

Zjawisko presji selekcyjnej przy stosowaniu inhibitorów kinazy tyrozynowej BCR-ABL1 u chorych na przewlekłą białaczkę szpikową: analiza problemu na podstawie przypadku

Selection pressure phenomenon during treatment of chronic myeloid leukemia patients with BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors: problem analysis on the basis of case report

Krzysztof Lewandowski, Anna Wache

Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego,
Uniwersytet Medyczny, Poznań

Streszczenie

Mimo ogromnego postępu związanego z wprowadzeniem do terapii chorych na przewlekłą białaczkę szpikową (CML) inhibitorów kinazy tyrozynowej (TKI) u około 15% pacjentów stwierdza się oporność na leczenie I linii za pomocą imatynibu (IM). Jest ona w około 40% przypadków związana z obecnością mutacji w obrębie domeny kinazowej BCR-ABL1 (KD BCR-ABL1). Część defektów jest oporna na IM, a jego stosowanie prowadzi do selekcji klonów opornych niewrażliwych także na TKI II generacji (dazatynib, nilotynib). W pracy przedstawiono przebieg choroby u pacjentki z CML w fazie przewlekłej, u której z powodu oporności na IM podjęto leczenie nilotynibem. Stosowanie leku doprowadziło do uzyskania większej odpowiedzi cytogenetycznej, a następnie jej utraty, w wyniku obecności mutacji Y253H KD BCR-ABL1. Zmiana inhibitora II generacji na dazatynib pozwoliła uzyskać całkowitą odpowiedź hematologiczną po 3 miesiącach terapii. Niestety, wkrótce potem rozpoznano fazę akceleracji choroby i potwierdzono obecność innej mutacji F317L KD BCR-ABL1. Przebieg choroby u wspomnianej chorej był podstawą do podjęcia dyskusji dotyczącej zjawiska presji selekcyjnej związanego ze stosowaniem TKI u chorych z CML.

Słowa kluczowe: przewlekła białaczka szpikowa, inhibitory kinazy tyrozynowej BCR-ABL1, selekcja klonalna, presja selekcyjna, terapia sekwencyjna

Hematologia 2010; 1, 3: 261–266

Abstract

Despite a great progress related to the introduction of tyrosine kinase inhibitors (TKI) to the therapy of patients with chronic myeloid leukemia (CML), resistance to the first-line treatment with imatinib (IM) is diagnosed in about 15% of patients. In about 40% of cases it is related to the presence of mutations affecting kinase domain of BCR-ABL1 (KD BCR-ABL1). Some

Adres do korespondencji: Krzysztof Lewandowski, Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego, Uniwersytet Medyczny, Poznań, ul. Szamarzewskiego 84, 60–569 Poznań,
e-mail: krzysztof.lewandowski@skpp.edu.pl

defects are IM-resistant and its further administration leads to the selection of resistant clones, insensitive also to the 2nd generation TKIs (dasatinib, nilotinib). This paper focuses on medical history of patient diagnosed with CML in the chronic phase in whom nilotinib treatment was started due to the appearance of IM-resistance. Administration of nilotinib allowed to obtain major cytogenetic response and, subsequently, its loss due to the emergence of Y253H mutation within KD BCR-ABL1. Substitution of the 2nd generation drug to dasatinib allowed to obtain complete hematological response after 3 months of treatment. Unfortunately, the acceleration phase of the disease and the presence of another F317L mutation of KD BCR-ABL1 were documented thereafter. Disease outcome in the presented case was the reason for undertaking a discussion about selection pressure phenomenon related to TKI administration in patients with CML.

Key words: chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors, clonal selection, selection pressure, sequential therapy

Hematologia 2010; 1, 3: 261–266

Wprowadzenie

Poznanie patogenezы przewlekłej białaczki szpikowej (CML, *chronic myeloid leukemia*) umożliwiło opracowanie leków celowanych molekularnie. Stało się to możliwe po odkryciu translokacji (9;22)(q34;q11) obecnej u pacjentów z CML oraz odpowiadającego jej genu fuzyjnego *BCR-ABL1* kodującego białko o aktywności kinazy tyrozynowej. Wprowadzenie do leczenia inhibitorów kinazy tyrozynowej (TKI, *tyrosine kinase inhibitor*) BCR-ABL1 I generacji (imatynibu [IM, *imatinib*]) oraz II generacji (nilotynibu, dazatynibu) było przełomem w leczeniu CML [1, 2]. Miejsce TKI w leczeniu CML ostatecznie potwierdziły wyniki badania IRIS (*International Randomized Study of Interferon and STI71*). Wykazano w nich, że zastosowanie IM w dawce 400 mg na dobę u pacjentów z CML w fazie przewlekłej (CP, *chronic phase*) prowadzi do całkowitej odpowiedzi hematologicznej (CHR, *complete hematological response*) u 96% chorych. Okazało się także, że u 76% pacjentów można uzyskać całkowitą odpowiedź cytogenetyczną (CCyR, *complete cytogenetic response*), rozumianą jako zmniejszenie liczby komórek szpiku z obecną t(9;22)(q34;q11) poniżej 1% w warunkach hodowli *in vitro*. W badaniu IRIS jednoznacznie potwierdzono także znaczną poprawę odległych wyników leczenia — po 72-miesięcznej obserwacji przebiegu terapii okazało się, że przeżycie wolne od zdarzeń (EFS, *event free survival*) i przeżycie całkowite (OS, *overall survival*) wynoszą odpowiednio 83% i 88% [3].

Mimo ogromnego postępu związanego z wprowadzeniem TKI do terapii chorych z CML, u niewielkiej części pacjentów stwierdza się oporność na leczenie. Przyczyny tego zjawiska są złożone. Jednym z możliwych powodów pojawienia się oporności na

TKI jest obecność mutacji w obrębie sekwencji kodującej strukturę aminokwasową domeny kinazowej (KD, *kinase domain*) kinazy tyrozynowej BCR-ABL1 (KD BCR-ABL1, *kinase domain of BCR-ABL1*) lub wykształcenie w komórkach macierzystych CML niezależnych od BCR-ABL1 szlaków przekazywania sygnału proliferacyjnego, w tym między innymi przez kinazy Lyn lub Hck [4–6]. Przyczyną oporności może być także, postulowana przez licznych autorów, niewrażliwość komórek macierzystych CML na TKI. Według aktualnych danych część komórek macierzystych CML jest w stanie „uśpienia” i pozostaje niewrażliwa na stosowanie TKI. Wykazują ponadto zdolność podtrzymywania funkcji życiowych dzięki sprawności innych mechanizmów homeostatycznych [7]. Potwierdzeniem tej hipotezy jest obserwacja, że u części pacjentów nawet po uzyskaniu remisji molekularnej choroby po około 3 miesiącach od zaprzestania leczenia TKI dochodzi do klinicznie jawnej wznowy [8].

Nie można także wykluczyć, że u chorych na CML pula komórek macierzystych z t(9;22)(q34;q11) nie jest jednorodna pod względem towarzyszących zaburzeń cytogenetycznych i molekularnych. Z tego powodu po włączeniu TKI można preferencyjnie selekcjonować klony odporne na TKI. Potwierdzeniem tej hipotezy są obserwacje poczynione u chorych przed rozpoczęciem terapii TKI oraz w trakcie terapii sekwencyjnej za pomocą TKI II generacji. Wykazano w nich, że u części osób z opornością mutacyjną na IM defekty molekularne odpowiedzialne za niepowodzenie terapii są obecne w niewielkiej ilości komórek BCR-ABL1(+) już przed rozpoczęciem leczenia [9] oraz że u pacjentów leczonych sekwencyjnie TKI z różną częstością dochodzi do pojawienia się określonych mutacji KD BCR-ABL1 [10].

U części pacjentów opornych na IM (zarówno z opornością mutacyjną, jak i niemutacyjną), a następnie nilotynib najczęściej stwierdza się obecność mutacji KD BCR-ABL1 w pozycjach aminokwasowych 253, 255, 359 oraz 311. Natomiast u chorych opornych na IM i dazatynib najczęstszą przyczyną niepowodzenia terapii jest obecność mutacji KD BCR-ABL1 prowadząca do substytucji pozycji aminokwasowej V299L oraz V317L [11]. Przyczyna preferencyjnego występowania określonych mutacji u chorych na CML leczonych sekwencyjnie TKI nie jest do końca poznana. Stwarza jednak lekarzom prowadzącym terapię rzeczywiste trudności w wyborze TKI II generacji [12].

Poniżej przedstawiono przypadek pacjentki, u której oporność na IM była powodem wdrożenia terapii sekwencyjnej nilotynibem, a następnie dazatynibem. Zastosowanie nilotynibu doprowadziło do wyselekcjonowania klonu Y253H, a dazatynibu — do zaniku klonu Y253H i powstania/selekcji klonu z mutacją F317L KD BCR-ABL1, niewrażliwego na działanie tego leku. Przypadek ten dokumentuje diagnostyczne i terapeutyczne implikacje zjawiska presji selekcyjnej u chorych z CML w przypadku stosowania TKI w sposób sekwencyjny.

Opis przypadku

Chora w wieku 68 lat, z rozpoznaniem CML w fazie przewlekłej (wskaźnik Sokala > 1,2) ustalonym w czerwcu 1998 roku, w latach 1998–2001 była leczona interferonem α (IFN α) — początkowo w dawce 5 mln jm./m², a następnie, po uzyskaniu remisji hematologicznej, w dawce 3 mln jm./m². W ocenie klinicznej, przeprowadzonej w listopadzie 2001 roku, potwierdzono utratę CHR (liczba płytek > 1000 G/l) przy obecności w badaniu cytogenetycznym szpiku 89% metafaz z translokacją t(9;22)(q34;q11). Z tego powodu odstawiono IFN α i włączono leczenie cytotoredukcyjne hydroksykarbamidem w dawce 50 mg/kg mc. doustnie, które kontynuowano przez 18 miesięcy. W 2003 roku chorą zakwalifikowano do leczenia IM, początkowo w dawce 400 mg na dobę. Większą odpowiedź cytogenetyczną (MCyR, *major cytogenetic response*), która była maksymalną odpowiedzią na leczenie obserwowaną u tej chorej, uzyskano po pierwszych 6 miesiącach terapii — 28% metafaz z obecną t(9;22)(q34;q11).

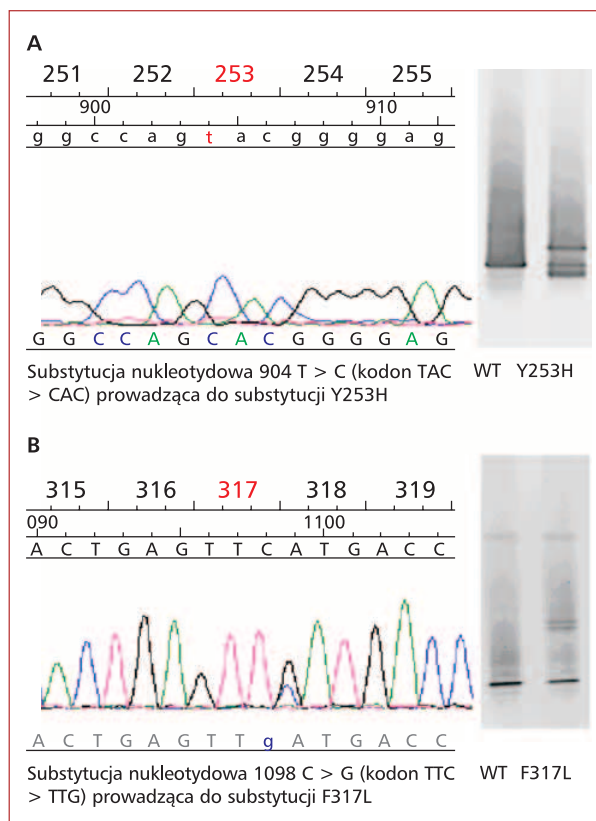
W ocenie przeprowadzonej po kolejnych 12 miesiącach stosowania IM stwierdzono utratę MCyR — 44% metafaz z obecną t(9;22)(q34;q11). Z tego powodu dawkę IM zwiększono do 600 mg na dobę. Leczenie IM ostatecznie zakończono w 2006 roku z powodu dalszej progresji choroby — 100% analizowanych metafaz z obecną t(9;22)(q34;q11).

Ze względu na nadpłytkowość (1200 G/l) ponownie włączono leczenie cytotoredukcyjne hydroksykarbamidem, a następnie, z powodu braku satysfakcjonującego zmniejszenia liczby płytek krwi — anagrelidem.

W lutym 2007 roku chorą zakwalifikowano do terapii nilotynibem w ramach badania klinicznego. Lek stosowano w dawce 2 razy 400 mg na dobę, doustnie. W trakcie terapii obserwowano objawy toksyczności wątrobowej leku (stopień 2/3) według NCCI (*National Cancer Center Institute*). Maksymalną odpowiedź na leczenie w postaci MCyR uzyskano w lutym 2008 roku — 14,5% metafaz z obecną t(9;22)(q34;q11). Niestety, w sierpniu 2008 roku potwierdzono jej utratę. W wykonanym wówczas badaniu kariotypu wykazano ponadto progresję cytogenetyczną: mos46,XX,t(9;22)(q34;q11)[16]/47,XX,+8[4]/46,XX[5]. Zgodnie z protokołem badania pacjentkę wyłączono z próby klinicznej z powodu utraty odpowiedzi cytogenetycznej i klinicznej w listopadzie 2008 roku.

Wykonana w tym czasie szczegółowa ocena przyczyn oporności na nilotynib wykazała obecność mutacji Y253H w obrębie KD BCR-ABL1 (ryc. 1.A). Z tego powodu w styczniu 2009 roku zdecydowano o wdrożeniu leczenia dazatynibem, początkowo w dawce 100 mg na dobę, a następnie — z powodu wystąpienia objawów toksyczności hematologicznej (liczba płytek = 9 G/l) — w dawce zmniejszonej do 80 mg na dobę. W związku z utrzymującą się małą płytkowością, wymagającą okresowej substytucji koncentratu krwinek płytkowych, lek czasowo odstawiono (na 4 tyg.). W kwietniu 2009 roku ponownie włączono dazatynib w dawce 80 mg, uzyskując CHR po 6 tygodniach. Przeprowadzona w tym czasie ilościowa ocena molekularna wykazała 37% kopii BCR-ABL1/c-ABL^{IS}. Progu większej odpowiedzi molekularnej (MMoR, *major molecular response*) nie osiągnięto także w czasie kolejnych 6 miesięcy terapii (BCR-ABL1/c-ABL^{IS} w lipcu i październiku 2009 r., odpowiednio: 60% i 37%).

W listopadzie 2009 roku doszło u chorej do utraty CHR (liczba płytek = 493 G/l). Niestety, ponowne zwiększenie dawki dazatynibu do 100 mg na dobę, przy dobrej tolerancji leczenia, również nie przyniosło poprawy. W marcu 2010 roku rozpoznano drugą fazę akceleracji — 13% mieloblastów w rozmazie krwi obwodowej, liczba płytek równa 700 G/l, 100% metafaz z obecną t(9;22)(q34;q11). W badaniu sekwencji KD BCR-ABL1 nie potwierdzono obecności mutacji Y253H. Wykazano natomiast obecność zmiany F317L (region wiążący adenosynotrifosforan [ATP, *adenosine triphosphate*]) (ryc. 1.B). Z tego powodu, na podstawie analizy tabel wrażliwości poszczególnych mutantów



Rycina 1. Ocena obecności mutacji w obrębie sekwencji kodującej strukturę domeny kinazowej kinazy tyrozynowej BCR-ABL1 techniką bezpośredniego sekwencjonowania oraz elektroforezy w żelu o podwójnym gradencie denaturacji i gęstości u chorej z przewlekłą białaczką szpikową, z niepowodzeniem terapii imatynibem i stwierdzoną opornością mutacyjną na nilotinib (Y253H) (A) i dasatinib (F317L) (B); WT — typ dziki, obraz rozdziału elektroforetycznego fragmentu niezawierającego mutacji; Y253H — obraz tworzących się homo- i heterodupleksów w chwili stwierdzenia oporności na nilotinib; F317L — obraz tworzących się homo- i heterodupleksów w chwili stwierdzenia oporności na dasatinib

Figure 1. The estimation of presence of mutations in the sequence encoding the structure of kinase domain of BCR-ABL1 using direct sequencing techniques and double-gradient denaturing electrophoresis in a patient with chronic myeloid leukemia after imatinib therapy failure and mutational resistance to nilotinib (Y253H) (A) and dasatinib (F317L) (B); WT — wild type, electrophoresis of the fragment without mutation; Y253H — homo- and heteroduplexes formation upon resistance to nilotinib; F317L — homo- and heteroduplexes formation upon resistance to dasatinib

KD BCR-ABL1 w warunkach *in vitro* (IC₅₀ — stężenie leku hamujące aktywność kinazy do 50%), zdecydowano o ponownym włączeniu terapii nilotinibem w dawce 2 razy 400 mg na dobę, doustnie. Ponowna ocena hematologiczna, przeprowadzona w maju 2010 roku, potwierdziła CHR (liczba płytek = 90 G/l).

Dyskusja

U chorych na CML potwierdzono występowanie niestabilności genomowej. Postuluje się, że jest ona głównie wynikiem ekspozycji komórek CML na patologicznie wysoką aktywność kinazy tyrozynowej BCR-ABL1. Jej skutkiem jest generacja dużej ilości wolnych rodników uszkadzających DNA [13]. Pośredniczona przez kinazę BCR-ABL1 generacja wolnych rodników oraz upośledzona regulacja procesów naprawy DNA są odpowiedzialne za mutacyjny fenotyp komórek CML i ich niestabilność genomową. Molekularnym wykładnikiem niestabilności genetycznej komórek CML jest występowanie mutacji BCR-ABL1 i dodatkowych zaburzeń cytogenetycznych [14–16].

Wydaje się, że częstość aberracji molekularnych w komórkach CML zależy od okresu narażenia na wysoką aktywność kinazy tyrozynowej BCR-ABL1. Potwierdzeniem tej hipotezy są dane dotyczące częstości mutacji KD BCR-ABL1 u chorych w chwili rozpoznania oraz u wcześniej leczonych osób — wykazano w nich, że jedynie u części pacjentów można za pomocą czułych testów molekularnych wykazać obecność mutacji KD BCR-ABL1 w okresie przed rozpoczęciem leczenia IM [17]. Częstość ich występowania jest natomiast znacząco wyższa u chorych w CP ze stwierdzoną opornością na IM — dowiedziono, że są one obecne u 27% badanych osób w CP, u 14% pacjentów, u których IM był stosowany w I linii terapii oraz u 31% chorych opornych na IM, którzy uprzednio doświadczyli niepowodzenia terapii IFN α . Defekty molekularne KD BCR-ABL1 szczególnie często dotyczą osób w bardziej zaawansowanych stadiach choroby — ich obecność stwierdzono odpowiednio u: 52%, 75% i 83% pacjentów w fazie akceleracji, przełomów mieloblastycznego i limfoblastycznego [18].

Jednym z badań dobrze dokumentujących częstość występowania mutacji u chorych z CML leczonych IM jest badanie IRIS. W próbie tej po 5 latach leczenia oporność na IM potwierdzono u 14% pacjentów [19]. Po wykluczeniu wielu innych przyczyn oporności, w tym między innymi nadmiernej ekspresji BCR-ABL1, obniżenia wewnątrzkomórkowego stężenia leku w mechanizmie zależnym od organicznego transportera kationów typu 1 (OCT-1, *organic cation transporter 1*) czy też nadmiernej ekspresji kinaz Src zaangażowanych w niezależną od BCR-ABL1 aktywację innych szlaków przekazywania sygnału (w tym przez kinazy Lyn i Hck), okazało się, że 40% przypadków oporności to wynik obecności mutacji KD BCR-ABL1 prowadzących do substytucji aminokwasowych upośledzających wiązanie IM [20, 21].

Jak dotąd zidentyfikowano ponad 70 różnych mutacji KD BCR-ABL1 u chorych leczonych TKI. Szczegółowa analiza lokalizacji wymienionych mutacji wykazała, że około 40% z nich jest zlokalizowanych w obrębie pętli wiążącej ATP, 25% dotyczy Thr315, 25% — pętli katalitycznej, a 5% — sekwencji aminokwasowej pętli aktywacyjnej [22–24]. Około 50 spośród wymienionych mutacji KD BCR-ABL1 odpowiada za oporność na IM. W badaniach eksperymentalnych potwierdzono, że największy stopień oporności na IM wykazują mutanty Y253F/H oraz E255K/V [24, 25].

Obecność jednej z wyżej wymienionych mutacji (Y253H) potwierdzono u prezentowanej chorej w chwili utraty MCyR w trakcie leczenia nilotynibem, po uprzednim niepowodzeniu terapii za pomocą IFN α i IM. Dane dotyczące wrażliwości poszczególnych mutantów BCR-ABL1 na TKI wskazują, że obecność mutacji Y253H prowadzi do zniesienia wrażliwości na IM ($IC_{50} > 6400$ nM), umiarkowanej wrażliwości na nilotynib (IC_{50} nilotynibu 450 nM), nie wpływając na efekt inhibitorowy dazatynibu [24]. U przedstawianej chorej klon komórek CML z mutacją Y253H prawdopodobnie nie był klonem dominującym przed rozpoczęciem leczenia IM, a także w chwili podjęcia terapii nilotynibem. Może o tym świadczyć dobra początkowa odpowiedź na zastosowanie leczenia (uzyskanie CHR, a następnie MCyR). Nie można jednak wykluczyć, że jej pojawienie się było wynikiem hamowania przez nilotynib wzrostu klonów komórek CML, z mutacjami BCR-ABL1 wrażliwymi na lek i bez nich, co doprowadziło do propagowania wzrostu klonów komórkowych z silną ekspresją kinaz Src lub innych kinaz odpowiedzialnych za niezależną od BCR-ABL1 proliferację oraz klonów komórek CML z mutacjami opornymi na lek II generacji (presja selekcyjna TKI). Potwierdzeniem wystąpienia selekcji klonalnej u opisanej pacjentki wydaje się także wystąpienie mozaicyzmu w badaniu kariotypu w chwili utraty odpowiedzi na nilotynib. Hipotezę tą uwiarygodniają dane Shah i wsp. [26], a także Breccia i wsp. [10] potwierdzające występowanie zjawiska selekcji klonów komórek CML opornych na lek w trakcie terapii sekwencyjnej za pomocą TKI II generacji.

W świetle dostępnych danych zjawisko presji selekcyjnej jest szczególnie wyraźne w przypadku stosowania TKI w sposób sekwencyjny. Spostrzeżenia te potwierdzają obserwacje własne autora dotyczące prezentowanej pacjentki, u której zastosowanie nilotynibu w związku z opornością IM doprowadziło do wyselekcjonowania klonu Y253H, a dazatynibu — do zaniku klonu Y253H i powsta-

nia/selekcji klonu z mutacją F317L KD BCR-ABL1, niewrażliwego na działanie leku i wrażliwego na efekt inhibitorowy nilotynibu. Wydaje się, że zjawisko presji selekcyjnej w przypadku sekwencyjnego stosowania TKI może mieć istotne implikacje terapeutyczne — nie można wykluczyć, że u wybranych chorych z opornością mutacyjną na IM jedynie jednoczesne zastosowanie dwóch TKI II generacji umożliwi uzyskanie trwałej poprawy hematologicznej, cytogenetycznej, a także molekularnej [27].

Piśmiennictwo

1. Kantarjian H., Sawyers C., Hochhaus A. i wsp. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 645–652.
2. Jabbour E., Jones D., Kantarjian H.M. i wsp. Long-term outcome of patients with chronic myeloid leukemia treated with second-generation tyrosine kinase inhibitors after imatinib failure is predicted by the in vitro sensitivity of BCR-ABL kinase domain mutations. *Blood* 2009; 114: 2037–2043.
3. Hochhaus A., O'Brien S.G., Guilhot F. i wsp. IRIS Investigators. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1054–1061.
4. Shah N.P., Nicoll J.M., Nagar B. i wsp. 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: 117–125.
5. Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.S. i wsp. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002; 16: 2190–2196.
6. Pene-Dumitrescu T., Smithgall T.E. Expression of a SRC-family kinase in CML cells induces resistance to imatinib in a kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 21446–21457.
7. Naka K., Hoshii T., Hirao A. Novel therapeutic approach to eradicate tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Cancer Sci.* 2010, Apr 5 [artykuł dostępny *on-line*].
8. Quintás-Cardama A., Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1 positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009; 113: 1619–1630.
9. Lange T., Park B., Willis S.G., Deininger M.W. BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia not quite enough to cause resistance to imatinib therapy? *Cell Cycle* 2005; 12: 1761–1766.
10. Breccia M., Frustaci A.M., Cannella L. i wsp. Sequential development of mutant clones in an imatinib resistant chronic myeloid leukaemia patient following sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors: an emerging problem? *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2009; 64: 195–197.
11. Cortes J., Jabbour E., Kantarjian H. i wsp. Dynamics of BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia after sequential treatment with multiple tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2007; 110: 4005–4011.
12. Branford S., Melo J.V., Hughes T.P. i wsp. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? *Blood* 2009; 114: 5426–5435.

13. Nowicki M.O., Falinski R., Koptyra M. i wsp. BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* 2004; 104: 3746–3753.
14. Koptyra M., Falinski R., Nowicki M.O. i wsp. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 2006; 108: 319–327.
15. Canitrot Y., Lautier D., Laurent G. i wsp. Mutator phenotype of BCR-ABL transfected Ba/F3 cell lines and its association with enhanced expression of DNA polymerase beta. *Oncogene* 1999; 18: 2676–2680.
16. Cortes J., O'Dwyer M.E. Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2004; 18: 671–684.
17. Roche-Lestienne C., Preudhomme C. Mutations in the ABL kinase domain pre-exist the onset of imatinib treatment. *Semin. Hematol.* 2003; 40 (supl. 2): 80–82.
18. Soverini S., Colarossi S., Gnani A. i wsp. GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. 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: 7374–7379.
19. Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G. i wsp. IRIS Investigators five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2408–2417.
20. Apperley J.F. Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia (part I and II). *Lancet Oncol.* 2007; 8: 1018–1029.
21. Hochhaus A., Erben P., Ernst T., Mueller M.C. Resistance to targeted therapy in chronic myelogenous leukemia. *Semin. Hematol.* 2007; 44 (supl. 1): S15–S24.
22. Deininger M., Buchdunger E., Druker B.J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2005; 105: 2640–2653.
23. Corbin A.S., La Rosee P., Stoffregen E.P., Druker B.J., Deininger M.W. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003; 101: 4611–4614.
24. O'Hare T., Walters D.K., Stoffregen E.P. i wsp. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res.* 2005; 65: 4500–4505.
25. Redaelli S., Piazza R., Rostagno R. i wsp. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27: 469–471.
26. Shah N.P., Skaggs B.J., Branford S. i wsp. Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 2562–2569.
27. Carella A.M. Hypothesis: upfront use of ABL kinase inhibitor combination, either simultaneously or sequentially, in high-risk Ph+ leukemias? *Ann. Hematol.* 2010; 89: 531–533.