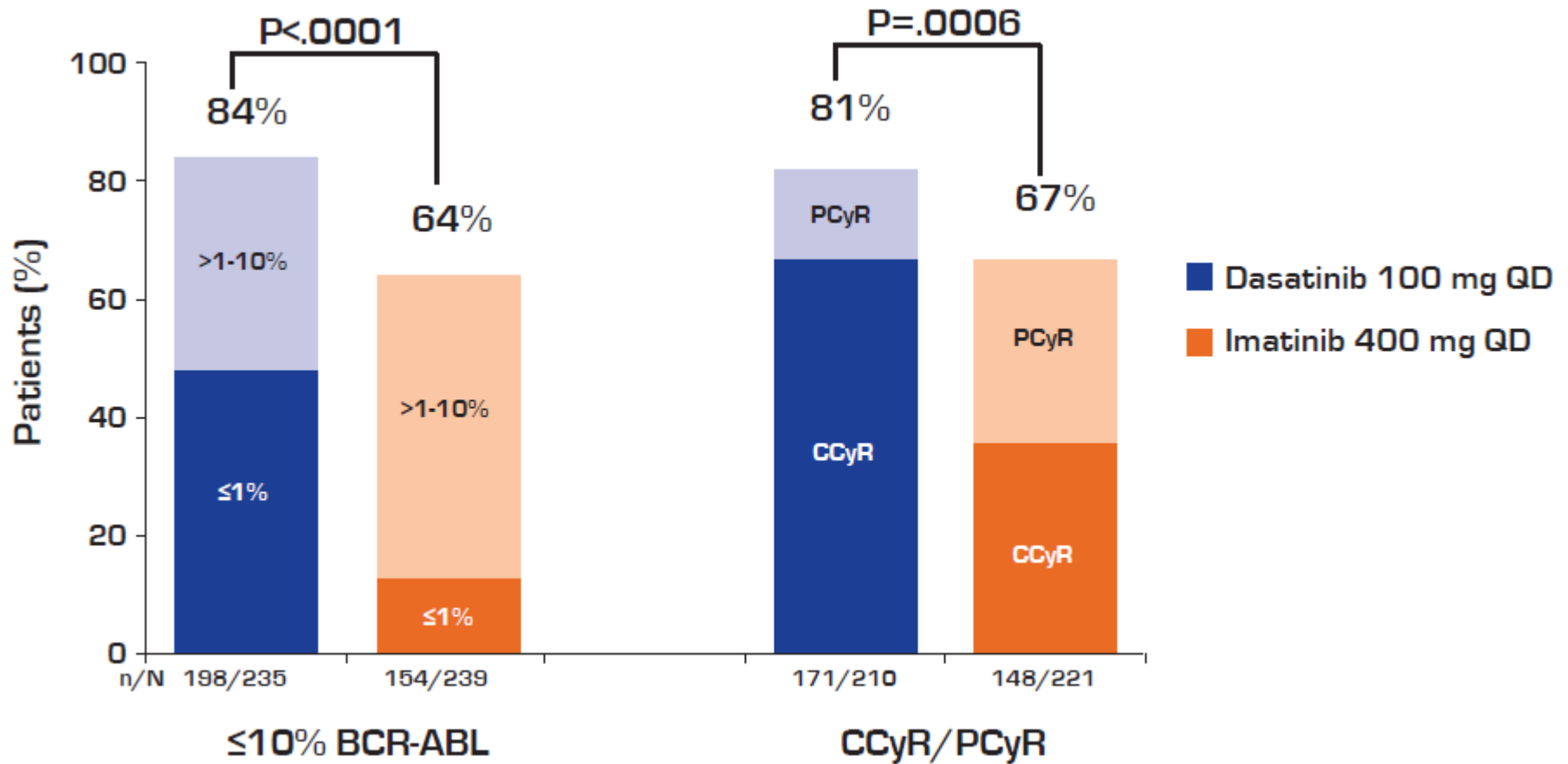
# Выживаемость без прогрессии (PFS) в зависимости от молекулярного ответа

<b>BCR-ABL<sup>IS</sup> at 3 months</b>	<b>Five-year PFS</b>	<b>p-value</b>	
≤1% (n = 218)	96%	NS	—
>1%-10% (n = 281)	92%		0.037
>10% (n = 189)	87%	—	
<b>BCR-ABL<sup>IS</sup> at 6 months</b>	<b>Five-year PFS</b>	<b>p-value</b>	
≤1% (n = 498)	96%	0.006	—
>1%-10% (n = 194)	89%		NS
>10% (n = 91)	86%	—	

# Выживаемость без прогрессии (PFS) в зависимости от цитогенетического ответа

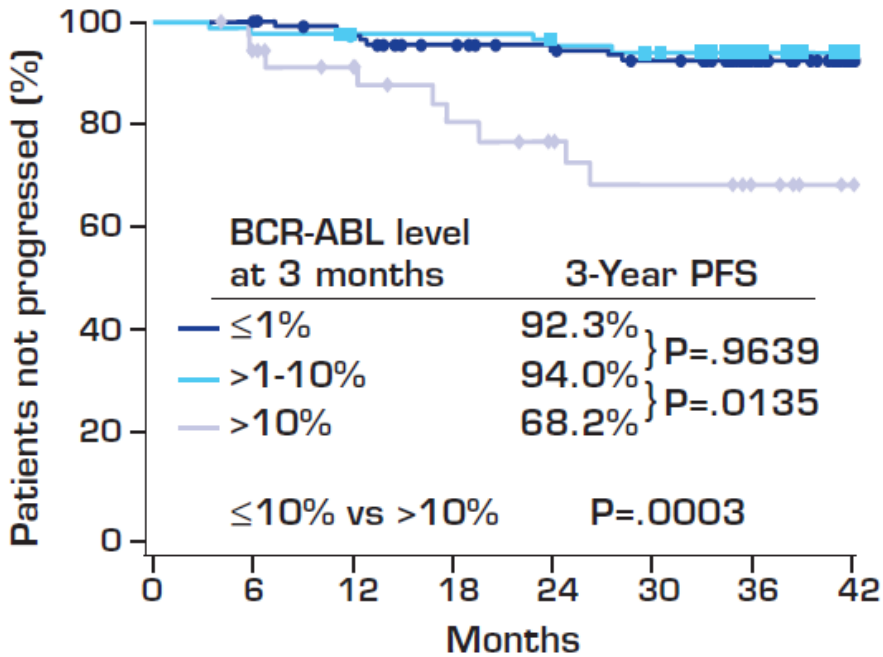
<b>Ph+ at 3 months</b>	<b>Five-year PFS</b>	<b><i>p</i>-value</b>
≤35% (n = 336)	94%	0.016
>35% (n = 122)	87%	
<b>Ph+ at 6 months</b>	<b>Five-year PFS</b>	<b><i>p</i>-value</b>
0% (n = 319)	97%	0.014
>0% (n = 160)	91%	

## Responses at 3 Months

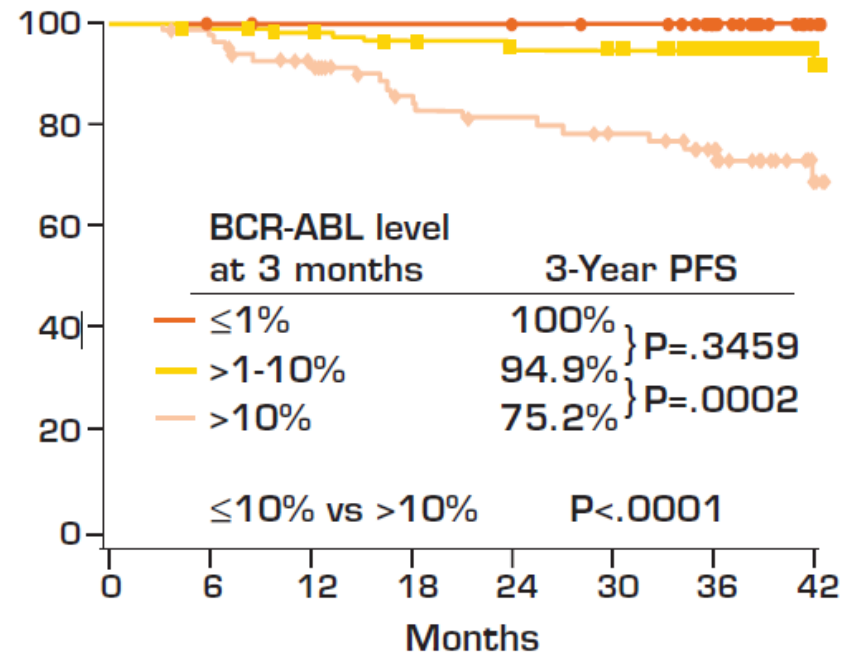


## PFS According to BCR-ABL Level at 3 Months

**Dasatinib 100 mg QD**  
84% had  $\leq 10\%$  BCR-ABL

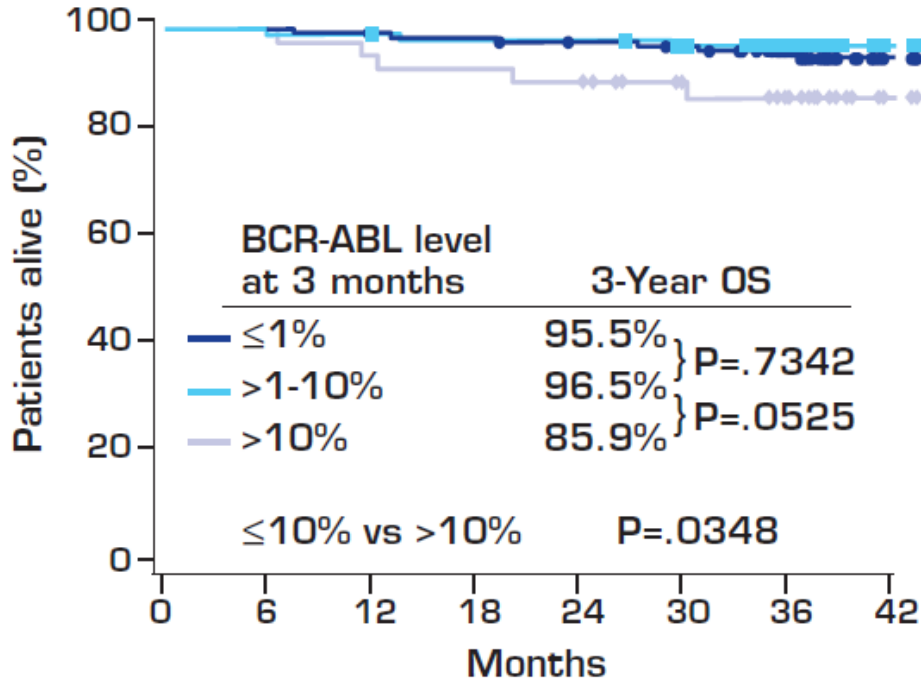


**Imatinib 400 mg QD**  
64% had  $\leq 10\%$  BCR-ABL

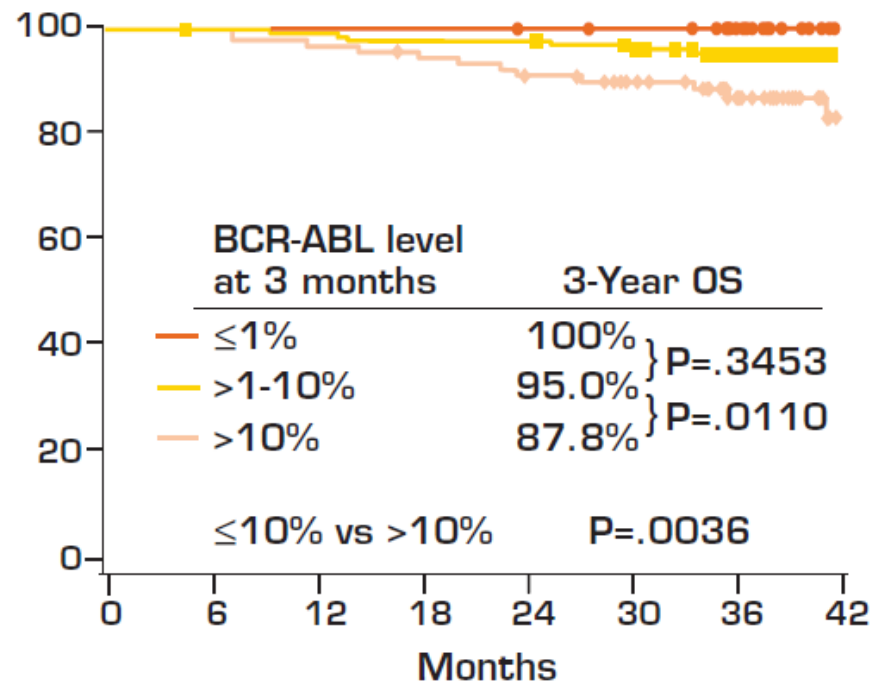


## OS According to BCR-ABL Level at 3 Months

**Dasatinib 100 mg QD**  
84% had  $\leq 10\%$  BCR-ABL



**Imatinib 400 mg QD**  
64% had  $\leq 10\%$  BCR-ABL

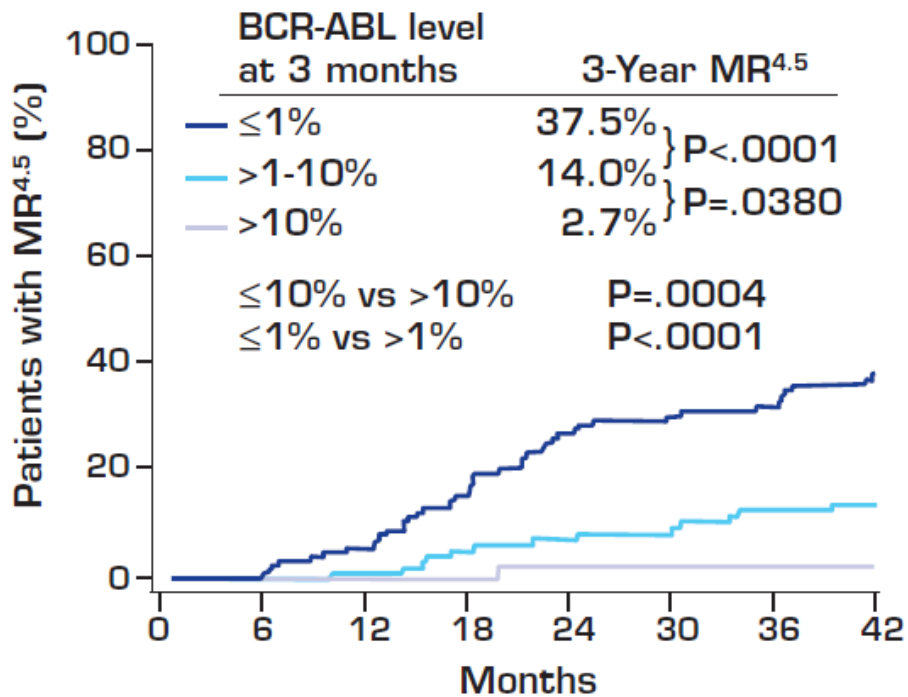


## MR4.5 According to BCR-ABL Level at 3 Months

### Dasatinib 100 mg QD

84% had  $\leq 10\%$  BCR-ABL

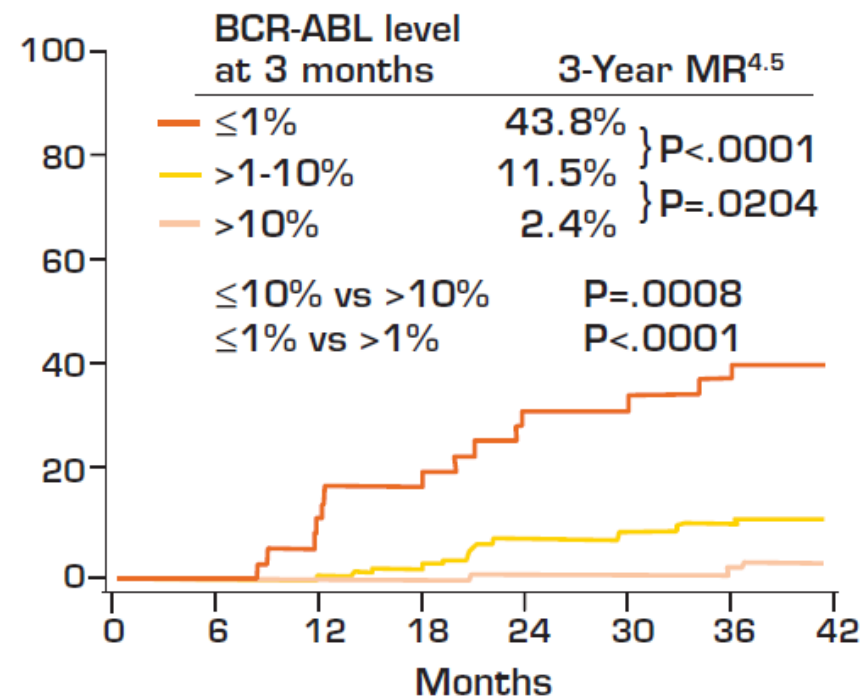
48% had  $\leq 1\%$  BCR-ABL



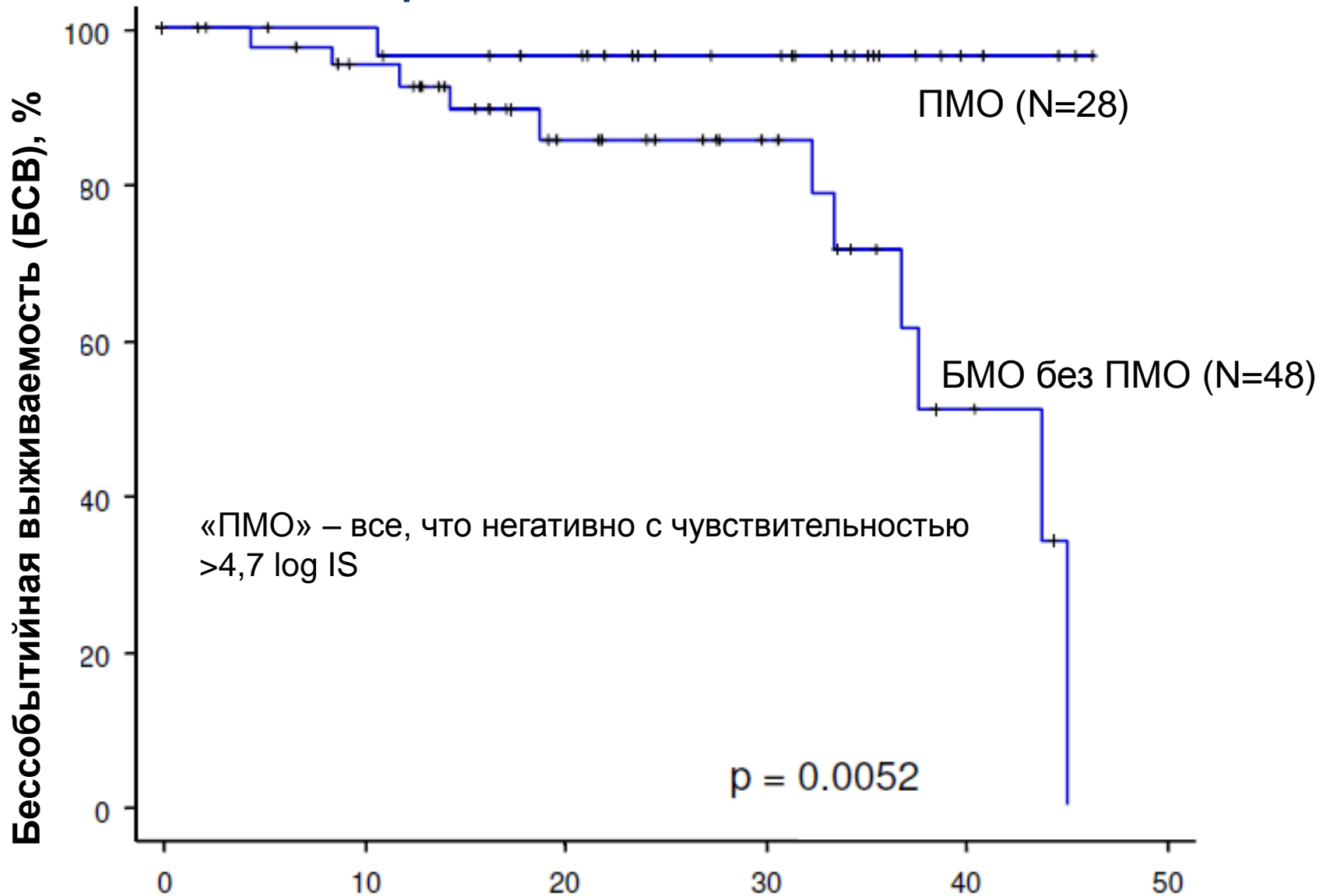
### Imatinib 400 mg QD

64% had  $\leq 10\%$  BCR-ABL

13% had  $\leq 1\%$  BCR-ABL



# Полный молекулярный ответ (ПМО) увеличивает продолжительность БСВ



В качестве препаратов первой линии для лечения ХМЛ в настоящее время применяют не только иматиниб (ИТК1), но и дазатиниб и нилотиниб (ИТК2)

В связи с этим возросла необходимость раннего выявления больных ХМЛ, плохо отвечающих на терапию иматинибом, для своевременного переключения на ИТК2



# Определение ответов на терапию ИТК в первой линии ХМЛ: Рекомендации ESMO 2012

	Оптимальный	Настороженность	Неудача
3 мес.	Ph+ $\leq$ 95% или BCR/ABL < 10%		Ph+ >95% или BCR/ABL >10%
6 мес.	Ph+ $\leq$ 35% или BCR/ABL <10%	Ph+ 35%-65%	Ph+ >65% или BCR-ABL >10%
12 мес.	Ph+ 0% или BCR/ABL $\leq$ 1%		Ph+ $\geq$ 1% или BCR/ABL >1%
В любое время		Потеря БМО	Потеря ПГО, Потеря ПЦО, мутации

## European LeukemiaNet Recommendations for the Management of Chronic Myeloid Leukemia (CML)

*Baccarani et al, Blood 2013;122:872-884*

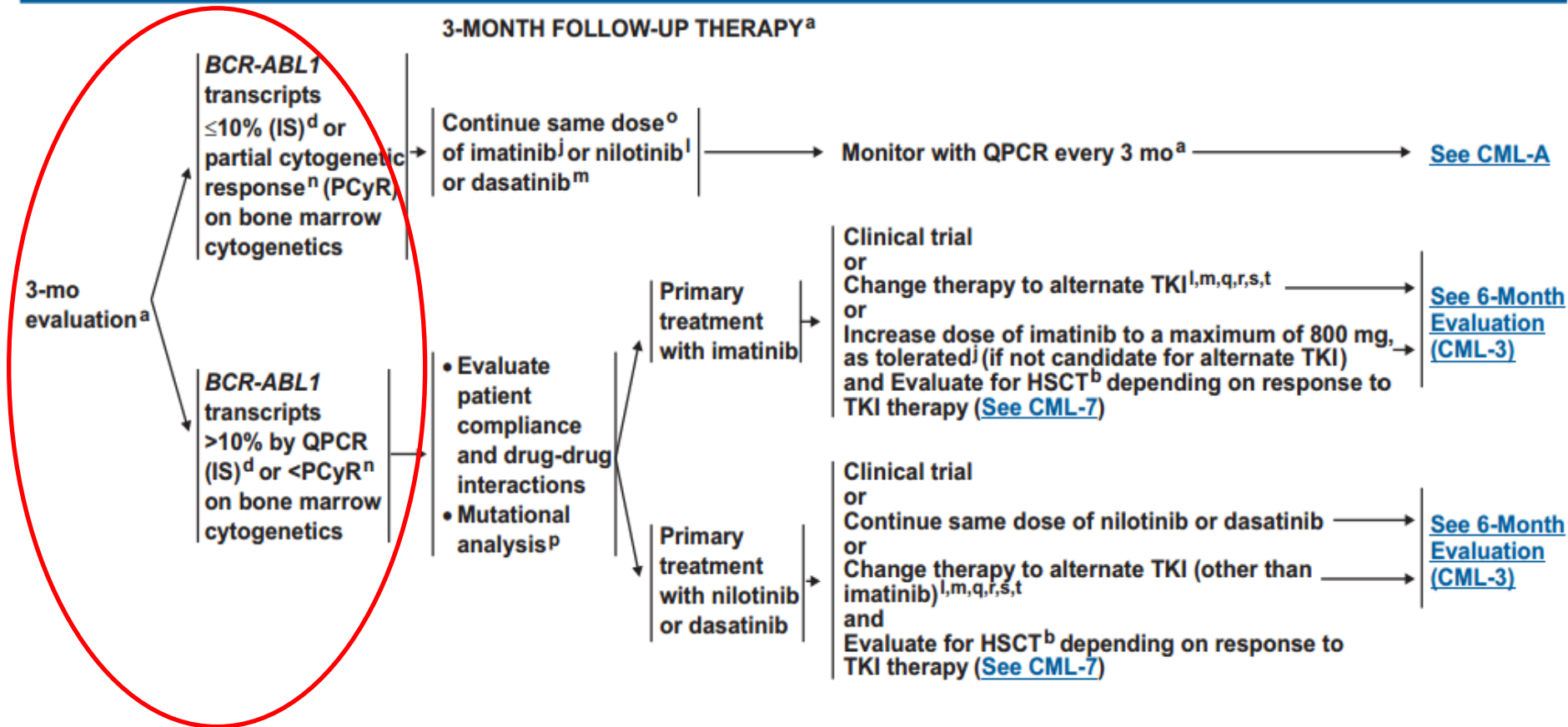
Response definitions for any TKI **first line**, and 2nd line in case of intolerance, all patients (CP, AP, and BC)

Time	Optimal response	Warning	Failure
Baseline		High risk Major route CCA/Ph+	
<b>3 mos.</b>	BCR-ABL <sup>IS</sup> ≤10%* Ph+ ≤35% (PCyR)	BCR-ABL <sup>IS</sup> >10%* Ph+ 36-95%	No CHR* Ph+ >95%
<b>6 mos.</b>	BCR-ABL <sup>IS</sup> <1%* Ph+ 0% (CCyR)	BCR-ABL <sup>IS</sup> 1-10%* Ph+ 1-35%	BCR-ABL <sup>IS</sup> >10%* Ph+ >35%
<b>12 mos.</b>	BCR-ABL <sup>IS</sup> ≤0.1%* (MMR)	BCR-ABL <sup>IS</sup> 0.1-1%*	BCR-ABL <sup>IS</sup> >1%* Ph+ >0%
<b>Then, and at any time</b>	MMR or better	CCA/Ph- (-7, or 7q-)	Loss of CHR Loss of CCyR Loss of MMR, confirmed** Mutations CCA/Ph+

\*and/or \*\*in 2 consecutive tests, of which one ≥1%

IS: BCR-ABL on International Scale

# Рекомендации NCCN 2014



По результатам международного исследования IRIS, только **60%** больных, у которых терапия иматинибом была начата в ранней хронической фазе (РХФ), оставались на этой терапии через 7 лет после ее начала

# Причины резистентности

## **BCR/ABL - зависимые причины резистентности**

- Амплификация или гиперэкспрессия гена BCR/ABL

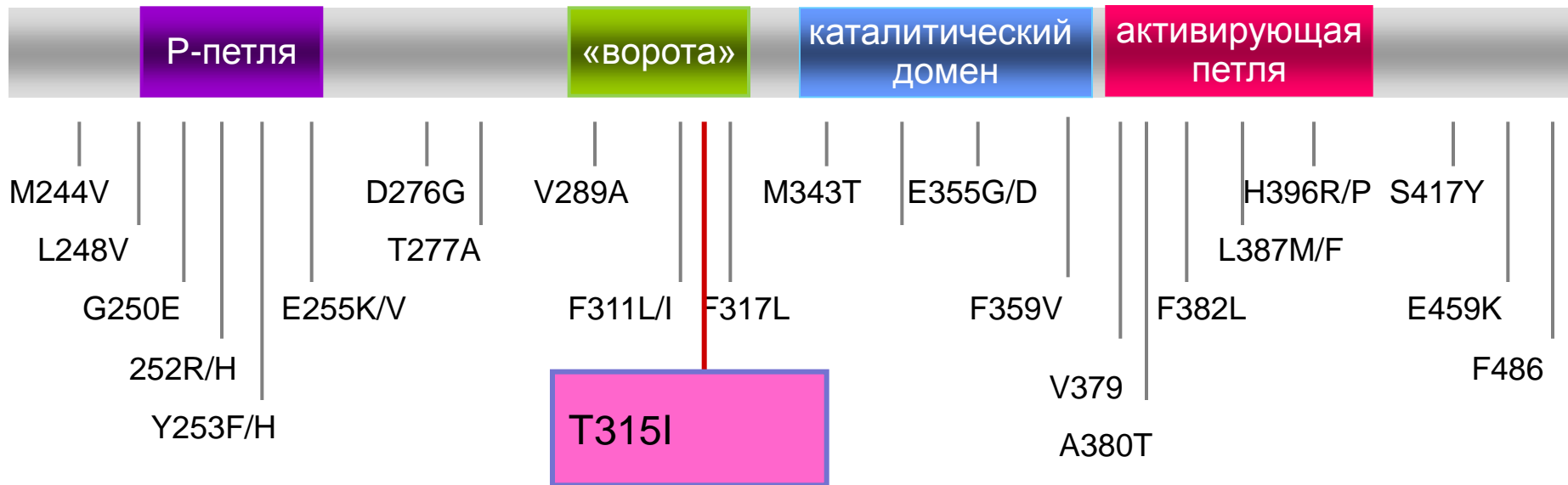
50 – 60%

- Мутации гена BCR/ABL
  - точечные мутации
  - делеции и инсерции

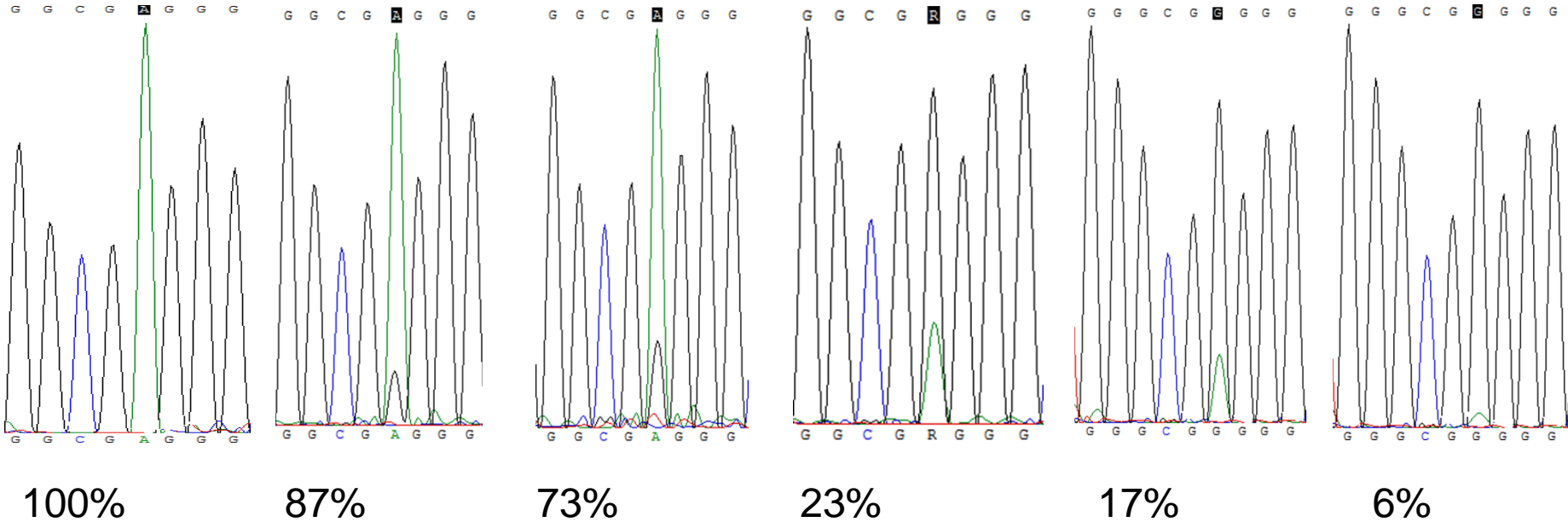
40 - 50%

## **BCR/ABL-независимые причины резистентности**

# 4 основных домена, содержащие мутации BCR/ABL

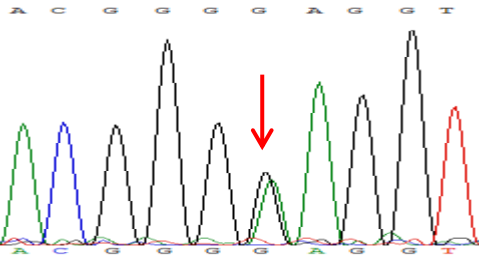


# Соматическая мутация G749A гена BCR/ABL при терапии ХМЛ дазатинобом

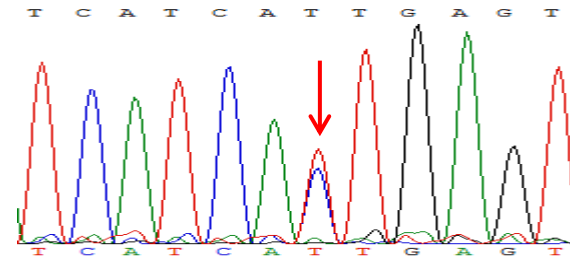


# Двойные мутации BCR-ABL

763G>A E255K 50%

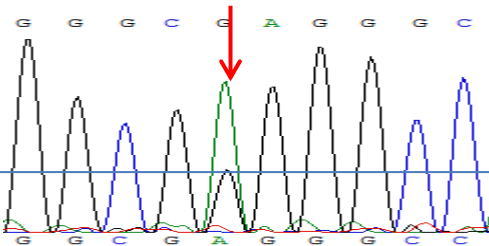


944C>T T315I 50%)

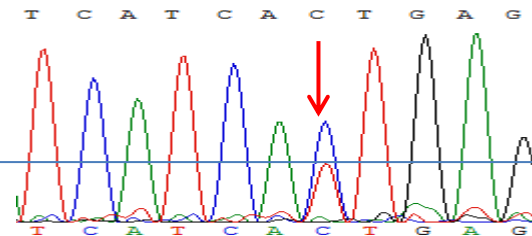


749G>A G250E 70%

П-НТ №2

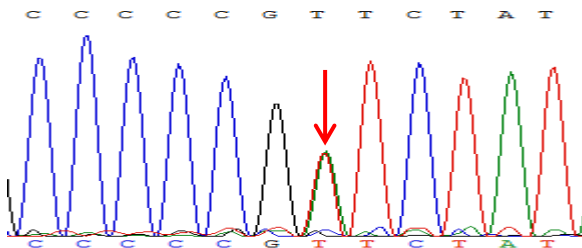


944C>T T315I 30%

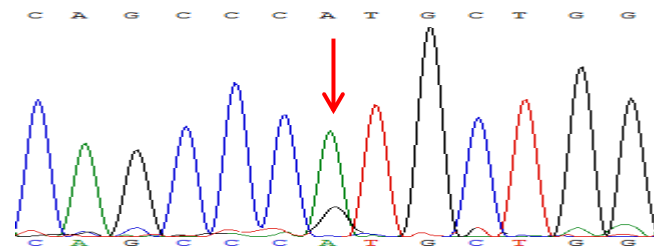


931T>A F311I 50%

П-НТ №3



1187A>G H396R 10%





## 278 мутаций гена BCR/ABL (38 видов)

мутации	n=	%
T315I	35	12,6
G250E	35	12,6
F359V	18	6,4
F317L	22	7,9
M224V	21	7,5
H396R	18	6,4
E255K	16	5,7
Y253H	18	6,4
E255V	11	3,9
L248V	11	3,9
M351T	11	3,9
Q252H	5	2,3
E355G	8	2,8
L387F	5	1,8
S348L	4	1,4
F359C	7	2,5
F317I	3	1,07
E279K	2	0,7
E279A	2	0,7



мутации	n=	%
E459K	1	0,3
F486S	1	0,3
L387M	2	0,7
Y312C	1	0,3
E459A	1	0,3
E459R	1	0,3
K247R	2	0,7
Ins 98-72 bp	1	0,3
P441L	1	0,3
Q252M	1	0,3
Q491L	1	0,3
T345I	1	0,3
V299A	2	0,7
E255D	3	1,1
del742	1	0,3
del ex7	2	0,9
E292V	1	0,3
E334G	1	0,3
E355A	1	0,3

# Двойные мутации гена BCR/ABL

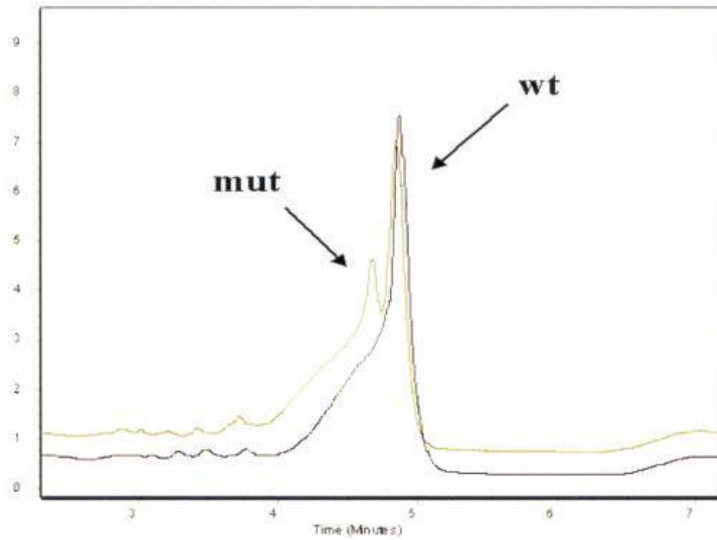
№	1 мутация	зона	2 мутация	зона
1	T315I	B	E255V	P-loop
2	E255V	P-loop	F359V	A- loop
3	E255V	P-loop	Q252H	P-loop
4	E255V	P-loop	Q252H	P-loop
5	T315I	B	L248V	P-loop
6	M351I	C-domain	S348L	C-domain
7	M244V	P-loop	K247R	P-loop
8	M244V	P-loop	G250E	P-loop
9	M244V	P-loop	G250E	P-loop
10	M244V	P-loop	F317L	B
11	M244V	P-loop	G250E	P-loop
12	M244V	P-loop	T315I	B
13	M244V	P-loop	M351T	C-domain
14	F359V	A- loop	H396R	A-loop
15	G250E	P-loop	E255K	P-loop
16	S348L	C-domain	M351T	C-domain

# Выбор терапии ИТК-2 при мутациях гена BCR/ABL

число больных n=262, мутаций выявлено 278

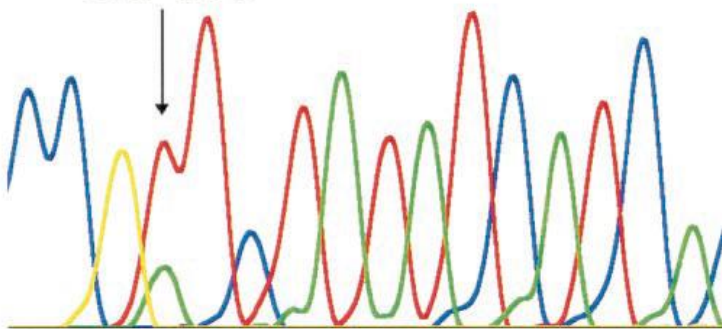
мутации	n=	%		Выбор терапии
<b>T315I</b>	<b>35</b>	<b>12,6</b>	<b>12,6%</b>	ИТК неэффективны (аллоТГСК, клинические исследования)
<b>E255K</b>	<b>16</b>	<b>5,7</b>	<b>25,1%</b>	Резистентны к Нилотинибу
<b>E255V</b>	<b>11</b>	<b>3,9</b>		
<b>F359V</b>	<b>18</b>	<b>6,5</b>		
<b>F359C</b>	<b>7</b>	<b>2,5</b>		
<b>Y253H</b>	<b>18</b>	<b>6,5</b>		
<b>F317L</b>	<b>22</b>	<b>7,9</b>	<b>8,9%</b>	Резистентны к Дазатинибу
<b>F317I</b>	<b>3</b>	<b>1,0</b>		

# Определение мутаций BCR-ABL при помощи DHPLC

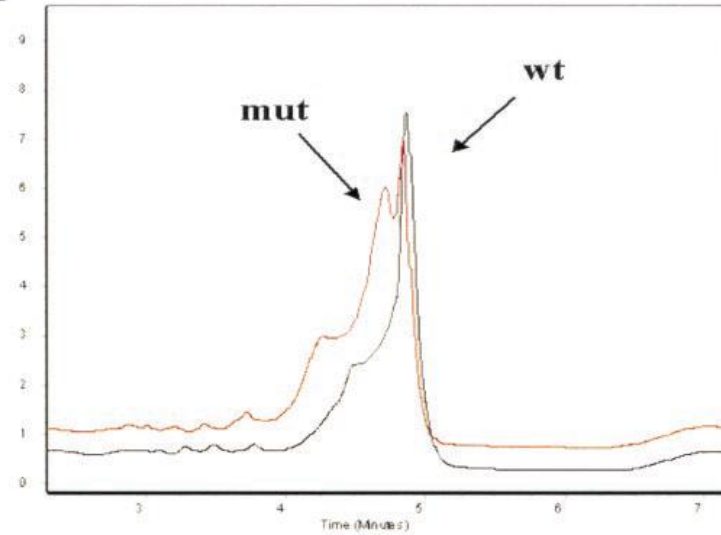


C C T T C T G T A T C A T C A

TTC > ATC

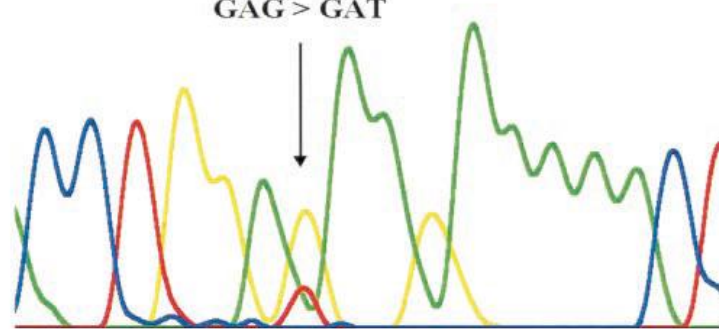


A

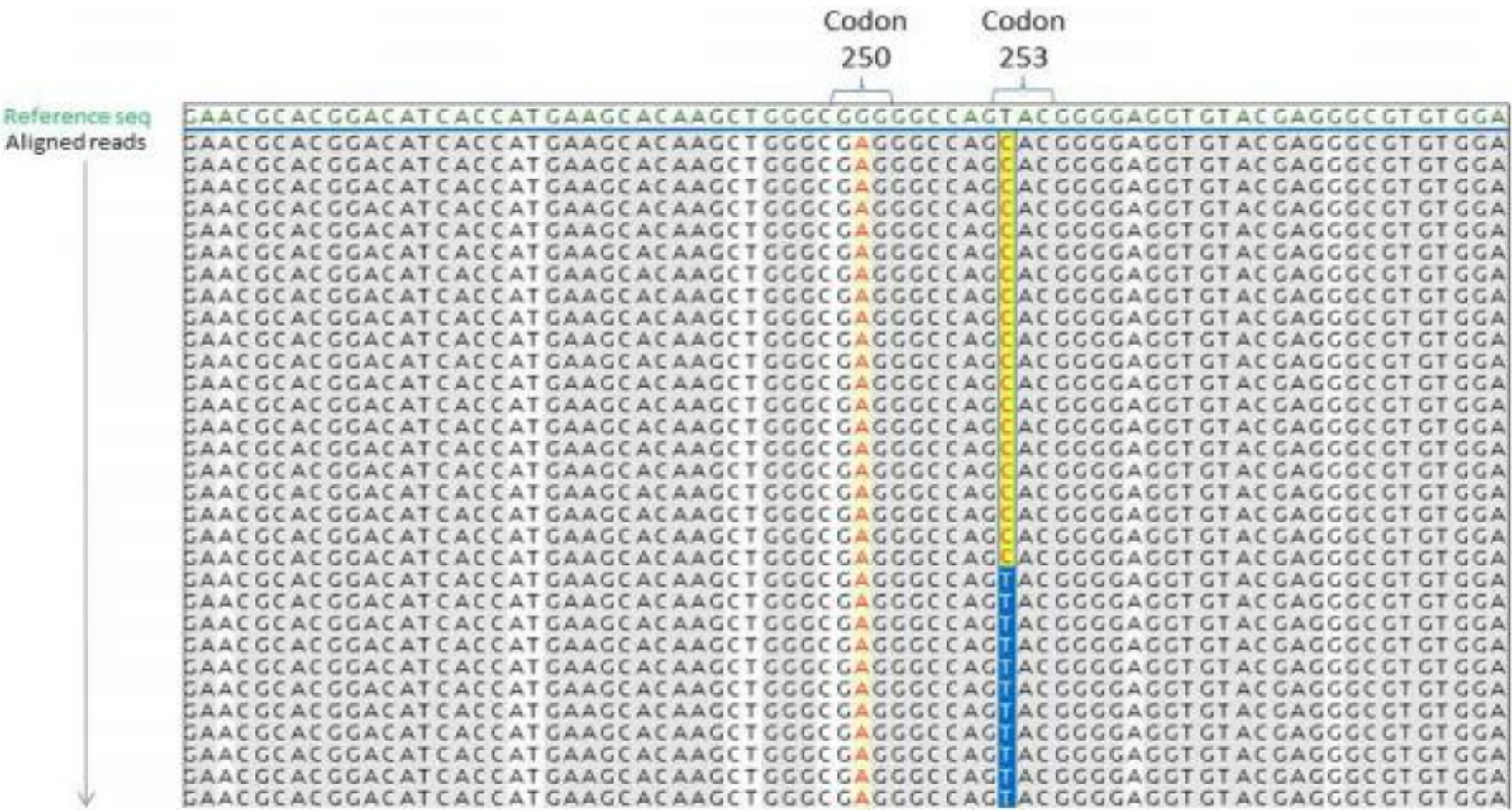


C C T G G A G A C A A A A A C T

GAG > GAT



# Определение мутаций BCR-ABL методом глубокого секвенирования



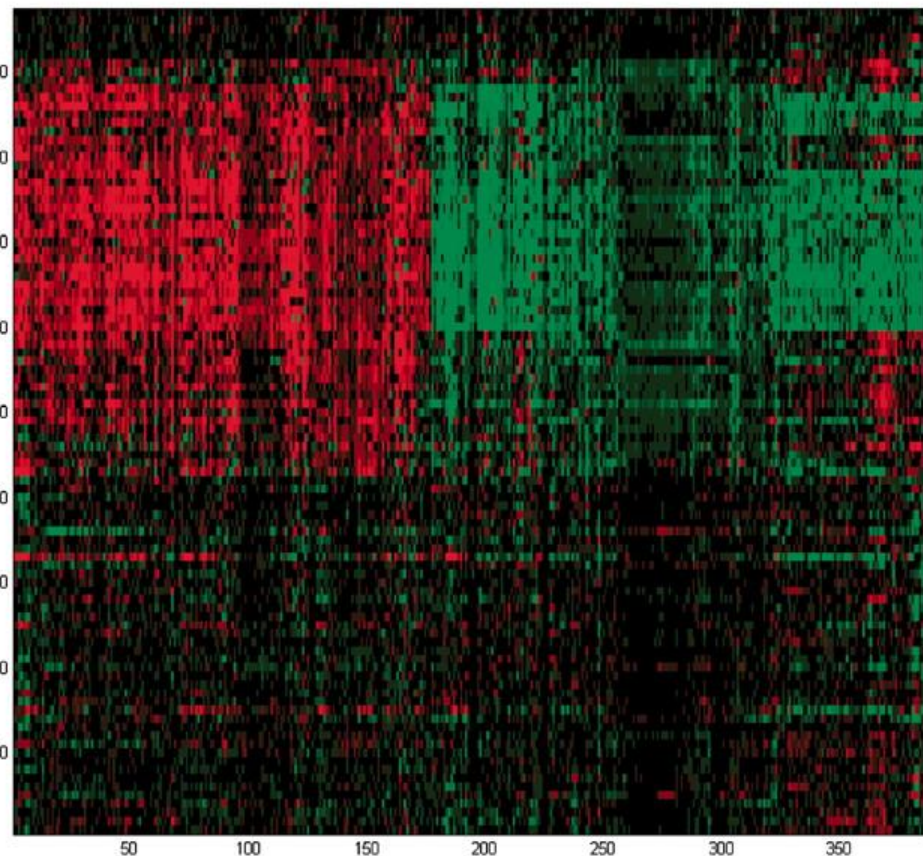
# Определение мутаций BCR-ABL методом глубокого секвенирования

Table 3. Comparison between mutations detected by SS and mutations detected by UDS and estimated clonal composition of the samples harboring multiple mutations as assessed by UDS

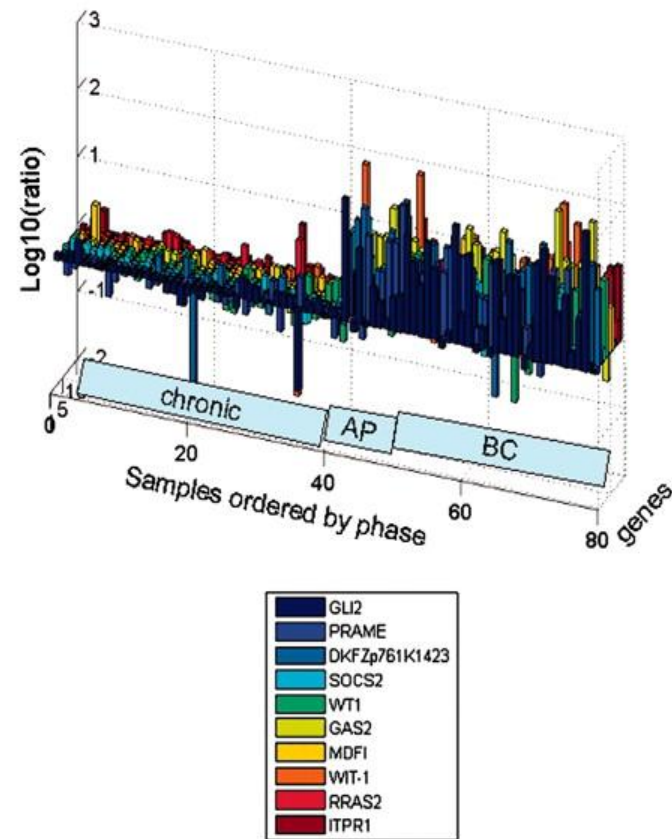
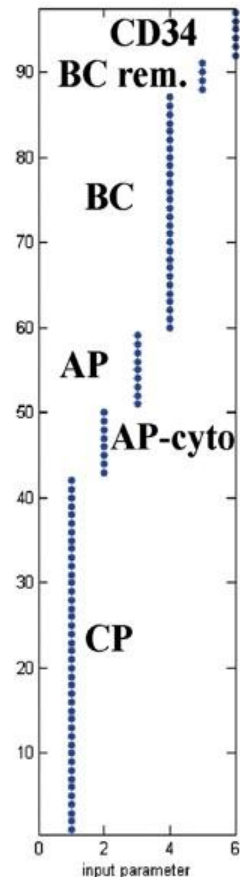
Code	Date	TKI	Line	Mutations by SS	Mutations by UDS*	Estimated mutated populations by UDS†	Disease status and response
CP-01-01	2/29/2012	DAS	2	H396R (~50), F317L (~30)	H396R (55.05), F317L (28.23)	H396R (43.99), F317L (17.17), H396R+F317L (11.06)	Complete cytogenetic response but no molecular response after 6 mo on DAS
CP-01-02	5/2/2012	DAS	2	F317L (~70), H396R (~20)	F317L (63.07), H396R (15.74), T315I (5.42)	F317L (55.47), H396R (7.60), H396R+F317L (7.38), T315I (4.44), H396R+T315I (0.76), F317L+T315I (0.22)	Complete hematologic response, cytogenetic response not assessed
CP-01-03	7/7/2012	NIL	3	T315I (~100)	T315I (99.28)	T315I (99.28)	Complete hematologic response, no cytogenetic response
CP-02-01	3/4/2008	IM	1	F359V (~20)	F359V (17.33)	F359V (17.33)	Loss of complete hematologic response after 5 mo on IM
CP-02-02	4/2/2008	DAS	2	T315I (~100)	T315I (94.80)	T315I (94.80)	Progression to LBC
CP-03-01	3/7/2005	IM	1	G250E (~100)	G250E (93.72), F317L (1.78)	G250E (92.20), G250E+F317L (1.52), F317L (0.26)	Minor cytogenetic response after 12 mo on IM
CP-03-02	9/14/2005	DAS	2	G250E (~70), F317L (~20)	G250E (74.71), F317L (22.51)	G250E (62.00), G250E+F317L (12.71), F317L (9.80)	Minor cytogenetic response
CP-03-03	11/17/2005	DAS	2	G250E (~70), F317L (~30)	G250E (60.73), F317L (27.06)	G250E (46.44), G250E+F317L (14.29), F317L (12.77)	Not available
CP-03-04	2/13/2006	DAS	2	G250E (~50), F317L (~40)	G250E (45.47), F317L (37.49), H295H (4.91), C330C (1.48)	G250E (30.46), F317L (20.40), G250E+F317L (12.47), F317L+H295H (2.14), G250E+F317L+H295H (1.19), H295H (0.89), F317L+C330C (0.82), G250E+H295H (0.69), G250E+F317L+C330C (0.47), G250E+C330C (0.19)	Complete hematologic response, no cytogenetic response

# Анализ экспрессии 25000 генов в хронической фазе, фазе акселерации и при бластном кризе ХМЛ

A



B



Radich, Jerald P. et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 2794-2799

# BCR-ABL-независимая резистентность

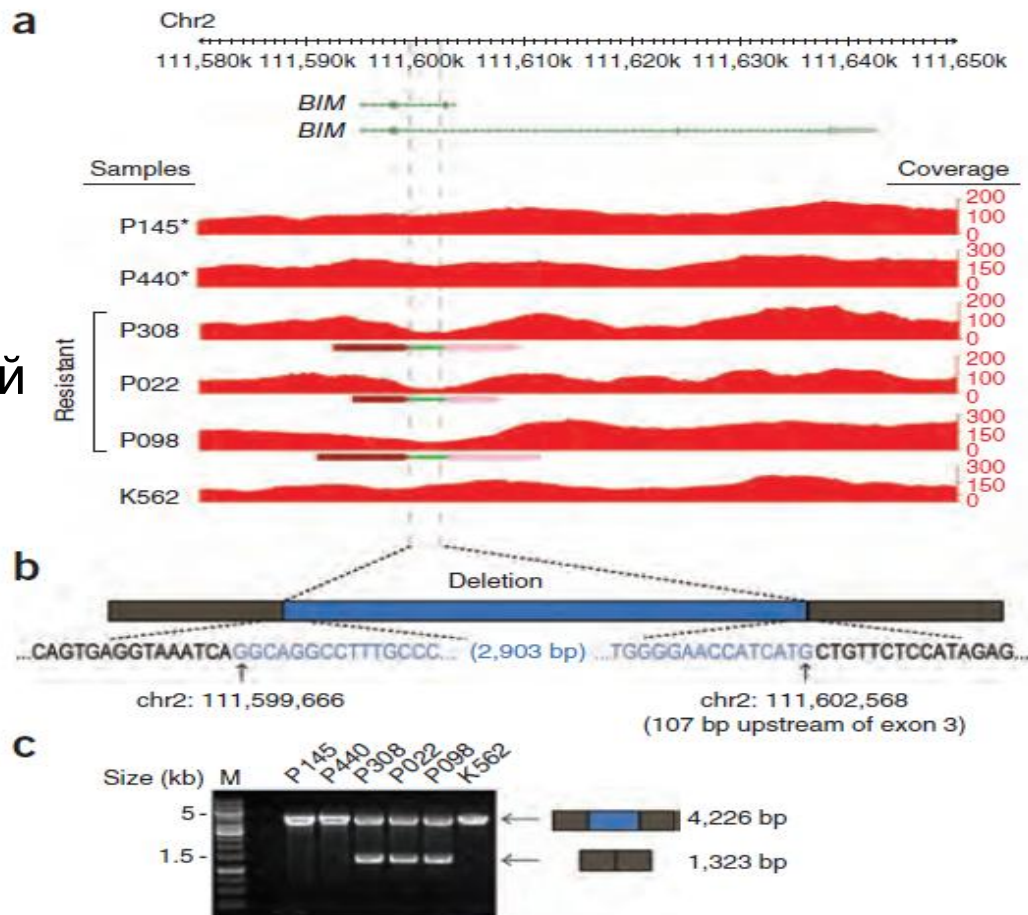
- Связывание иматиниба с белками плазмы: кислый альфа-1 гликопротеин  
*A.Hochhaus, 2006*
- Повышение/снижение активности трансмембранных транспортеров: ABCB1, ABCG2, ABCC3, MVP, OCT-1  
*A. Quintas-Cardama, 2009*
- Активация тирозинкиназ семейства SRC: LYN, AXL, SRC, FYN, YES, BLK, YRK, FGR, HCK, LCK, RHO (ROCK)  
*J.Wu, 2008; M.Dufies, 2012; Ruth, 2012*
- Изменение работы генов, контролирующих апоптоз: IAP's, каспазы  
*K.Livesey, 2009*
- Активация автофагии: ген HMGB1, ядерный фактор NAC1  
*K.Livesey, 2009; Y.Zhang, 2012; Y.Yu, 2012*
- Переход опухолевых клеток из суспензионного состояния в прикрепленное мезенхимоподобное (TSP1, TSP1-R, ITGa2B, ITGa5, ITGaV, ITGb1, TGb3, ITGb5, MCAM, PECAM1)  
*A.Dhasarathy, 2010*
- Увеличение экспрессии CXCR4 при ХМЛ приводит миграции незрелых опухолевых клеток в строму костного мозга и способствует выживаемости покоящихся стволовых опухолевых клеток  
*Konopleva, 2008, 2010*



# BCR-ABL-независимая резистентность

## Делеция 2 903 п.н. интрона 2 гена BIM (BCL2L11):

Данный полиморфизм определяет **21%** случаев **резистентности** к **иматинибу** у представителей Восточной Азии



# Заключение

1. Основным молекулярным маркером ХМЛ по-прежнему остается область слияния генов BCR и ABL.
2. Для того, чтобы молекулярная диагностика ХМЛ могла должным образом соответствовать современным высоким стандартам терапии этого заболевания, основанным на использовании ИТК, необходимо, чтобы она предоставляла количественную информацию о поведении опухолевых клеток.
3. Молекулярная диагностика ХМЛ должна быть основана на стандартизованных методиках.
4. Так как опухолевые клетки являются ускользающей мишенью даже для самых совершенных терапевтических подходов, необходима кропотливая работа по отслеживанию возможных путей избегания опухолью ответа на лечение и вовлечение в диагностический арсенал дополнительных молекулярных маркеров, характеризующих эволюцию опухолевого клона.

Мисюрин Андрей Витальевич

[and@genetechnology.ru](mailto:and@genetechnology.ru)

+7 499 530 01 95