

# ОЦЕНКА ОТНОСИТЕЛЬНОЙ АЛЛЕЛЬНОЙ НАГРУЗКИ МУТАЦИЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ИБРУТИНИБУ В ГЕНЕ *ВТК* МЕТОДОМ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНОЙ ПЦР У БОЛЬНЫХ С ПРОГРЕССИЕЙ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Ликольд Е. Б.<sup>1\*</sup>, Бидерман Б. В.<sup>1</sup>, Февралева И. С.<sup>1</sup>, Северина Н. А.<sup>1</sup>, Дмитриева Е. А.<sup>2</sup>, Петренко А. А.<sup>2,3</sup>, Никитин Е. А.<sup>2,3</sup>, Сударииков А. Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы, 125284, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125993, Москва, Россия

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Ибрутиниб является эффективным препаратом для лечения рецидивирующего, рефрактерного хронического лимфолейкоза (ХЛЛ). У большей части больных ХЛЛ ибрутиниб вызывает стойкие ремиссии, однако у части больных происходит прогрессия заболевания. Рефрактерность к ибрутинибу в большинстве случаев связана с мутацией C481S, что соответствует заменам с.1441T>A и с.1442G>C в гене *ВТК*, однако встречаются и другие варианты мутаций гена в этом положении.

**Цель** — оценить относительную аллельную нагрузку мутаций устойчивости к ибрутинибу в гене *ВТК* у больных с прогрессией ХЛЛ при помощи разработанной тест-системы на основе аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР) в режиме реального времени.

**Материалы и методы.** В исследование был включен материал от 102 больных ХЛЛ: 39 больных ХЛЛ с прогрессией заболевания на фоне терапии ибрутинибом, 24 больных с прогрессией после терапии по протоколам «FCR/FCR-lite», 38 больных ХЛЛ до начала лечения. Группа контроля включала в себя 118 больных неопухолевыми гематологическими заболеваниями.

**Результаты.** С помощью АС-ПЦР у 20 из 39 больных ХЛЛ с прогрессией на фоне терапии ибрутинибом была выявлена мутация с.1442G>C. У 2 больных была выявлена мутация с.1442G>T. У 1 больного были обнаружены одновременно две мутации: с.1441T>A и с.1442G>C, у 1 больного — сочетание 3 мутаций: с.1442G>C, с.1442G>T и с.1442G>A. У 15 больных с прогрессией на терапии ибрутинибом мутаций в гене *ВТК* выявлено не было. В группах больных ХЛЛ без предварительного лечения, после режимов «FCR/FCR-lite» и в контрольной группе больных неопухолевыми заболеваниями мутаций в гене *ВТК* выявлено не было.

**Заключение.** Определена относительная аллельная нагрузка мутаций устойчивости к ибрутинибу в 15-м экзоне гена *ВТК* у больных с прогрессией ХЛЛ с помощью разработанной тест-системы на основе АС-ПЦР в режиме реального времени. У 50 % больных наблюдалась одна мутация, у 5 % — две мутации, у 2,5 % — три мутации в гене *ВТК*. Своевременное выявление мутаций гена *ВТК* до клинического рецидива может быть основанием для изменения тактики лечения. Поскольку клинические проявления устойчивости к ибрутинибу проявляются в среднем через 1–2 года, предлагается проводить мониторинг мутаций и определение относительной аллельной нагрузки каждые 3 месяца у больных ХЛЛ до рецидива при лечении ибрутинибом.

**Ключевые слова:** хронический лимфолейкоз, ибрутиниб, *ВТК*, мутации, аллель-специфичная полимеразная цепная реакция

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** исследование не имело спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Ликольд Е.Б., Бидерман Б.В., Февралева И.С., Северина Н.А., Дмитриева Е.А., Петренко А.А., Никитин Е.А., Сударииков А.Б. Оценка относительной аллельной нагрузки мутаций устойчивости к ибрутинибу в гене *ВТК* методом аллель-специфичной ПЦР у больных с прогрессией хронического лимфолейкоза. Гематология и трансфузиология. 2023; 68(2): 182–194. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-68-2-182-194>

# EVALUATION OF THE RELATIVE ALLELIC LOAD OF MUTATIONS OF RESISTANCE TO IBRUTINIB IN THE *BTK* GENE BY ALLELE-SPECIFIC PCR IN PATIENTS WITH PROGRESSION OF CLL

Likold E. B.<sup>1\*</sup>, Biderman B. V.<sup>1</sup>, Fevraleva I. S.<sup>1</sup>, Severina N. A.<sup>1</sup>, Dmitrieva E. A.<sup>2</sup>, Petrenko A. A.<sup>2,3</sup>, Nikitin E. A.<sup>2,3</sup>, Sudarikov A. B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Botkin City Clinical Hospital of the Moscow Health Department, 125284, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 125993, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

**Introduction.** Currently, Ibrutinib is one of the most effective drugs for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia treatment. In most patients with CLL, ibrutinib causes persistent remissions, but in some patients the disease progresses. Ibrutinib resistance in most cases is associated with the C481S mutation, which corresponds to the c.1441T>A and c.1442G>C substitutions in the *BTK* gene, however, other variants also exist.

**Aim** — to evaluate variable allele fraction of the *BTK* gene mutations in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia using the in-house allele-specific real-time PCR test.

**Materials and methods.** The study included material from 102 cases: 39 CLL patients with disease progression on ibrutinib therapy, 24 CLL patients with disease progression on the FCR/FCR-lite protocols, and 38 CLL treatment-naïve patients. The control group included 118 patients with non-neoplastic hematological diseases.

**Results.** Using in-house using AS-PCR, we detected the c.1442G>C mutation in 20 out of 39 CLL patients with progression on ibrutinib therapy. Mutation c.1442G>T was detected in 2 patients. In a single patient, two mutations were detected simultaneously: c.1441T>A and c.1442G>C. Another single patient had a combination of three mutations: c.1442G>C, c.1442G>T and c.1442G>A. In 15 patients with progression on ibrutinib therapy, mutations in the *BTK* gene were not detected. In treatment-naïve CLL patients, in the group treated with FCR/FCR-lite regimens, and in the control group of patients with non-neoplastic diseases, mutations in the *BTK* gene were not detected.

**Conclusion.** Variable allele fraction of exon 15 *BTK* gene mutations in the patients with CLL progression was successfully determined using in-house AS-PCR test: 50 % of patients had one mutation, 5 % had two mutations, and 2.5 % had three mutations in the *BTK* gene. Timely detection of these mutations before clinical recurrence may facilitate effective treatment strategy. Since clinical manifestations of ibrutinib resistance appear after an average of 1–2 years, we suggest monitoring *BTK* mutation load every 3 months in patients with CLL before relapse during treatment with ibrutinib.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia, ibrutinib, *BTK* mutations, Allele-specific polymerase chain reaction

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**Financial disclosure:** the study had no sponsorship.

**For citation:** Likold E.B., Biderman B.V., Fevraleva I.S., Severina N.A., Dmitrieva E.A., Petrenko A.A., Nikitin E.A., Sudarikov A.B. Evaluation of the relative allelic load of mutations of resistance to ibrutinib in the *BTK* gene by allele-specific PCR in patients with progression of CLL. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2023; 68(2): 182–194. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2022-68-2-182-194>

## Введение

В многочисленных исследованиях доказана высокая эффективность таргетной терапии [1–8], в частности ибрутинибом, изменившим тактику лечения больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). В настоящее время ибрутиниб является одним из ключевых эффективных препаратов в терапии рецидивирующего, рефрактерного ХЛЛ (Р/Р ХЛЛ), а также в терапии 1-й линии как в монорежиме, так и в комплексе с другими препаратами [9]. У большей части больных ХЛЛ ибрутиниб вызывает стойкие ремиссии: при лечении ибрутинибом в монорежиме ремиссии достигают у 63–88 % больных с Р/Р ХЛЛ и 71–86 % больных ХЛЛ, если ибрутиниб используется в качестве терапии 1-й линии [7, 8, 10, 11], однако у части больных происходит прогрессия заболевания. По данным J.C. Byrd и соавт. [3], в когорте больных Р/Р ХЛЛ, получавших ибрутиниб в качестве монотерапии, частота прогрессирования спустя 30 мес. терапии составила 69 %. Рефрактерность к ибрутинибу в большинстве случаев связана с мутацией С481S, что соответствует заменам с.1441T>А и с.1442G>С в гене *ВТК* [4, 12, 13]. Однако встречаются и другие варианты мутаций гена в этом положении, такие как С481R (с.1441T>С), С481F (с.1442G>Т), С481Y (с.1442G>А) [12, 14, 15].

Ибрутиниб необратимо связывается с цистеином в кодоне 481 (Cys481) активного центра тирозинкиназы Брутона (Bruton's tyrosine kinase, ВТК), обеспечивая ингибирование ВТК и последующее блокирование сигналов активации выживания клеток ХЛЛ через путь NF-κB [15–18]. У больных это приводит к высокой частоте клинического ответа и длительной ремиссии. Передача сигналов В-клеточного рецептора (В cell receptor, BCR) имеет огромное значение для нормального развития В-клеток и адаптивного иммунитета. При некоторых В-клеточных лейкозах и лимфомах жизнеспособность и пролиферация опухолевых клеток происходит за счет усиления антиапоптотических сигналов через BCR [13, 19, 20]. Мутации в кодоне С481 приводят к утрате ковалентного взаимодействия ВТК с ибрутинибом, быстрому восстановлению активности фермента и, как следствие, потере контроля над опухолью и развитием прогрессии. Детекция мутаций киназного домена гена *ВТК*, ассоциированных с рефрактерностью к ибрутинибу, чрезвычайно важна для изучения механизма развития резистентности и прогрессии ХЛЛ при лечении ингибиторами ВТК. Своевременное выявление мутаций до клинического рецидива может быть основанием для изменения тактики лечения.

**Целью** настоящей работы явилась оценка относительной аллельной нагрузки мутаций устойчивости к ибрутинибу в гене *ВТК* у больных с прогрессией ХЛЛ при помощи разработанной тест-системы на ос-

нове аллель-специфичной полимеразной цепной реакции (АС-ПЦР) в режиме реального времени.

## Больные и методы

### Больные

В исследование был включен материал от 102 больных ХЛЛ: 39 больных с прогрессией ХЛЛ на фоне терапии ибрутинибом (25 мужчин, 14 женщин, медиана возраста — 65 лет), которые получали лечение на базе ГБУЗ «ГКБ им. С.П. Боткина» ДЗМ при наличии показаний по критериям IWCLL 2018 [21]; 24 больных с прогрессией ХЛЛ после терапии по протоколам «FCR/FCR-lite» (15 мужчин, 9 женщин, медиана возраста — 64 года), а также 38 больных ХЛЛ до начала лечения (29 мужчин, 9 женщин, медиана возраста — 62 года), поступивших в ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России. Группа контроля включала в себя 118 больных неопухолевыми гематологическими заболеваниями, кровь которых поступила в лабораторию молекулярной гематологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России для проведения различных молекулярно-генетических исследований.

У большинства больных с прогрессией ХЛЛ на фоне приема ибрутиниба исследовали образцы периферической крови (34 больных), реже — образцы аспиратов костного мозга (4 больных) и биоптат лимфатического узла (1 больной). Для 30 больных ХЛЛ с прогрессией заболевания на фоне приема ибрутиниба был также доступен для исследования материал, взятый до манифестации рецидива, — в большинстве случаев были исследованы образцы периферической крови (28 больных), реже — аспират костного мозга (1 больной) и биоптат лимфатического узла (1 больной). В контрольной группе исследовали образцы периферической крови. У 29 из 39 больных ХЛЛ с прогрессией на фоне терапии ибрутинибом была доступна информация о процессе лечения и предшествующей прогрессии терапии.

### Определение мутаций в гене *ВТК* методом АС-ПЦР в реальном времени

Выделение геномной ДНК из ядерных клеток крови больных осуществляли с помощью метода солевой экстракции [22]. Для определения мутаций в гене *ВТК* методом АС-ПЦР геномную ДНК амплифицировали в 7 отдельных реакциях с использованием праймеров, специфичных к гену *ВТК* (табл. 1), с помощью ПЦР-системы реального времени «CFX 96 Touch» (Bio-Rad, США) или «Rotor-Gene Q» (Qiagen, США). Для определения наличия или отсутствия мутаций в исследуемых образцах проводили сравнение кривых амплификаций и значений  $C_t$  нормального и мутантных аллелей и рассчитывали  $\Delta C_t$ .

**Таблица 1.** Последовательности праймеров и зондов для детекции мутаций в гене *BTK* методом АС-ПЦР в реальном времени (w — нормальный аллель, mt — мутантный аллель)

**Table 1.** Sequences of primers and probes for the detection of mutations in the *BTK* gene by real-time AS-PCR (w — the normal allele, mt — the mutant allele)

Ген/нуклеотид Gene/nucleotide	Прямой праймер 5'-3' Forward primer 5'-3'	Обратный праймер 5'-3' Reverse primer 5'-3'	Проба 5'-3' Probe 5'-3'
<i>BTK</i> w 1441T	CTGAGTACATGGCCAATGGCT	CTGCTACTTCCACCCCATCA	R&G — TGCTAGAGATGTGCAAGGATGTCTGTGAAG — RTQ1
<i>BTK</i> mt 1441A	CTGAGTACATGGCCAATGGCA		
<i>BTK</i> mt 1441C	CTGAGTACATGGCCAATGACC		
<i>BTK</i> w 1442G	CTGAGTACATGGCCAATGGCTG		
<i>BTK</i> mt 1442C	CTGAGTACATGGCCAATGGCTC		
<i>BTK</i> mt 1442A	TGAGTACATGGCCAATGGCAA		
<i>BTK</i> mt 1442T	TGAGTACATGGCCAATGGGTT		

### Секвенирование следующего поколения (next-generation sequencing, NGS)

Для валидации результатов, полученных с помощью АС-ПЦР, фрагмент 15-го экзона гена *BTK* амплифицировали с помощью праймеров F (5'-ACTCCTAGGTCAGCCCCCTTC-3') и R (5'-CTGCTACTTCCACCCCATC-3'). Полученный амплификат использовали для приготовления библиотеки секвенирования с помощью наборов «Nextera XT DNA Library Prep» и «Nextera XT Index Kit v2» (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе «MiSeq» (Illumina, США) с использованием набора «MiSeq Reagent Micro Kit v2 300-cycles» (Illumina, США). Фильтрация данных, удаление служебных последовательностей, картирование прочтений, поиск и аннотирование вариантов осуществляли при помощи утилит Trimmomatic [23], BWA [24], SAMtools [25], Vardict [26] и Annovar [27].

#### Секвенирование по методу Сэнгера

В некоторых случаях валидацию результатов, полученных с помощью АС-ПЦР, проводили с помощью секвенирования методом Сэнгера. Для амплификации 15-го экзона гена *BTK* использовали те же праймеры, что и для NGS. Исследование проводили с использованием набора «BigDye Terminator v1.1» (ThermoFisher Scientific, США), согласно инструкции производителя, на генетическом анализаторе «Нанофор 05» (ФГБУН «ИАП РАН», Россия). Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения SeqAnalysis 5.3.1. (ThermoFisher Scientific, США).

### Результаты

Первоначально АС-ПЦР проводили только на самые распространенные мутации с.1441T>A и с.1442G>C, однако после исследования 15-го экзона гена *BTK* у больных с прогрессией на фоне терапии ибрутинибом с помощью NGS в тест-систему были добавлены другие варианты мутаций: с.1441T>C, с.1442G>T и с.1442G>A.

Для оценки относительной аллельной нагрузки мутаций методом АС-ПЦР в реальном времени использо-

вали  $\Delta Ct$  для исследуемых образцов, которые в дальнейшем разделили на три группы: образцы с высокой относительной аллельной нагрузкой ( $\Delta Ct -3 \div 3$ ), с низкой относительной аллельной нагрузкой ( $\Delta Ct 4 \div 7$ ) и образцы без мутаций ( $\Delta Ct > 7$ ). Полученные отрицательные значения  $\Delta Ct$  означают преобладание мутантного аллеля над нормальным аллелем.

С помощью АС-ПЦР у 17 (43,6 %) больных ХЛЛ с прогрессией при проведении терапии ибрутинибом была выявлена единственная мутация с.1442G>C с высокой относительной аллельной нагрузкой ( $\Delta Ct -3,10 \div 2,11$ ), а у 3 (7,7 %) больных — та же мутация с низкой относительной аллельной нагрузкой ( $\Delta Ct 4,68 \div 6,83$ ).

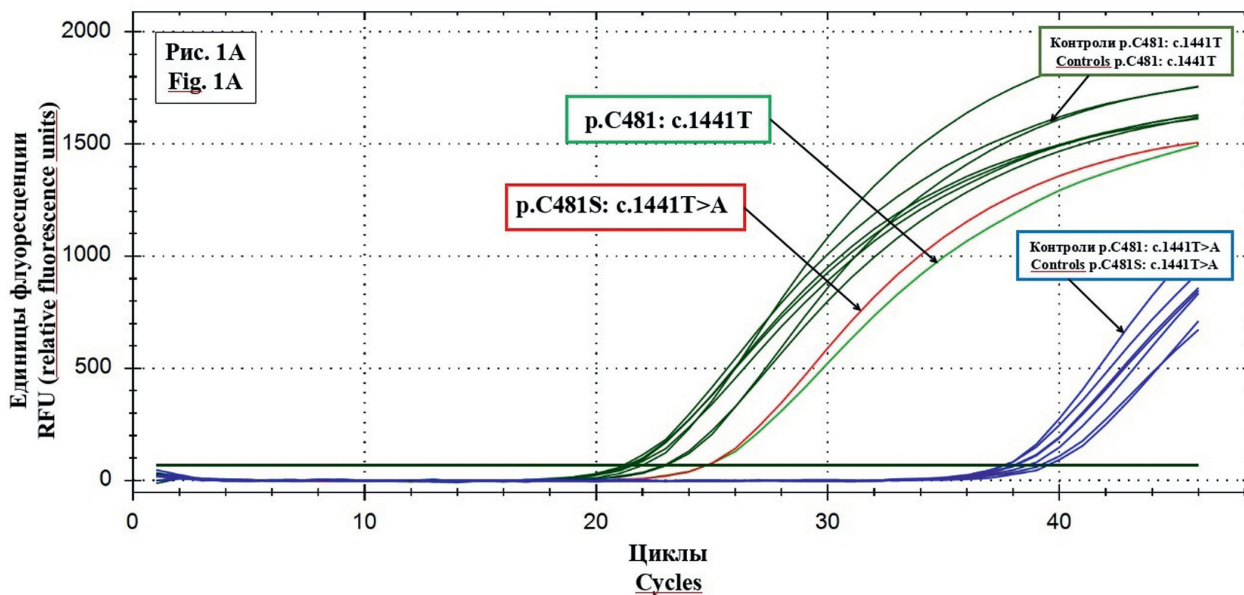
У 1 больного была выявлена единственная мутация с.1442G>T с высокой относительной аллельной нагрузкой ( $\Delta Ct 1,37$ ) и еще у 1 больного — та же мутация с низкой относительной аллельной нагрузкой ( $\Delta Ct 4,68$ ).

У 1 больного были обнаружены одновременно две мутации с разным уровнем относительной аллельной нагрузки: с.1441T>A ( $\Delta Ct -0,06$ ) и с.1442G>C ( $\Delta Ct 4,12$ ) (рис. 1А). У 1 больного — сочетание трех мутаций с разным уровнем относительной аллельной нагрузки: с.1442G>C ( $\Delta Ct 2,67$ ), с.1442G>T ( $\Delta Ct 1,1$ ) и с.1442G>A ( $\Delta Ct 5,9$ ) (рис. 1Б). Эти данные были подтверждены секвенированием по методу Сэнгера (рис. 2).

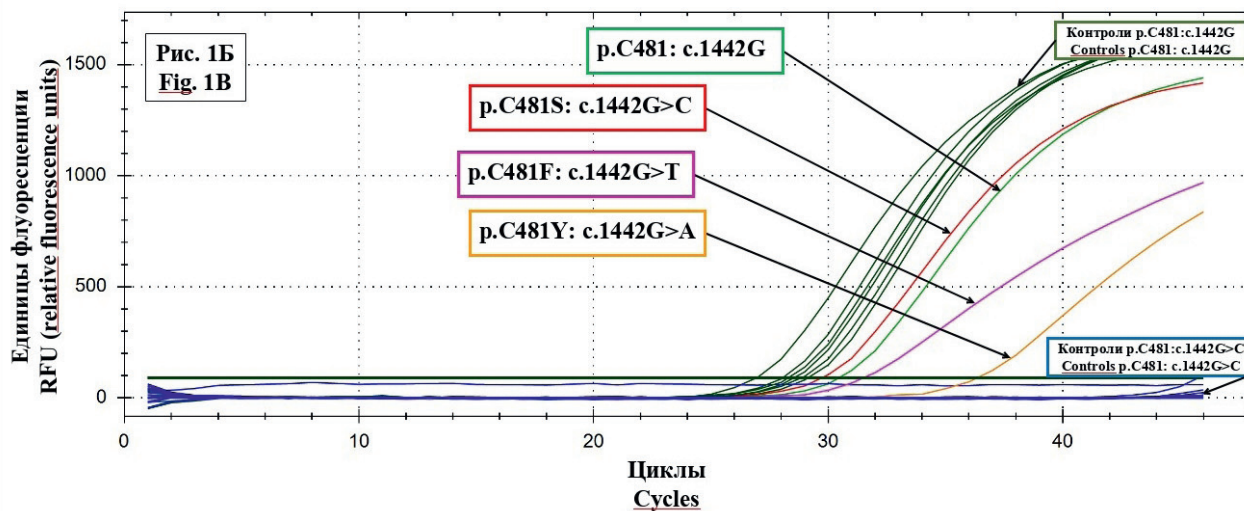
У 15 (38,5 %) больных с прогрессией ХЛЛ при проведении терапии ибрутинибом мутаций в гене *BTK* выявлено не было. В группах больных ХЛЛ без предварительного лечения, после режимов «FCR/FCR-lite» и в контрольной группе больных неопухолевыми заболеваниями мутаций в гене *BTK* выявлено не было.

Все образцы больных ХЛЛ, получавших ибрутиниб, дополнительно были исследованы с помощью секвенирования по Сэнгеру и NGS, во всех случаях было подтверждено наличие мутаций. У одного больного из группы с высокой относительной аллельной нагрузкой мутации с.1442G>C (Variant Allele Frequency (VAF) 52 %), вероятно, в результате клональной эволюции добавилась синонимичная мутация p.Cys481: с.1443C>T (VAF 20 %). В таблице 2 показано хорошее соответ-





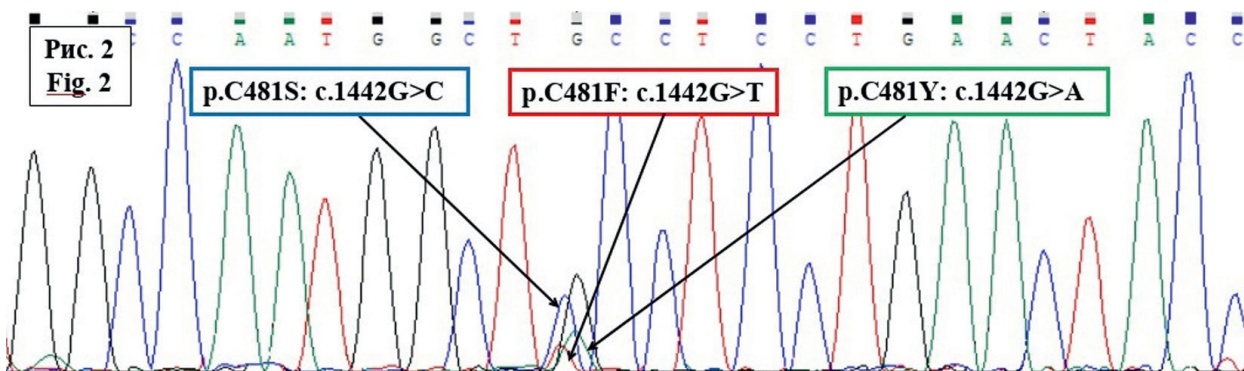
А / A



Б / B

**Рисунок 1.** А — кривые амплификации для образцов, исследуемых на мутации гена *BTK* p.C481S: c.1441T>A (c.1441T — кривая амплификации, нормальный аллель; c.1441T>A — кривая амплификации, мутантный аллель); Б — кривые амплификации для образцов, исследуемых на мутации гена *BTK* p.C481S: c.1442G>C, p.C481F: c.1442G>T и p.C481Y: c.1442G>A (c.1442G — кривая амплификации, нормальный аллель; c.1442G>C, c.1442G>T и c.1442G>A — кривые амплификации, мутантные аллели)

**Figure 1.** А — amplification curves for samples tested for *BTK* p.C481S gene mutation: c.1441T>A (c.1441T — amplification curve, normal allele; c.1441T>A — amplification curve, mutant allele); Б — amplification curves for samples tested for *BTK* gene mutation p.C481S: c.1442G>C, p.C481F: c.1442G>T and p.C481Y: c.1442G>A (c.1442G — amplification curve, normal allele; c.1442G>C, c.1442G>T and c.1442G>A — amplification curves, mutant alleles)



**Рисунок 2.** Хромотограмма с результатом секвенирования продукта амплификации образца крови больного с сочетанием трех мутаций в гене *BTK*: p.C481S: c.1442G>C, p.C481F: c.1442G>T и p.C481Y: c.1442G>A

**Figure 2.** Chromatogram showing the result of product sequencing amplification of a blood sample from a patient with a combination of three mutations in the *BTK* gene: p.C481S: c.1442G>C, p.C481F: c.1442G>T and p.C481Y: c.1442G>A

**Таблица 2.** Определение относительной аллельной нагрузки в гене *BTK* методами АС-ПЦР и NGS у больных с ХЛЛ при лечении ибрутинибом ( $\Delta Ct$   $-3 \div 3$  циклов — высокая нагрузка;  $4 \div 7$  — низкая; отрицательные значения означают преобладание мутантного аллеля над нормальным)

**Table 2.** Determination of the relative allelic load in the *BTK* gene by AS-PCR and NGS in patients with CLL treated with ibrutinib ( $\Delta Ct$   $-3 \div 3$  cycles — high load;  $4 \div 7$  — low; negative values mean the predominance of the mutant allele over the normal one)

№ / No.	Мутация / Mutation	$\Delta Ct$	NGS (VAF, %)	№ / No.	Мутация / Mutation	$\Delta Ct$	NGS (VAF, %)
1	p.C481S: c.1442G>C	-0,91	62,5	15	p.C481S: c.1442G>C	2,11	25
2	p.C481S: c.1442G>C	5,48	1,31	16	p.C481S: c.1442G>C	2,67	32
3	p.C481S: c.1442G>C	-1,97	64,4		p.C481Y: c.1442G>A	5,9	7
4	p.C481S: c.1442G>C	-0,31	47		p.C481F: c.1442G>T	1,1	17
5	p.C481F: c.1442G>T	0,1	58	17	p.C481S: c.1442G>C	-3,1	95
6	p.C481S: c.1442G>C	5,11	1,3	18	p.C481S: c.1442G>C	-0,85	36
7	p.C481S: c.1442G>C	-0,64	66	19	p.C481S: c.1442G>C	-0,48	52
8	p.C481F: c.1442G>T	6,09	3		p.Cys481: c.1443C>T	-	20
9	p.C481S: c.1442G>C	-0,38	34	20	p.C481S: c.1442G>C	0,44	40
10	p.C481S: c.1442G>C	-0,57	44	21	p.C481S: c.1442G>C	0,2	61
11	p.C481S: c.1442G>C	6,83	1,67	22	p.C481S: c.1442G>C	-0,63	43
12	p.C481S: c.1442G>C	1,5	32	23	p.C481S: c.1442G>C	0,64	36
13	p.C481S: c.1442G>C	1,28	33				
14	p.C481S: c.1441T>A	-0,06	41,7	24	p.C481S: c.1442G>C	-2,96	38
	p.C481S: c.1442G>C	4,12	1,2				

ствие результатов NGS с АС-ПЦР при секвенировании 15-го экзона гена *BTK* у данной группы больных как при выявлении типа мутации, так и при определении их относительной аллельной нагрузки.

Также исследовали доступный первичный материал от 30 больных с рецидивом ХЛЛ, возникшим при лечении ибрутинибом, с помощью АС-ПЦР. У всех больных в первичном материале не было обнаружено исследуемых мутаций в гене *BTK* с помощью АС-ПЦР.

Данные настоящего исследования проведенной терапии у больных ХЛЛ с выявленными мутациями в гене *BTK* приведены в таблице 3. Всем больным было проведено минимум два курса специфической терапии перед прогрессией и последующим приемом ибрутиниба. Детектировали мутации в гене *BTK* после 3–65 мес. терапии ибрутинибом (медиана — 34,3 мес.), что согласуется с данными исследований, приведенных выше [4, 12, 13]. Зависимости времени терапии от типа мутации или относительной аллельной нагрузки не обнаружено.

## Обсуждение

Рецидив ХЛЛ у больных при терапии ибрутинибом часто связан с ранней гистологической трансформацией Рихтера — крупноклеточной лимфомой, возникающей на фоне ХЛЛ примерно в первые 15 месяцев лечения. Однако в некоторых случаях возникает приобретенная вторичная резистентность, связанная с возникающими мутациями в генах *BTK* и/или *PLCG2* в процессе лечения ибрутинибом у больных ХЛЛ, ко-

торые изначально хорошо ответили на терапию [4, 12, 28–31]. Существующие исследования мутаций в рецидиве у больных ХЛЛ при терапии ибрутинибом показывают, что прогрессирование заболевания связано с мутациями в генах *BTK* и *PLCG2*, а трансформация Рихтера, вероятно, нет [29]. По данным литературы, примерно у 80 % больных с рецидивом ХЛЛ с резистентностью к ибрутинибу обнаруживаются мутации в генах *BTK* и *PLCG2* [4, 12, 28], а у остальных 20 % больных причина появления резистентности к ибрутинибу до сих пор не изучена [4, 13, 32, 33].

В данном исследовании определили относительную аллельную нагрузку мутаций устойчивости к ибрутинибу в 15-м экзоне гена *BTK* у 39 (61,5 %) больных с прогрессией ХЛЛ, используя разработанную тест-систему на основе АС-ПЦР в режиме реального времени. У 50 % больных наблюдалась одна мутация, у 5 % — две мутации, у 2,5 % — три мутации в гене *BTK*. Полученные данные соответствуют результатам зарубежных исследовательских групп относительно частоты встречаемости мутаций устойчивости к ибрутинибу среди больных с прогрессией ХЛЛ [4, 12]. Результаты настоящего исследования подтверждают представления о возникновении мутаций у больных ХЛЛ в процессе лечения ибрутинибом, а не до приема препарата, поскольку в первичном материале обследованных больных мутаций в гене *BTK* найдено не было [3, 4, 12, 32].

Исследования, проводимые по изучению резистентности к ибрутинибу среди больных с Р/Р ХЛЛ, сви-

**Таблица 3.** Данные о найденных мутациях, относительной аллельной нагрузке и проводимой терапии у больных ХЛЛ с прогрессией на фоне терапии ибрутинибом  
**Table 3.** Data on mutations, relative allelic load and ongoing therapy in CLL patients with progression on ibrutinib therapy

№ / No.	Мутация / Mutation	ОАН / RAL	Вся терапия / Therapy	Время, мес. / Time, month
1	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	Лейкеран, 2012. 4 курса R-CVP 01.03.2013 — 01.07.2013, 6 курсов BR 01.11.2013 — 20.04.2014. Ибрутиниб с 30.03.2016. Leukeran, 2012. 4 courses of R-CVP, 01.03.2013 — 01.07.2013, 6 courses of BR 01.11.2013 — 20.04.2014. Ibrutinib since 30.03.2016.	21
2	p.C481S: c.1442G>C	Низкая Low	3 курса FCR без эффекта, 2015. 1 курс R-CHOP без ответа, 2015. Ибрутиниб с 03.11.2015. 3 courses of FCR without response, 2015. 1 course of R-CHOP without response, 2015. Ibrutinib since 03.11.2015.	32
3	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	RCIb, далее 4 курса R 10.05.2011 — 14.10.2011. 3 курса FCR 17.01.2012 — 23.04.2012. iRB с 16.12.2013. RCIb, 4 courses of R 10.05.2011 — 14.10.2011. 3 courses of FCR 17.01.2012 — 23.04.2012. iRB since 16.12.2013.	63
4	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	8 курсов FC 10.11.2007 — 24.06.2008. 6 курсов FC 01.10.2011 — 08.04.2012. 6 курсов BR 05.07.2015 — 12.2015. Ибрутиниб с 31.05.2016. 8 courses of FC 10.11.2007 — 24.06.2008. 6 courses of FC 01.10.2011 — 08.04.2012. 6 courses of BR 05.07.2015 — 12.2015. Ibrutinib since 31.05.2016.	37
5	p.C481F: c.1442G>T	Высокая High	FCR с 28.01.2011. 6 курсов R-CHOP с 27.04.2012. 6 курсов BR с 11.02.2013. Флударабин, 2014–2015. Ритуксимаб, 2015. Ибрутиниб с 23.06.2016. FCR since 28.01.2011. 6 courses of R-CHOP since 27.04.2012. 6 courses of BR since 11.02.2013. Fludarabine, 2014–2015. Rituximab, 2015. Ibrutinib since 23.06.2016.	39
6	p.C481S: c.1442G>C	Низкая Low	1 курс RB 11.10.2017 — 13.10.2017. 2 курса FCR, 2018. Ибрутиниб с 23.08.2019. 1 course of RB 11.10.2017 — 13.10.2017. 2 courses of FCR, 2018. Ibrutinib since 23.08.2019.	3
7	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FC 16.11.2007 — 28.04.2008. 6 курсов FCR 12.04.2012 — 03.09.2012. 6 курсов RB 20.03.2015 — 17.08.2015. Ибрутиниб с 10.05.2016. 4 курса Обинутумаба 05.09.2019 — 31.10.2019. 6 courses of FC 16.11.2007 — 28.04.2008. 6 courses of FCR 12.04.2012 — 03.09.2012. 6 courses of RB 20.03.2015 — 17.08.2015. Ibrutinib since 10.05.2016. 4 courses of Obinutuzumab 05.09.2019 — 31.10.2019.	17
8	p.C481F: c.1442G>T	Низкая Low	10 курсов FCR 05.05.2014 — 01.03.2015. Ибрутиниб с 19.07.2016. 10 courses of FCR 05.05.2014 — 01.03.2015. Ibrutinib since 19.07.2016.	39
9	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FCR/FC 01.02.2014 — 01.07.2014. 6 курсов RB 09.06.2015 — 21.12.2015. Ибрутиниб с 23.06.2016. 6 courses of FCR/FC 01.02.2014 — 01.07.2014. 6 courses of RB 09.06.2015 — 21.12.2015. Ibrutinib since 23.06.2016.	40
10	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FCR 03.07.2010 — 03.12.2010. 8 курсов R-CHOP 07.10.2011 — 26.04.2012. 5 курсов R-CHOP 10.12.2013 — 15.05.2014. 9 курсов R-FCP 25.03.2014 — 19.10.2015. Ибрутиниб с 01.03.2017. 6 courses of FCR 03.07.2010 — 03.12.2010. 8 courses of R-CHOP 07.10.2011 — 26.04.2012. 5 courses of R-CHOP 10.12.2013 — 15.05.2014. 9 courses of R-FCP 25.03.2014 — 19.10.2015. Ibrutinib since 01.03.2017.	34
11	p.C481S: c.1442G>C	Низкая Low	Лейкеран 01.10.2017 — 01.10.2018. Ибрутиниб с 07.05.2019. Leukeran 01.10.2017 — 01.10.2018. Ibrutinib since 07.05.2019.	9
12	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FCR 22.10.2008 — 16.03.2009. R-COP/R-CHOP 07.02.2011 — 18.07.2011. 6 курсов FCR-Lite 26.06.2012 — 10.12.2012. 6 курсов RB 23.07.2015 — 11.1.2016. Ибрутиниб с 11.03.2017. 6 courses of FCR 22.10.2008 — 16.03.2009. R-COP/R-CHOP 07.02.2011 — 18.07.2011. 6 courses of FCR-Lite 26.06.2012 — 10.12.2012. 6 courses of RB 23.07.2015 — 11.1.2016. Ibrutinib since 11.03.2017.	34
13	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FCR с 10.2017. 7 курсов FCR, 2018. 2 курса RB, 2019. Ибрутиниб с 09.2019. 6 courses of FCR since 10.2017. 7 courses of FCR, 2018. 2 courses of RB, 2019. Ibrutinib since 09.2019.	15



Продолжение табл. 3  
Table 3. Continuation

№ / No.	Мутация / Mutation	ОАН / RAL	Вся терапия / Therapy	Время, мес. / Time, month
14	p.C481S: c.1441T>A	Высокая High	6 курсов FCR 11.07 — 28.11.17. Ибрутиниб с 26.08.2019. 6 courses of FCR 11.07 — 28.11.17. Ibrutinib since 26.08.2019.	15
	p.C481S: c.1442G>C	Низкая Low		
15	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FCR 01.11.2005 — 01.04.2006. 6 курсов FCR 01.11.2013 — 01.03.2014. 7 курсов RB 06.10.2014 — 01.10.2015. 3 курса преднизолона 01.12.2015 — 01.02.2016. Ибрутиниб с 08.06.2016. 6 courses of FCR 01.11.2005 — 01.04.2006. 6 courses of FCR 01.11.2013 — 01.03.2014. 7 courses of RB 06.10.2014 — 01.10.2015. 3 courses of Prednisolone 01.12.2015 — 01.02.2016. Ibrutinib since 08.06.2016.	54
16	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FCR 01.2009 — 01.07.2009. 4 курса FCR 01.11.2013 — 01.01.2012. Спленэктомия 18.04.2013. 1 курс преднизолона 22.03.2013. 6 курсов RB 05.11.2013 — 04.04.2014. Ибрутиниб с 18.03.2018. 6 courses of FCR 01.2009 — 01.07.2009. 4 courses of FCR 01.11.2013 — 01.01.2012. Splenectomy 18.04.2013. 1 course of Prednisolone 22.03.2013. 6 courses of RB 05.11.2013 — 04.04.2014. Ibrutinib since 18.03.2018.	33
	p.C481Y: c.1442G>A	Низкая Low		
	p.C481F: c.1442G>T	Высокая High		
17	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FCR 01.10.2012 — 01.04.2013. 5 курсов BR 09.06.2017 — 06.09.2017. 1 курс FCR 02.10 — 05.10.2017. Ибрутиниб с 28.08.2018. 6 courses of FCR 01.10.2012 — 01.04.2013. 5 courses of BR 09.06.2017 — 06.09.2017. 1 course of FCR 02.10 — 05.10.2017. Ibrutinib since 28.08.2018.	28
18	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	1 курс эндоксан + дексаметазон 18.03 — 20.03.2016. 12 курсов лейкоерана 20.04.2016 — 01.04.2017. 8 курсов R/FC-lite 20.07.2017 — 15.03.2018. Ибрутиниб с 31.07.2018. 1 course of Endoxan + Dexamethasone 18.03 — 20.03.2016. 12 courses of Leukeran 20.04.2016 — 01.04.2017. 8 courses of R/FC-lite 20.07.2017 — 15.03.2018. Ibrutinib since 31.07.2018.	30
19	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	—	-
	p.Cys481: c.1443C>T	Высокая High		
20	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	R-CVP 25.12 — 28.12.2016. FCR 25.01 — 30.03.2017. Ибрутиниб с 12.05.2017. R-CVP 25.12 — 28.12.2016. FCR 25.01 — 30.03.2017. Ibrutinib since 12.05.2017.	43
21	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	3 курса FCR с 15.01.2008. R-кларидрин 15.06.2011. R-кларидрин 06.05.2013. R-дексаметазон 02.01.2014. RB с 06.03.2014. Ибрутиниб с 09.03.2016. 3 courses of FCR с 15.01.2008. R-Cladribine 15.06.2011. R-Cladribine 06.05.2013. R-Dexamethasone 02.01.2014. RB since 06.03.2014. Ibrutinib since 09.03.2016.	62
22	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	2 курса FCR 20.02 — 17.03.2018. Ибрутиниб с 01.06.2018. 2 courses of FCR 20.02 — 17.03.2018. Ibrutinib since 01.06.2018.	47
23	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	4 курса BR. Ибрутиниб с 01.09.2015. 4 courses of BR. Ibrutinib since 01.09.2015.	65
24	p.C481S: c.1442G>C	Высокая High	6 курсов FCR 28.02.2012 — 31.01.2013. 6 курсов RB 18.11.2015 — 13.04.2016. Ибрутиниб с 01.02.2017. 6 courses of FCR 28.02.2012 — 31.01.2013. 6 courses of RB 18.11.2015 — 13.04.2016. Ibrutinib since 01.02.2017.	57

Примечание. ОАН — относительная аллельная нагрузка; время — время терапии ибрутинибом до рецидива.

Note. RAL — relative allelic load; time — time of therapy with ibrutinib before relapse.



детельствуют о важности своевременного выявления мутаций устойчивости в гене *ВТК*. По данным I.E. Ahn и соавт. [12], мутации в гене *ВТК* чаще всего обнаруживают спустя 12–24 месяца терапии. По данным L. Sedlarikova и соавт. [15] и D. Jones и соавт. [34], мутации обнаруживают между вторым и четвертым годами лечения ибрутинибом (медиана — 34,3 мес.,  $14 \pm 76,8$  мес.).

По данным нескольких групп зарубежных исследователей, мутации в гене *ВТК* возможно детектировать за 9 мес. ( $7,6 \pm 11,7$  мес.) [12] или еще раньше — за 15 мес. ( $2,9 \pm 15,4$  мес.) до манифестации рецидива у больных с резистентностью к терапии ингибиторами *ВТК* [4]. J.A. Woyach и соавт. предложили мониторинг мутаций устойчивости в гене *ВТК* каждые 3 месяца как необходимую практику для наблюдения течения ХЛЛ у больных при терапии ибрутинибом [4].

Согласно результатам зарубежных исследователей, почти у половины больных, у которых наблюдается прогрессия ХЛЛ, при лечении ибрутинибом, имеются мутации гена *ВТК* с низкой аллельной нагрузкой ( $ВAF < 10\%$ ) [4, 12], однако механизм возникновения резистентности в случае низкой аллельной нагрузки еще не выяснен. По данным J.A. Woyach и соавт. [4], будущей резистентности предшествует длительный период бессимптомной клональной экспансии, которая имеет решающее значение в возможности предупреждения рецидива у больных ХЛЛ с помощью альтернативных методов лечения. Кроме того, J.A. Woyach и соавт. сообщили о наличии у большинства больных мутаций, связанных с резистентностью к ибрутинибу, только в лимфатических узлах, при том, что в образцах периферической крови данной мутации найдено не было [4]. Чрезвычайно важно подбирать материал для определения мутаций устойчивости, так как отрицательный результат в периферической крови не свидетельствует о том, что у больного нет субклона с мутацией устойчивости к ибрутинибу в других органах. Для больных с прогрессией ХЛЛ при проведении терапии ибрутинибом, у которых наблюдается низкая относительная аллельная нагрузка, по результатам настоящего исследования ( $\Delta Ct 4 \div 7$ ), предлагается использовать материал аспирата костного мозга или биоптата лимфатического узла [4]. Также рекомендуется мониторинг мутаций устойчивости в гене *ВТК* каждые 3 месяца как необходимый анализ в практике наблюдения больных ХЛЛ при терапии ибрутинибом [4].

Мутации в кодоне Cys481 гена *ВТК* с высоким уровнем относительной аллельной нагрузки, вероятно,

связаны с особой устойчивостью к ибрутинибу и прогрессией ХЛЛ. Существуют альтернативные механизмы устойчивости к ингибиторам *ВТК*. В настоящее время продолжают исследования мутаций в других доменах гена *ВТК*, которые могут участвовать в формировании резистентности к ибрутинибу у больных с Р/Р ХЛЛ, и их влияние на прогрессию заболевания, например, мутации T316A в SH2-домене, T474I/S и L528W — в киназном домене гена *ВТК* [15, 32, 35]. S. Sharma и соавт. [35] сообщают, что клетки ХЛЛ, несущие мутацию *ВТК* T316A, проявляют устойчивость к ибрутинибу в той же степени, что и клетки ХЛЛ с мутацией *ВТК* C481S.

Описанные в литературе множественные мутации гена *PLCG2*, такие как R665W, S707F/P/Y, L845F, A708P, P664S/L, могут обеспечивать постоянную активацию сигнального пути BCR, несмотря на ингибирование *ВТК*, влияя тем самым на жизнеспособность опухолевых клеток в обход *ВТК* [12, 14, 15, 36]. Эти данные подтверждают наличие альтернативных механизмов устойчивости к ингибиторам *ВТК*. На сегодняшний день описаны мишени, которые могут способствовать резистентности к ибрутинибу и прогрессии ХЛЛ. К ним относятся мутации в генах *TP53*, *SF3B1*, *PCLLO*, *EP500*, *MLL2* и *EIF2A* [28, 32, 36], а также перестройки гена *BCL6*, аномалии гена *MYC*, делеции — del(17p), del(8p), комплексный кариотип и многие другие факторы [1, 32]. Дальнейшие исследования и своевременное определение мутаций в генах *ВТК*, *PLCG2* и других потенциальных биомаркеров будущих рецидивов ХЛЛ позволит изменить тактику лечения больных.

Таким образом, рецидивы у больных с прогрессией ХЛЛ при проведении терапии ибрутинибом представляют собой все более частую проблему. Разработана тест-система на основе АС-ПЦР в режиме реального времени по определению относительной аллельной нагрузки мутаций устойчивости к ибрутинибу в гене *ВТК* у больных с прогрессией ХЛЛ, а именно: с.1441T>A, с.1441T>C, с.1442G>C, с.1442G>T и с.1442G>A. В перспективе планируется использование данного подхода для оценки роли мутаций *ВТК* с низкой нагрузкой в патогенезе рецидива у больных ХЛЛ при терапии ингибиторами *ВТК*. Мониторинг мутаций и определение относительной аллельной нагрузки каждые 3 месяца у больных с ХЛЛ до рецидива при лечении ибрутинибом позволит получить больше информации о времени появления мутаций и значительно улучшить терапию данного заболевания.

## Литература

1. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 369(1): 32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637.
2. O'Brien S., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: An open-label, multi-centre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15(1): 48–58. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70513-8.
3. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood.* 2015; 125(16): 2497–506. DOI: 10.1182/blood-2014-10-606038.
4. Woyach J.A., Ruppert A.S., Guinn D., et al. BTK<sup>C481S</sup>-mediated resistance to ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2017; 35(13): 1437–43. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.2282.
5. Byrd J.C., Brown J.R., O'Brien S., et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2014; 371(3): 213–23. DOI: 10.1056/NEJMoa1400376.
6. Burger J.A., Tedeschi A., Barr P.M., et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2015; 373(25): 2425–37. DOI: 10.1056/NEJMoa1509388.
7. Barr P.M., Robak T., Owen C., et al. Sustained efficacy and detailed clinical follow-up of first-line ibrutinib treatment in older patients with chronic lymphocytic leukemia: extended phase 3 results from RESONATE-2. *Haematologica.* 2018; 103(9): 1502–10. DOI: 10.3324/haematol.2018.192328.
8. McDermott J., Jimeno A. Ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Drugs Today (Barc).* 2014; 50(4): 291–300. DOI: 10.1358/dot.2014.50.4.2133570.
9. Никитин Е.А., Бялик Т.Е., Зарицкий А.Ю. и др. Хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов. Клинические рекомендации. Современная онкология. 2020; 22(3): 24–44. DOI: 10.26442/18151434.2020.3.
10. Munir T., Brown J.R., O'Brien S., et al. Final analysis from RESONATE: Up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol.* 2019; 94(12): 1353–63. DOI: 10.1002/ajh.25638.
11. Thompson P.A., Burger J.A. Bruton's tyrosine kinase inhibitors: first and second generation agents for patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Expert Opin Investig Drugs.* 2018; 27(1): 31–42. DOI: 10.1080/13543784.2018.1404027.
12. Ahn I.E., Underbayev C., Albitar A., et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2017; 129(11): 1469–79. DOI: 10.1182/blood-2016-06-719294.
13. Woyach J.A., Bojnik E., Ruppert A.S., et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood.* 2014; 123(8): 1207–13. DOI: 10.1182/blood-2013-07-515361.
14. Albitar A., Ma W., DeDios I., et al. Using high-sensitivity sequencing for the detection of mutations in *BTK* and *PLCY2* genes in cellular and cell-free DNA and correlation with progression in patients treated with BTK inhibitors. *Oncotarget.* 2017; 8(11): 17936–44. DOI: 10.18632/oncotarget.15316.
15. Sedlarikova L., Petrackova A., Papajik T., et al. Resistance-associated mutations in chronic lymphocytic leukemia patients treated with novel agents. *Front Oncol.* 2020; 10: 894. DOI: 10.3389/fonc.2020.00894.
16. Herman S.E., Gordon A.L., Hertlein E., et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood.* 2011; 117(23): 6287–96. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328484.
17. Ponader S., Chen S.S., Buggy J.J., et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue

## References

1. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013; 369(1): 32–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1215637.
2. O'Brien S., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Ibrutinib as initial therapy for elderly patients with chronic lymphocytic leukaemia or small lymphocytic lymphoma: An open-label, multi-centre, phase 1b/2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15(1): 48–58. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70513-8.
3. Byrd J.C., Furman R.R., Coutre S.E., et al. Three-year follow-up of treatment-naïve and previously treated patients with CLL and SLL receiving single-agent ibrutinib. *Blood.* 2015; 125(16): 2497–506. DOI: 10.1182/blood-2014-10-606038.
4. Woyach J.A., Ruppert A.S., Guinn D., et al. BTK<sup>C481S</sup>-mediated resistance to ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol.* 2017; 35(13): 1437–43. DOI: 10.1200/JCO.2016.70.2282.
5. Byrd J.C., Brown J.R., O'Brien S., et al. Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2014; 371(3): 213–23. DOI: 10.1056/NEJMoa1400376.
6. Burger J.A., Tedeschi A., Barr P.M., et al. Ibrutinib as initial therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2015; 373(25): 2425–37. DOI: 10.1056/NEJMoa1509388.
7. Barr P.M., Robak T., Owen C., et al. Sustained efficacy and detailed clinical follow-up of first-line ibrutinib treatment in older patients with chronic lymphocytic leukemia: extended phase 3 results from RESONATE-2. *Haematologica.* 2018; 103(9): 1502–10. DOI: 10.3324/haematol.2018.192328..
8. McDermott J., Jimeno A. Ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Drugs Today (Barc).* 2014; 50(4): 291–300. DOI: 10.1358/dot.2014.50.4.2133570.
9. Nikitin E.A., Byalik T.E., Zaritskii A.Yu., et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. Clinical recommendations. *Sovremennaya Onkologiya.* 2020; 22(3): 24–44. DOI: 10.26442/18151434.2020.3. (In Russian).
10. Munir T., Brown J.R., O'Brien S., et al. Final analysis from RESONATE: Up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol.* 2019; 94(12): 1353–63. DOI: 10.1002/ajh.25638.
11. Thompson P.A., Burger J.A. Bruton's tyrosine kinase inhibitors: first and second generation agents for patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Expert Opin Investig Drugs.* 2018; 27(1): 31–42. DOI: 10.1080/13543784.2018.1404027.
12. Ahn I.E., Underbayev C., Albitar A., et al. Clonal evolution leading to ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2017; 129(11): 1469–79. DOI: 10.1182/blood-2016-06-719294.
13. Woyach J.A., Bojnik E., Ruppert A.S., et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood.* 2014; 123(8): 1207–13. DOI: 10.1182/blood-2013-07-515361.
14. Albitar A., Ma W., DeDios I., et al. Using high-sensitivity sequencing for the detection of mutations in *BTK* and *PLCY2* genes in cellular and cell-free DNA and correlation with progression in patients treated with BTK inhibitors. *Oncotarget.* 2017; 8(11): 17936–44. DOI: 10.18632/oncotarget.15316.
15. Sedlarikova L., Petrackova A., Papajik T., et al. Resistance-associated mutations in chronic lymphocytic leukemia patients treated with novel agents. *Front Oncol.* 2020; 10: 894. DOI: 10.3389/fonc.2020.00894.
16. Herman S.E., Gordon A.L., Hertlein E., et al. Bruton tyrosine kinase represents a promising therapeutic target for treatment of chronic lymphocytic leukemia and is effectively targeted by PCI-32765. *Blood.* 2011; 117(23): 6287–96. DOI: 10.1182/blood-2011-01-328484.
17. Ponader S., Chen S.S., Buggy J.J., et al. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue

homing in vitro and in vivo. *Blood*. 2012; 119(5): 1182–9. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386417.

18. Herman S.E., Mustafa R.Z., Gyamfi J.A., et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF- $\kappa$ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*. 2014; 123(21): 3286–95. DOI: 10.1182/blood-2014-02-548610.

19. Burger J.A., Wiestner A. Targeting B cell receptor signaling in cancer: Preclinical and clinical advances. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18(3): 148–67. DOI: 10.1038/nrc.2017.121.

20. Alu A., Lei H., Han X., et al. BTK inhibitors in the treatment of hematological malignancies and inflammatory diseases: Mechanisms and clinical studies. *J Hematol Oncol*. 2022; 15(1): 138. DOI: 10.1186/s13045-022-01353-w.

21. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131(25): 2745–60. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806398.

22. Miller S., Dykes D., Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215.

23. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

24. Li H., Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010; 26(5): 589–95. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp698.

25. Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25(16): 2078–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.

26. Lai Z., Markovets A., Ahdesmaki M., et al. VarDict: A novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(11): e108. DOI: 10.1093/nar/gkw227.

27. Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(16): e164. DOI: 10.1093/nar/gkq603.

28. Woyach J.A., Furman R.R., Liu T.M., et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014; 370(24): 2286–94. DOI: 10.1056/NEJMoa1400029.

29. Maddocks K.J., Ruppert A.S., Lozanski G., et al. Etiology of ibrutinib therapy discontinuation and outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JAMA Oncol*. 2015; 1(1): 80–7. DOI: 10.1001/jamaoncol.2014.218.

30. Kaur V., Swami A. Ibrutinib in CLL: A focus on adverse events, resistance, and novel approaches beyond ibrutinib. *Ann Hematol*. 2017; 96(7): 1175–84. DOI: 10.1007/s00277-017-2973-2.

31. Puła B., Gołos A., Górniak P., Jamrozik K. Overcoming ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(12): 1834. DOI: 10.3390/cancers11121834.

32. Kadri S., Lee J., Fitzpatrick C., et al. Clonal evolution underlying leukemia progression and Richter transformation in patients with ibrutinib-relapsed CLL. *Blood Adv*. 2017; 1(12): 715–27. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016003632.

33. Burger J.A., Landau D.A., Taylor-Weiner A., et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun*. 2016; 7: 11589. DOI: 10.1038/ncomms11589.

34. Jones D., Woyach J.A., Zhao W., et al. PLCG2 C2 domain mutations co-occur with BTK and PLCG2 resistance mutations in chronic lymphocytic leukemia undergoing ibrutinib treatment. *Leukemia*. 2017; 31(7): 1645–7. DOI: 10.1038/leu.2017.110.

35. Sharma S., Galanina N., Guo A., et al. Identification of a structurally novel BTK mutation that drives ibrutinib resistance in CLL. *Oncotarget*. 2016; 7(42): 68833–41. DOI: 10.18632/oncotarget.11932.

homing in vitro and in vivo. *Blood*. 2012; 119(5): 1182–9. DOI: 10.1182/blood-2011-10-386417.

18. Herman S.E., Mustafa R.Z., Gyamfi J.A., et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF- $\kappa$ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood*. 2014; 123(21): 3286–95. DOI: 10.1182/blood-2014-02-548610.

19. Burger J.A., Wiestner A. Targeting B cell receptor signaling in cancer: Preclinical and clinical advances. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18(3): 148–67. DOI: 10.1038/nrc.2017.121.

20. Alu A., Lei H., Han X., et al. BTK inhibitors in the treatment of hematological malignancies and inflammatory diseases: Mechanisms and clinical studies. *J Hematol Oncol*. 2022; 15(1): 138. DOI: 10.1186/s13045-022-01353-w.

21. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018; 131(25): 2745–60. DOI: 10.1182/blood-2017-09-806398.

22. Miller S., Dykes D., Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3): 1215. DOI: 10.1093/nar/16.3.1215.

23. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

24. Li H., Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010; 26(5): 589–95. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp698.

25. Li H., Handsaker B., Wysoker A., et al.; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25(16): 2078–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp352.

26. Lai Z., Markovets A., Ahdesmaki M., et al. VarDict: A novel and versatile variant caller for next-generation sequencing in cancer research. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(11): e108. DOI: 10.1093/nar/gkw227.

27. Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(16): e164. DOI: 10.1093/nar/gkq603.

28. Woyach J.A., Furman R.R., Liu T.M., et al. Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med*. 2014; 370(24): 2286–94. DOI: 10.1056/NEJMoa1400029.

29. Maddocks K.J., Ruppert A.S., Lozanski G., et al. Etiology of ibrutinib therapy discontinuation and outcomes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *JAMA Oncol*. 2015; 1(1): 80–7. DOI: 10.1001/jamaoncol.2014.218.

30. Kaur V., Swami A. Ibrutinib in CLL: A focus on adverse events, resistance, and novel approaches beyond ibrutinib. *Ann Hematol*. 2017; 96(7): 1175–84. DOI: 10.1007/s00277-017-2973-2.

31. Puła B., Gołos A., Górniak P., Jamrozik K. Overcoming ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(12): 1834. DOI: 10.3390/cancers11121834.

32. Kadri S., Lee J., Fitzpatrick C., et al. Clonal evolution underlying leukemia progression and Richter transformation in patients with ibrutinib-relapsed CLL. *Blood Adv*. 2017; 1(12): 715–27. DOI: 10.1182/bloodadvances.2016003632.

33. Burger J.A., Landau D.A., Taylor-Weiner A., et al. Clonal evolution in patients with chronic lymphocytic leukaemia developing resistance to BTK inhibition. *Nat Commun*. 2016; 7: 11589. DOI: 10.1038/ncomms11589.

34. Jones D., Woyach J.A., Zhao W., et al. PLCG2 C2 domain mutations co-occur with BTK and PLCG2 resistance mutations in chronic lymphocytic leukemia undergoing ibrutinib treatment. *Leukemia*. 2017; 31(7): 1645–7. DOI: 10.1038/leu.2017.110.

35. Sharma S., Galanina N., Guo A., et al. Identification of a structurally novel BTK mutation that drives ibrutinib resistance in CLL. *Oncotarget*. 2016; 7(42): 68833–41. DOI: 10.18632/oncotarget.11932.

36. Liu T.M., Woyach J.A., Zhong Y., et al. Hypermorphic mutation of phospholipase C,  $\gamma 2$  acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. Blood. 2015; 126(1): 61–8. DOI: 10.1182/blood-2015-02-626846.

## Информация об авторах

**Ликольд Екатерина Борисовна\***, научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: [ekaterina\\_likold@mail.ru](mailto:ekaterina_likold@mail.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0422-6608>

**Бидерман Белла Вениаминовна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: [bella\\_biderman@mail.ru](mailto:bella_biderman@mail.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

**Февралева Ирина Серафимовна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: [irina\\_fevraleva@mail.ru](mailto:irina_fevraleva@mail.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8763-246X>

**Северина Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: [siverinka@yandex.ru](mailto:siverinka@yandex.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7036-9968>

**Дмитриева Елена Александровна**, гематолог, ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы,  
e-mail: [elenohka201@rambler.ru](mailto:elenohka201@rambler.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3866-4510>

**Петренко Андрей Анатольевич**, гематолог, ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы; аспирант кафедры гематологии и трансфузиологии, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: [petrenkoandrei13@gmail.com](mailto:petrenkoandrei13@gmail.com)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8461-5421>

36. Liu T.M., Woyach J.A., Zhong Y., et al. Hypermorphic mutation of phospholipase C,  $\gamma 2$  acquired in ibrutinib-resistant CLL confers BTK independency upon B-cell receptor activation. Blood. 2015; 126(1): 61–8. DOI: 10.1182/blood-2015-02-626846.

## Information about the authors

**Ekaterina B. Likold\***, Researcher, Department of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology,  
e-mail: [ekaterina\\_likold@mail.ru](mailto:ekaterina_likold@mail.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0422-6608>

**Bella V. Biderman**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology,  
e-mail: [bella\\_biderman@mail.ru](mailto:bella_biderman@mail.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

**Irina S. Fevrалева**, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Department of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology,  
e-mail: [irina\\_fevraleva@mail.ru](mailto:irina_fevraleva@mail.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8763-246X>

**Nataliya A. Severina**, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Department of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology,  
e-mail: [siverinka@yandex.ru](mailto:siverinka@yandex.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7036-9968>

**Elena A. Dmitrieva**, Hematologist, Botkin City Clinical Hospital,  
e-mail: [elenohka201@rambler.ru](mailto:elenohka201@rambler.ru)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3866-4510>

**Andrii A. Petrenko**, Hematologist, Botkin City Clinical Hospital; Postgraduate, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,  
e-mail: [petrenkoandrei13@gmail.com](mailto:petrenkoandrei13@gmail.com)  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8461-5421>



**Никитин Евгений Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий дневным стационаром гематологии, онкологии и химиотерапии городского гематологического центра ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина» Департамента здравоохранения г. Москвы; заведующий кафедрой гематологии и трансфузиологии им. акад. И.А. Касирского и А.И. Воробьева, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: Eugene\_nikitin@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2490-1263>

**Судариков Андрей Борисович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной гематологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: dusha@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

**\* Автор, ответственный за переписку**

Поступила: 20.09.2022

Принята в печать: 20.03.2023

**Eugene A. Nikitin**, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Day Hospital of Hematology, Oncology and Chemotherapy of the City Hematological Center, Botkin City Clinical Hospital; Head of the Department of Hematology and Transfusiology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,  
e-mail: Eugene\_nikitin@mail.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2490-1263>

**Andrey B. Sudarikov**, Dr. Sci. (Biol.), Head of Department of Molecular Hematology, National Medical Research Center for Hematology,  
e-mail: dusha@blood.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

**\* Corresponding author**

Received 20.09.2022

Accepted 20.03.2023