ABL KINASE DOMAIN MUTATIONS IN NAÏVE AND MOLECULARLY TREATED CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS WITH *BCR-ABL* REARRANGEMENT

WANWISA WONGBOONMA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (IMMUNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2011

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

ABL KINASE DOMAIN MUTATIONS IN NAÏVE AND MOLECULARLY TREATED CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS WITH *BCR-ABL* REARRANGEMENT

WANWISA WONGBOONMA 4937146 SIIM/M

M.Sc. (IMMUNOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: CHIRAYU AUEWARAKUL, M.D., Ph.D.,
WANNA THONGNOPPAKHUN, Ph.D.

ABSTRACT

ABL kinase domain (KD) mutation is the major mechanism associated with resistance or suboptimal response to tyrosine kinase inhibitors (TKI) in *BCR-ABL*-positive chronic myeloid leukemia (CML) patients. At present, no data currently exists with respect to the KD mutations in the Southeast Asian CML patients. The frequencies and types of mutations were determined in patients undergoing 1st generation (imatinib) and/or 2nd generation (nilotinib/dasatinib) TKI therapy. This study also asked if the KD mutations could be detected in the naïve CML cases without prior drug exposure. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) was selected as a mutation screening method in patient samples with wild-type and known KD mutated cell lines used as controls. Direct sequencing was performed when an abnormal DHPLC profile was observed. In addition, a single-tube allele specific-polymerase chain reaction (AS-PCR) was developed to specifically detect T315I resistant mutation which is strongly associated with therapeutic failure. Among 171 CML cases (80 naïve, 91 TKI-exposed), 21 types of mutations were discovered in 37 CML patients including 13 known mutations and 8 previously unidentified mutations. Thirty cases had a single mutation while 7 cases had multiple mutations. Twenty-four percent of patients receiving first-line imatinib, 63% of imatinib-resistant patients receiving 2nd generation TKI, and 75% of patients treated with front-line 2nd generation TKI had KD mutations. Interestingly, 9% of TKI-naïve CML patients were also found to carry the mutations (3.7% of newly diagnosed cases and 19.2 % of hydroxyurea-exposed cases). Five novel KD mutations were discovered in the naïve cases and three in the TKI-exposed cases. Mutations in the naïve cases were mainly localized in the C-helix domain and SH3 contact site whereas in the TKI-exposed cases predominantly in the drug contact site, P-loop, and catalytic domain. Overall, the most frequent mutation was T315I (24.3%), which was identified only in the TKI-exposed cases, followed by Y253H, M351T, and G250E. AS-PCR was able to specifically detect T315I mutant bands in the dilution mixtures containing as low as 0.5-1%. The detection sensitivity of DHPLC was 1.5-3% dilution whereas sequencing was unable to detect below 6.25% dilution.

In conclusion: 1) Thirteen known and 8 novel KD mutations were identified in the present study which represents the largest series ever reported from Asia; 2) Various types of sensitive and resistant mutations were detected in the naïve CML patients, suggesting that naturally occurring KD mutations were present in the leukemic cells prior to drug exposure; 3) Mutations in the naïve cases were predominantly localized in the different domains from the TKI-exposed cases and T315I potentially arises as a result of drug exposure as it was completely undetectable in the naïve cases; 4) A single-tube AS-PCR was developed and represents a rapid and sensitive screening method for T315I resistant mutation. Detection of the most resistant leukemic clone in CML patients undergoing TKI therapy should be feasible with this simple and inexpensive method.

KEY WORDS: ABL MUTATION / KD MUTATION / CHRONIC MYELOID LEUKEMIA/
IMATINIB REASITANCE / TKI-NAÏVE CML / SOUTHEAST ASIAN CML

122 pages

Copyright by Mahidol University

การกลายพันธุ์ของ *ABL* KINASE DOMAIN ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิดเรื้อรังที่มีการจัดเรียงใหม่ของยีน *BCR-ABL* ทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับการรักษาในระดับโมเลกุล

ABL KINASE DOMAIN MUTATIONS IN NAÏVE AND MOLECULARLY TREATED CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENTS WITH *BCR-ABL* REARRANGEMENT

วันวิสาข์ วงศ์บุญมา 4937146 SIIM/M

วท.ม. (วิทยาภูมิคุ้มกัน)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : จิรายุ เอื้อวรากุล, M.D., Ph.D., วรรณา ทองนพคุณ, Ph.D.

บทคัดย่อ

การกลายพันธุ์ของยีนเอบีแอลที่บริเวณโดเมนของเอนซัยม์ไคเนส (KD) เป็นสาเหตุหลักของการดื้อต่อยามุ่งเป้ายับยั้งธัยโรซีนไคเนส (TKI) ในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวมัยอีลอยด์ชนิดเรื้อรัง (ซีเอ็มแอล) ที่มียีนลูกผสมบีซีอาร์-เอบีแอล ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงการกลายพันธุ์ดังกล่าวในชาวเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความชุกและชนิดของการกลายพันธุ์ของยีนเอบีแอลที่บริเวณ KD ทั้งในผู้ป่วยที่ได้รับยาอิมาทินิบ และ/หรือยาระดับสองที่มีระดับความแรงมากกว่า ได้แก่ นิโลทินิบและดาซาทินิบ รวมทั้งต้องการตอบคำถามว่า ผู้ป่วยที่ยังไม่เคยได้รับยาประเภทนี้มาก่อนจะมีการกลายพันธุ์ของยีนเอบีแอลอยู่แล้วหรือไม่ โดยเลือกใช้วิธี denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) ที่มีความไวสูงในการตรวจคัดกรองการกลายพันธุ์ และใช้เซลล์ปกติและเซลล์ที่ทราบว่ามีการกลายพันธุ์แน่นอนเป็นตัวควบคุม ผู้ป่วยที่ตรวจพบความผิดปกติโดยวิธี DHPLC จะได้รับการตรวจยืนยันด้วยวิธีตรวจลำดับเบส (direct sequencing) พร้อมกันนี้ได้ริเริ่มพัฒนาวิธีตรวจ allele specific-polymerase chain reaction (AS-PCR) ในหลอดเดียวกัน (single-tube) เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง T315I ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการดื้อยาอย่างรุนแรงและนำไปสู่การรักษาที่ล้มเหลว การศึกษานี้ได้ทำการตรวจคัดกรองผู้ป่วยมะเร็งชนิดซีเอ็มแอลทั้งหมด 171 คน โดยเป็นผู้ป่วยที่ยังไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยามุ่งเป้าจำนวน 80 คน และผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาด้วยยาแล้วจำนวน 90 คน โดยสามารถพบการกลายพันธุ์ได้ถึง 21 ชนิดในผู้ป่วย 37 คน ประกอบด้วย 13 ชนิดที่เคยมีรายงานมาก่อน และ 8 ชนิดที่เป็นแบบใหม่ ผู้ป่วย 30 รายมีการกลายพันธุ์ในหนึ่งตำแหน่ง และผู้ป่วย 7 รายมีการกลายพันธุ์มากกว่าหนึ่งตำแหน่ง ทั้งนี้ตรวจพบการกลายพันธุ์ในร้อยละ 24 ของผู้ป่วยที่ได้รับยาอิมาทินิบ ร้อยละ 63 ของผู้ป่วยที่ดื้อยาอิมาทินิบ แล้วเปลี่ยนเป็นยาระดับที่สอง และร้อยละ 75 ของผู้ป่วยที่ได้รับยาระดับที่สองตั้งแต่แรก นอกจากนี้ ร้อยละ 9 ของผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยาก็พบการกลายพันธุ์เช่นกัน (ร้อยละ 3.7 ของผู้ป่วยรายใหม่ก่อนการรักษาใดๆ และ ร้อยละ 19.2 ของผู้ป่วยที่เคยรักษาด้วยยาเคมีบำบัดกลุ่มฮัยดรอกซียูเรีย) การกลายพันธุ์ชนิดใหม่ 8 ชนิดแบ่งเป็น 5 ตำแหน่งใหม่ที่เกิดในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยามุ่งเป้าและ 3 ตำแหน่งใหม่ที่เกิดในผู้ป่วยที่เคยได้รับยามุ่งเป้า การกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยามุ่งเป้าส่วนใหญ่อยู่บนตำแหน่ง C-helix และ SH3 contact site ส่วนผู้ป่วยที่เคยได้รับยามุ่งเป้าส่วนใหญ่อยู่บริเวณ drug contact site บริเวณ P-loop และ catalytic domain ชนิดการกลายพันธุ์ที่พบบ่อยสุดได้แก่ T315I (ร้อยละ 24.3) ซึ่งพบเฉพาะในผู้ป่วยที่เคยได้รับยามุ่งเป้า ตามมาด้วยชนิด Y253H, M351T และ G250E วิธี AS-PCR ที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจหาการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง T315I ได้ที่ระดับความไวร้อยละ 0.5-1 โดยวิธี DHPLC มีความไวประมาณร้อยละ 1.5-3 และวิธีตรวจลำดับเบสมีความไวร้อยละ 6.25

โดยสรุป 1) ได้ตรวจพบการกลายพันธุ์ที่เคยมีรายงานมาก่อน 13 ชนิด และพบชนิดใหม่อีกถึง 8 ชนิด โดยการศึกษานี้จัดเป็นการศึกษาขนาดใหญ่ที่สุดในทวีปเอเชีย; 2) พบการกลายพันธุ์ทั้งชนิดดื้อยาและไม่ดื้อยา ในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับการรักษาด้วยยามุ่งเป้า บ่งชี้ว่าการกลายพันธุ์ของยีนเอบีแอลที่บริเวณโดเมนของเอนซัยม์ไคเนส สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติตั้งแต่ก่อนได้รับการรักษาใดๆ; 3) ตำแหน่งของการกลายพันธุ์ในผู้ป่วยที่ยังไม่เคยได้รับยาส่วนใหญ่อยู่บนตำแหน่งที่ต่างจากที่พบในผู้ป่วยที่ได้รับยาแล้ว การเกิดการกลายพันธุ์ชนิดดื้อยารุนแรง T315I น่าจะเป็นผลของการได้รับยามุ่งเป้าโดยตรง เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ดังกล่าวในผู้ป่วยกลุ่มที่ไม่เคยได้รับยามุ่งเป้ามาก่อน; 4)การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีตรวจ AS-PCR ในหลอดเดียวกัน เพื่อตรวจหาการกลายพันธุ์ชนิดดื้อยารุนแรง T315I โดยพบว่าวิธีดังกล่าวมีความไวสูง รวดเร็ว จัดเป็นวิธีที่มีราคาถูก และทำได้ง่ายทั่วไป จึงเหมาะสมกับการใช้ตรวจวินิจฉัยการกลายพันธุ์ชนิดที่มีการดื้อยารุนแรงที่สุดในผู้ป่วยซีเอ็มแอลที่กำลังได้รับการรักษาด้วยยามุ่งเป้ายับยั้งธัยโรซีนไคเนส

122 หน้า

Copyright by Mahidol University