

## 한국인 만성골수성백혈병 환자의 Imatinib (STI-571) 내성 및 BCR-ABL 유전자 돌연변이 검출

울산대학교 의과대학 서울아산병원 <sup>1</sup>진단검사의학과, <sup>2</sup>내과

손용학<sup>1</sup> · 지현숙<sup>1</sup> · 박찬정<sup>1</sup> · 이규형<sup>2</sup> · 서울주<sup>1</sup>

### Clinical Resistance to the Tyrosine Kinase Inhibitor Imatinib (STI571) and Detection of BCR-ABL Gene Mutations in Korean Patients with Chronic Myeloid Leukemia

Yong-Hak Sohn, M.D.<sup>1</sup>, Hyun-Sook Chi, M.D.<sup>1</sup>, Chan-Jeoung Park, M.D.<sup>1</sup>,  
Kyoo-Hyung Lee, M.D.<sup>2</sup> and Eul-Ju Seo, M.D.<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Laboratory Medicine, <sup>2</sup>Internal Medicine, University of Ulsan College of Medicine  
and Asan Medical Center, Seoul, Korea

**Background:** Imatinib mesylate, the tyrosine kinase activity of the BCR-ABL fusion gene, induces a remarkable remission in chronic myeloid leukemia (CML) patients. However, resistance to imatinib has been observed in a significant proportion of subjects, with the point mutations of the BCR-ABL kinase domain clinically identified as a possible mechanism. The aim of this study was to investigate clinical resistance to imatinib in Korean CML patients, and search for the point mutation of the BCR-ABL gene. **Methods:** The clinical data and cytogenetic results of thirty two CML patients, who were treated with imatinib, between Jan. 2002 and Aug. 2003, were evaluated. Mutational analyses for the point mutations of the BCR-ABL kinase domain in clinically resistant patients were tested using RT-PCR and direct sequencing methods.

**Results:** Complete hematological remission was obtained in all CML patients with a chronic phase and in 4 of 6 CML with accelerated or blast crisis. However, 4 patients (2 in the chronic phase and 2 with blast crisis) relapsed to blast crisis following continued treatment. A major cytogenetic response was observed in 67% of the chronic phase patients, but in 2, the Philadelphia chromosomes reemerged in a follow-up chromosome study. Mutational analyses showed point mutations in the 351st amino acid of the BCR-ABL kinase domain in 2 patients: M351T, which has previously been reported in many studies, and a novel substitution, M351L.

**Conclusion:** The frequency of imatinib resistance in Koreans was similar to that found in well-controlled western studies. Point mutations of the BCR-ABL kinase domain were detected in two patients. Further studies, with more sensitive methods and a greater number of patients will help reveal other mechanisms of imatinib resistance and establish more effective treatment plans. (*Korean J Hematol* 2005;40:82-92.)

**Key Words:** Chronic myelogenous leukemia, Imatinib resistance, BCR-ABL tyrosine kinase, Point mutation

접수 : 2005년 4월 22일, 수정 : 2005년 5월 19일

승인 : 2005년 6월 15일

교신저자 : 서울주, 서울시 송파구 풍납 2동 388-1

☎ 138-736, 서울아산병원 진단검사의학과

Tel: 02-3010-4510, Fax: 02-478-0884

E-mail: ejseo@amc.seoul.kr

본 연구는 1998년도 한국여자의사회 중외제약학술연구비 지원에 의함.

Correspondence to : Eul-Ju Seo, M.D.

Department of Internal Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center

388-1 Pungnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea

Tel: +82-2-3010-4510, Fax: +82-2-478-0884

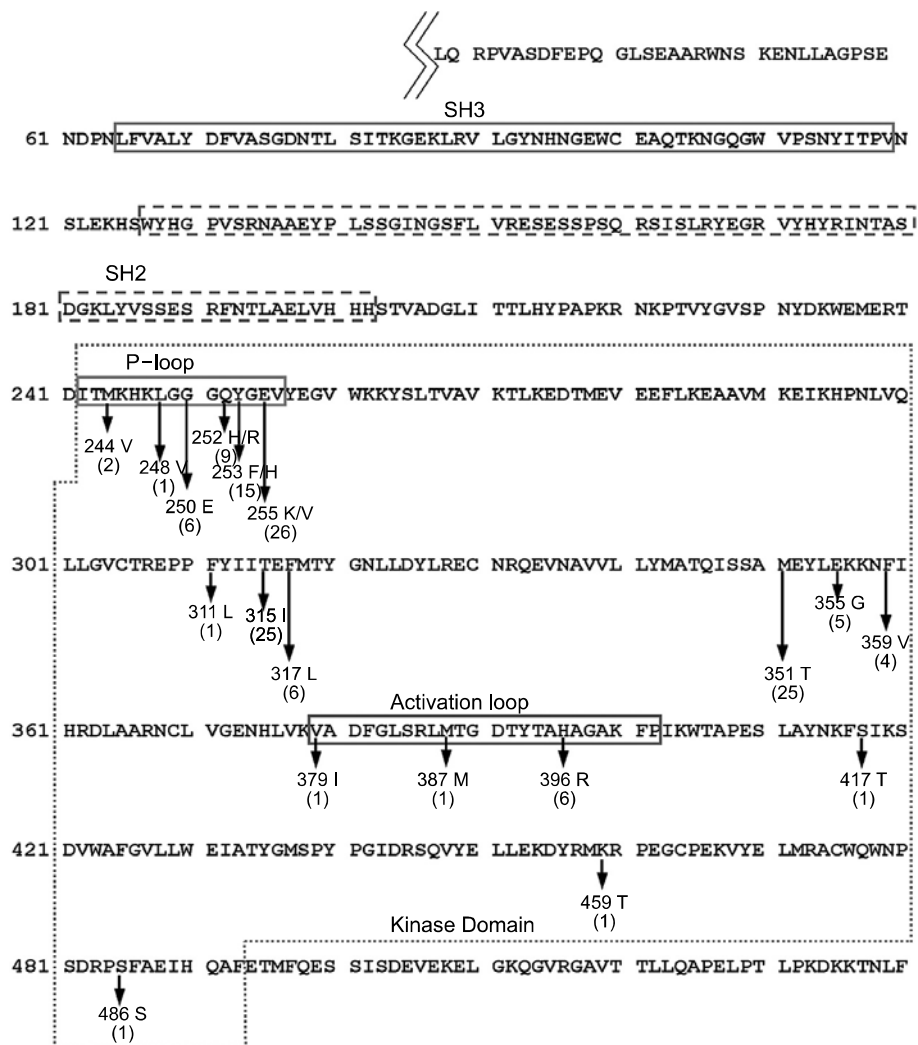
E-mail: ejseo@amc.seoul.kr

## 서론

만성골수성백혈병(chronic myeloid leukemia, CML)은 9번과 22번 염색체 장완 간의 상호전좌에 의하여 발생한 Philadelphia 염색체(Ph), 즉 BCR-ABL 유전자 재배열로 인한 tyrosine kinase의 활성도 증가에 의해 초래되는 조혈모세포 질환이다.<sup>1)</sup> 이러한 병리기전을 토대로 이를 억제하는 새로운 치료제의 개발이 시도되었으며, 2-phenylamino pyrimidine인 imatinib mesylate (Glivec, STI-571)가 Novartis (Basel, Switzerland)에서 개발되었다.<sup>2)</sup> 이 약제를 대상으로 한 in vitro 및 in

vivo 실험에서 imatinib은 BCR-ABL 유전자를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 것으로 밝혀졌으며,<sup>3)</sup> tyrosine kinase의 adenosine triphosphate (ATP) 결합시 경쟁적으로 작용하고,<sup>4)</sup> 선택적으로 apoptosis를 일으켜 BCR-ABL 발현세포의 증식을 억제한다고 알려졌다.<sup>3)</sup> 임상시험 결과 imatinib은 만성기 CML 환자의 95%에서 혈액학적 완전관해(complete hematologic response, CHR)를 유도하고, 60% 정도에서 세포유전학적 주요 관해(major cytogenetic response)를 유도할 뿐 아니라,<sup>5)</sup> 가속기 및 급성기 환자에서도 의미있는 혈액학적 및 세포유전학적 관해소견을 보여 주었다.<sup>6,7)</sup>

Imatinib은 대다수의 환자들에 대해 놀라운 치료효



**Fig. 1.** Amino acid sequences and characteristic domains of BCR-ABL tyrosine kinase and summary of previously reported mutations of BCR-ABL kinase domain in CML patients with imatinib-resistance.<sup>9-16)</sup> The number between parenthesis following each mutation site means total number of patients with the mutation.

과를 보였지만, 급성기와 가속기의 상당수의 환자들 및 만성기의 일부 환자들에서 imatinib에 대해 반응하지 않거나, 반응 후에 재발하는 내성양상을 보여주었다.<sup>5-7)</sup> 또한 세포유전학적 관해가 일어나지 않는 빈도는 이보다 높다.<sup>5-7)</sup> Imatinib 내성에 관한 in vitro 및 in vivo 연구에서 유전자의 증폭(amplification)으로 인한 BCR-ABL 유전자의 과발현, 다약제 내성 유전자1(MDR1) 과발현에 의한 imatinib의 세포내 유입의 감소, ABL의 315번째 아미노산이 threonine에서 isoleucine으로 치환(T315I)된 돌연변이,  $\alpha$ -1 acid glycoprotein (AGP)에 의한 내성기전 등이 제시되었다.<sup>8)</sup>

Imatinib 내성을 보이는 CML 및 Ph 양성 급성림프구성백혈병(acute lymphoblastic leukemia, ALL) 환자를 대상으로 한 연구들에서 BCR-ABL 유전자의 tyrosine kinase를 생성하는 부위의 점 돌연변이들을 내성의 주요한 원인으로 보고하였으며, 이 결과로 발생한 단일 아미노산의 치환이 imatinib의 결합을 저해한다고 하였다(Fig. 1).<sup>9-16)</sup> 여러 연구에서 보고된 BCR-ABL 유전자의 tyrosine kinase 부위의 돌연변이 빈도는 차이가 있었으나, 특정위치의 돌연변이(E255K, T315I, M351T)가 전체의 60% 정도를 차지하였다(Fig. 1). 돌연변이의 발생과 내성에 대한 설명으로, imatinib의 투여로 인해 많은 돌연변이가 일어나기(hypermutable)보다는 치료 전부터 소수 있었던 돌연변이 클론이 imatinib 투여로 인해 우세해서 증식되는 결과로(clonal selection and expansion model) 내성이 일어난다고 설명하였다.<sup>14,15)</sup> Branford 등<sup>16)</sup>은 전향적 연구를 통해 BCR-ABL 유전자의 돌연변이가 관찰된 27명 중 24명(89%)에서 획득 내성이 있다고 보고하였다. 또한 ATP 결합부위(P-loop)에 위치한 돌연변이가 다른 부위에 발생한 돌연변이보다 예후가 좋지 않다고 하였다. 이러한 결과는 BCR-ABL 유전자의 돌연변이가 발생하는 경우 대부분 내성을 일으키므로, 돌연변이가 내성의 직접적인 원인이라는 증거가 될 수 있으며, 돌연변이가 일어나는 위치에 따라 임상적 예후의 차이를 보여주어 돌연변이 위치의 확인이 향후 치료방향 결정 및 예후 판정에 도움을 줄 수 있음을 시사한다.

본 연구는 imatinib을 투여 받은 CML 환자를 대상으로 혈액학적 및 세포유전학적 반응 정도를 조사하여 한국인 CML 환자에서 imatinib의 내성정도를 알아보고, 이 환자 중 혈액학적 및 세포유전학적 내성이 있는 환자들을 대상으로 가장 중요한 기전으로 생각되는 BCR-ABL tyrosine kinase 부위의 돌연변이 여부를 확인해 보고, 그 임상적 의미를 찾고자 하였다.

## 대상 및 방법

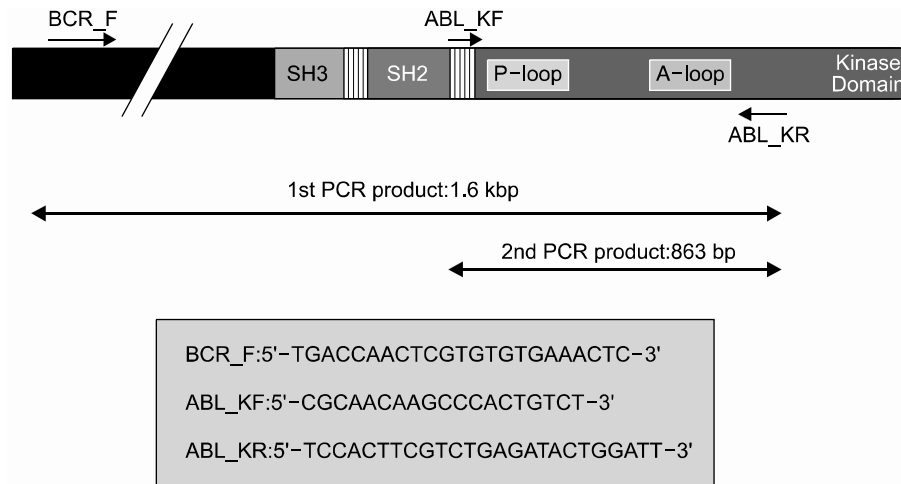
### 1. 환자병력 조사 및 내성여부 확인

울산의대 서울아산병원에서 2002년 1월부터 2003년 8월까지 골수검사 및 세포유전학적 검사가 의뢰된 CML 환자 중 imatinib을 3개월 이상 복용하였던 32명을 대상으로 하였다. 대상 환자의 의무기록지를 조사하여, 연령, 성별, 진찰 소견 및 혈액학적 소견, imatinib 투여기간, 투여량, 치료경과 등을 확인하였다. 진단 당시 및 치료 전후에 골수검사 및 세포유전학적 검사를 시행하였고, International STI571 Study Group의 기준<sup>5)</sup>에 따라 혈액학적 및 세포유전학적 반응도를 확인하였다. 세포유전학적 반응의 확인은 치료 후 3개월 이후 결과를 기준으로 삼았다. 내성여부에 대한 정의는 Branford 등의 기준<sup>16)</sup>을 참조하여 혈액학적 내성은 혈액학적 완전관해가 온 이후, 계속적인 치료에도 불구하고 지속적인 혈액학적 관해의 소실이 있거나, 가속기나 급성기로 진행한 경우로 정의하였다. 세포유전학적 내성의 일차 내성은 세포유전학적 주요관해를 얻지 못한 경우로, 이차 내성은 완전 세포유전학적 관해를 얻은 이후, 이것이 소실된 경우나 Ph 양성 세포가 기존보다 35% 이상 증가한 경우로 정의하였다.

### 2. 돌연변이 검출

혈액학적 및 세포유전학적 내성이 관찰된 환자 중 검체를 얻을 수 있었던 11명을 대상으로 RT-PCR을 시행한 후 직접염기서열 분석(PCR-based sequencing) 방법을 이용하여 BCR-ABL 유전자의 tyrosine kinase 부위의 돌연변이 유무를 확인하였다.

검체는 세포유전학적 내성 결과를 보였던 당시에 채취한 골수검체 또는 혈액학적으로 재발한 당시의 말초혈액을 사용하였으며, 확보된 검체에서 Chomczynski 방법의 변형인 RNA-Bee<sup>TM</sup> (Tel-Test, Inc, Friendswood, Texas, USA)을 이용하여 RNA를 분리하였다. 골수와 말초혈액에서 백혈구를 분리한 후 diethyl pyrocarbonate로 처리된 PBS (DEPC-PBS)로 세척한 다음, 각 검체에 RNA-Bee<sup>TM</sup> 1mL와 chloroform 200  $\mu$ L을 넣고 진탕한 다음, 원심분리한 후 상층액인 RNA를 추출하였다. BCR-ABL RNA 양성 대조군으로 K562 세포주를 사용하여 같은 방법으로 분리하였다. 추출된 RNA를 DEPC-DW에 완전히 녹이고 oligo (dT)<sub>n</sub> primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), dNTP, Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),



**Fig. 2.** Schematic diagram and primers of semi-nested PCR for BCR-ABL tyrosine kinase domain.

RNase inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), DTT, 반응액을 넣고 42°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 70°C에서 15분간 불활성화하여 cDNA를 합성하였다. Housekeeping gene의 하나인 GAPDH 유전자의 PCR을 실시하여 증폭할 수 있는 cDNA의 존재유무를 확인하였다. 합성된 cDNA를 5'-GTGGATATGTTGCCATCA-3', 5'-GACTCCACGACGTACTCA-3' 두가지의 primer로 PCR을 실시하여 220bp의 산물을 전기영동하여 확인한 후, GAPDH 양성인 경우에 semi-nested PCR을 시행하였다. BCR-ABL tyrosine kinase domain의 P-loop부터 activation loop까지 증폭하였는데, PCR에 사용된 primer는 Branford 등이 사용한 것<sup>16)</sup>을 이용하였으며(Fig. 2), 각 단계의 산물의 크기는 1,576bp와 863bp였다. 1단계 PCR의 반응액의 조성은 10X buffer 2  $\mu$ L, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM dNTP, Taq polymerase 1U, primer 10pmol, cDNA 2  $\mu$ L를 넣어 총량이 20  $\mu$ L가 되도록 하였다. 반응은 94°C에서 5분간 변성시키고, 94°C 30초, 64°C 30초, 68°C 3분으로 35회 실시하였다. 2단계 PCR은 1단계 PCR 산물을 10배 희석한 후 2  $\mu$ L을 10X buffer 2  $\mu$ L, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25mM dNTP, Taq polymerase 1U, primer 10pmol에 넣어 총 반응액이 20  $\mu$ L가 되도록 하였다. 반응은 94°C에서 5분간 변성시키고, 94°C 30초, 58°C 30초, 72°C 1분으로 35회 실시하였다. 2단계 PCR 산물 4  $\mu$ L와 loading buffer 1  $\mu$ L를 혼합하여 1.5% agarose gel에서 100V로 20분간 전기영동을 실시하였다. 이 gel을 ethidium bromide에 염색한 후 자외선 하에서 각 분획을 관찰하였다. 각 분획을 agarose gel extraction kit

(iNtRON technology, Seongnam, Korea)를 이용하여 정제한 후, 이 산물을 BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied-Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 sequencing 반응을 시행하였으며, 2단계 PCR에서 사용한 primer를 사용하였다. 반응이 된 산물을 DNA 자동염기서열 분석기(ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Applied-Biosystems, Foster city, CA, USA)에 넣어 염기서열을 분석하였다. 각 분석된 염기서열의 BCR-ABL kinase 부위를 ABL 유전자의 NCBI reference sequence인 NM\_005157 (gi:6382056, Genbank No. M14752)와 비교하여 해석하였다

## 결 과

### 1. 혈액학적 및 세포유전학적 내성 분석

CML 환자 32명이 imatinib을 투여 받을 당시의 병기는 만성기 26명, 가속기 1명, 급성기 5명이었다. Imatinib을 투여 받은 시기는 진단 직후부터 진단 후 27개월까지 다양하였다. 각 환자의 치료기간 및 혈액학적, 세포유전학적 내성을 기술하였다(Table 1, 2). 만성기 환자들은 모두에서 혈액학적 완전관해가 관찰되었고, 추적관찰 동안 2명이 급성기로 진행되어 혈액학적 재발을 보였다. 만성기 환자들 중 21명에서 치료 후 3개월 이후에 염색체 검사가 의뢰되었으며, 세포유전학적 주요관해를 보인 환자는 14명(67%)이었으며, 이 중 10명(45%)에서 세포유전학적 완전관해를 보였다. 나머지 7명은 세포유전학적 일차 내성이 관찰되었으며, 혈액학적 재발이 관찰되었던 2명도 세포유전학적 일차 내성

**Table 1.** Clinical characteristics and hematologic/cytogenetic response to imatinib in chronic phase CML patents

No.	Age /Sex	Stage at start of imatinib <sup>§</sup>	Treatment duration (month)	Hematologic response			Cytogenetic response		Comments
				Initial	F/U	Resistance	Best response (month)	Resistance	
CP1	67/M	Late-CP	5	CHR	CHR	No	Complete (3)	No	
CP2	27/F	Early-CP	7	CHR	CHR	No	Complete (5)	No	
CP3	60/M	Early-CP	27	CHR	CHR	No	Complete (4)	No	
CP4	47/F	Early-CP	17	CHR	CHR	No	Complete (6)	No	
CP5	54/M	Early-CP	13	CHR	CHR	No	Complete (4)	No	
CP6	21/M	Early-CP	19	CHR	CHR	No	Complete (3)	No	
CP7	60/F	Early-CP	6	CHR	CHR	No	Complete (5)	No	
CP8	44/F	Early-CP	5	CHR	CHR	No	Complete (5)	No	Before BMT
CP9	58/F	Early-CP	6	CHR	CHR	No	Complete (4)	Yes (2nd) <sup>†</sup>	
CP10	11/M	Early-CP	13	CHR	CHR	No	Complete (3)	Yes (2nd) <sup>†</sup>	
CP11	35/F	Late-CP	9	CHR	CHR	No	Partial (5)	No	
CP12	67/M	Early-CP	9/(7)*/9	CHR	CHR	No	Partial (4)	No	
CP13	12/M	Early-CP	3	CHR	CHR	No	Partial (3)	No	Before BMT
CP14	48/M	Early-CP	3	CHR	CHR	No	Partial (3)	No	Before BMT
CP15	27/F	Early-CP	6	CHR	CHR	No	Minor (3)	Yes (1st)	
CP16	64/M	Early-CP	5	CHR	CHR	No	Minor (4)	Yes (1st)	
CP17	37/F	Early-CP	15	CHR	BC	Yes	Minor (3)	Yes (1st)	
CP18	41/F	Late-CP	16	CHR	CHR	No	Minimal (6)	Yes (1st)	
CP19	53/M	Late-CP	26	CHR	CHR	No	Minimal (5)	Yes (1st)	Clonal evolution (+ 8)
CP20	41/F	Early-CP	14	CHR	CHR	No	Minimal (5)	Yes (1st)	
CP21	33/M	Early-CP	9	CHR	BC	Yes	No (5)	Yes (1st)	
CP22	62/F	Late-CP	6	CHR	CHR	No	No (2)	ND	
CP23	68/M	Early-CP	1/(7)*/5	CHR	CHR	No	No (2)	ND	
CP24	69/F	Late-CP	13	CHR	CHR	No	NT	ND	
CP25	24/M	Late-CP	19	CHR	CHR	No	NT	ND	
CP26	5/F	Early-CP	3	CHR	CHR	No	NT	ND	Before BMT

\*Skipped period between imatinib treatment period, <sup>†</sup>Patient's initial cytogenetic response (after 4 months) showed complete cytogenetic response, but follow-up after 6 months showed partial response (20%), <sup>‡</sup>Patient's initial cytogenetic response (after 2 and 3 months) showed complete cytogenetic response, but follow-up after 5.5 months showed partial response (20%), after 7 months minimal response (80%), <sup>§</sup>Early-CP defined as <12 months from diagnosis. Late-CP defined as ≥12 months from diagnosis.

Abbreviations: CP, Chronic phase; BC, Blast crisis; NT, Not tested; ND, Not determined; CHR, Complete hematologic response; BMT, Bone marrow transplantation.

을 가지고 있었다. 8명의 환자는 imatinib 투여 6개월 이후에도 추가적인 세포유전학적 검사가 이루어졌으며, 추가적인 염색체 변화(clonal evolution)는 1명에서 imatinib 투여 1년 후에 Ph 음성세포에서 trisomy 8 클론이 관찰되었으나, 다음 1년 후에는 관찰되지 않았다. 세포유전학적 주요관해를 보였던 환자 중 2명에서 추적 세포유전학적 검사 결과 세포유전학적 이차 내성을 나타내었으며, 이들 모두 혈액학적 관해를 유지하고

있는 상태였다.

Imatinib의 조기 치료의 효과를 확인하기 위해 만성기 환자를 진단부터 imatinib 치료 이전까지의 경과기간에 따라, 12개월을 기준으로 조기 만성기(12개월 이내, 19명)와 후기 만성기(12개월 이상, 7명)로 구별하였다. 조기 만성기 환자는 모두 혈액학적 관해를 보였으나 2명에서 혈액학적 재발이 관찰되었다. 세포유전학적 주요관해는 17명 중 12명(71%)에서 관찰되었으

**Table 2.** Clinical characteristics and hematologic/cytogenetic response to imatinib in accelerated phase and blast crisis CML patents

No.	Age /Sex	Stage at start of imatinib <sup>§</sup>	Treatment duration (month)	Hematologic response			Cytogenetic response		Comments
				Initial	F/U	Resistance	Best response (month)	Resistance	
AP1	32/M	AP	27	CHR		CHR	No	No (5)	Yes (1st)
BC1	64/F	M-BC	3.5	CHR		CHR	No	ND <sup>†</sup>	ND
BC2	15/F	B-BC	12	CHR		BC	Yes	No (11) <sup>‡</sup>	Yes (1st)
BC3	69/F	L-BC	9	CHR		BC	Yes	NT	ND
BC4	24/F	M-BC	2/(4)*1	No		BC	Yes	No (2)	ND
BC5	71/F	M-BC	6	No		BC	Yes	NT	ND

\*Skipped period between imatinib treatment period, <sup>†</sup>The quality of bone marrow sample for chromosome study was too poor to decide the cytogenetic response, <sup>‡</sup>Tested with peripheral blood sample.

Abbreviations: AP, Accelerated phase; BC, Blast crisis (M, Myeloid; L, Lymphoid; B, Biphenotypic); NT, Not tested; ND, Not determined; CHR, Complete hematologic response.

**Table 3.** Mutation analysis of BCR-ABL kinase domain in patients with hematologic and cytogenetic resistance

No.	Hematologic response	Cytogenetic response	BCR-ABL mRNA BM/PB	Mutations of BCR-ABL kinase domain
CP 9	CHR	2nd resistance	+/-NT	M351L
CP10	CHR	2nd resistance	-/-	ND
CP15	CHR	1st resistance	-/-NT	ND
CP16	CHR	1st resistance	+/-NT	No
CP17	Relapse to BC	1st resistance	NT/+	No
CP18	CHR	1st resistance	+/+	No
CP19	CHR	1st resistance	+/+	No
CP20	CHR	1st resistance	-/+	No
CP21	Relapse to BC	1st resistance	-/+	No
BC 2	Relapse to BC	1st resistance	NT/+	M351T
BC 4	Refractoriness	1st resistance	NT/+	No

Abbreviations: NT, Not tested; ND, Not determined; CHR, Complete hematologic response.

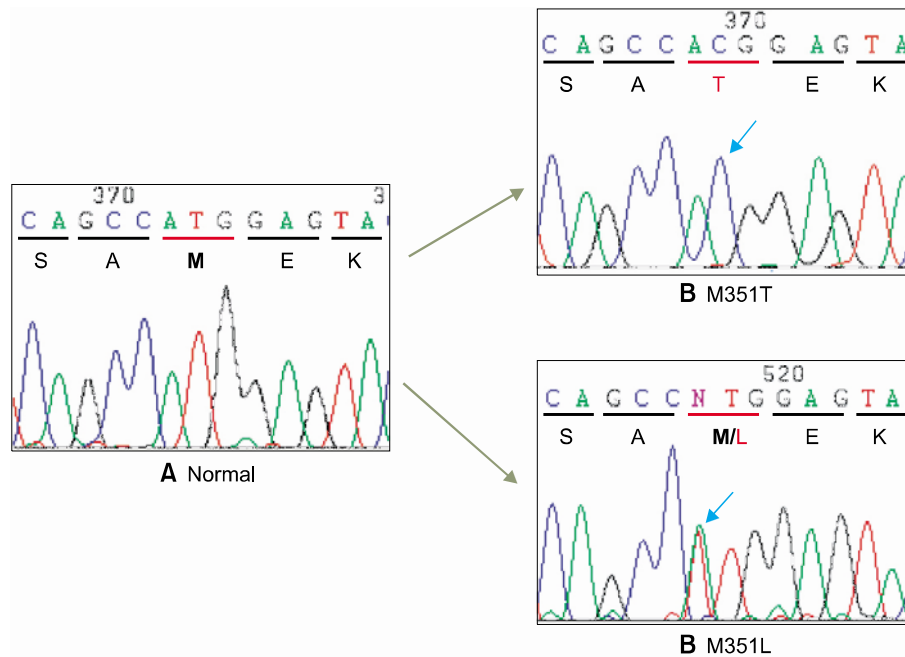
나 이 중 2명은 세포유전학적 재발을 하였다. 후기 만성기 환자는 모두 혈액학적 완전관해를 보였고 재발이 관찰되지 않았다. 세포유전학적 검사를 실시한 4명 중 2명(50%)에서 세포유전학적 주요관해를 보였다. 두 군 사이의 세포유전학적 주요관해의 차이는 유의하지 않았다(Fisher's exact test,  $P=0.574$ ).

가속기 및 급성기 환자 6명 중 imatinib 투여 후 4명(67%)에서 4주 이상 지속되는 혈액학적 완전관해를 보였으나, 이 중 2명에서 재발하였다. 세포유전학적 검사를 시행한 4명의 환자 중 3명에서 세포유전학적 관

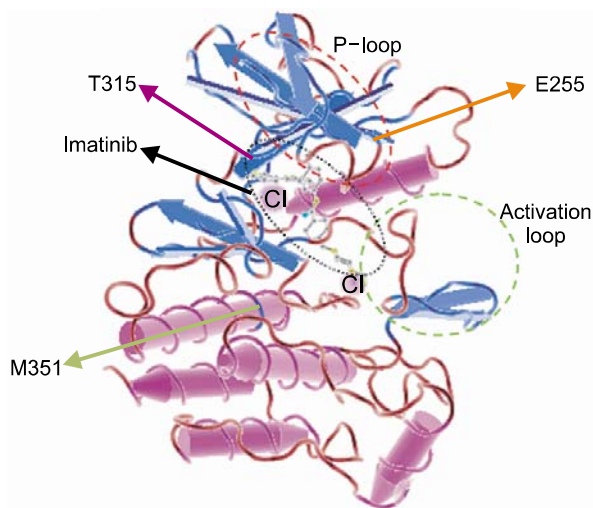
해가 관찰되지 않았으며, 한명은 분석 세포수가 적어서 판단할 수 없었다.

## 2. BCR-ABL 유전자 돌연변이 분석

세포유전학적 내성을 보이거나 혈액학적 내성을 보이는 14명 중 검체가 확보된 11명(혈액학적 내성 4명, 혈액학적 내성이 없는 세포유전학적 일차 내성 5명, 세포유전학적 이차 내성 2명)의 골수 및 말초혈액에서 BCR-ABL 유전자 부위의 돌연변이 여부를 조사하였다 (Table 3).



**Fig. 3.** Sequence analysis of BCR-ABL kinase domain. Normal ABL gene (NM\_005157) has ATG sequence coding for methionine (M) at codon 351 (A). A substitution at codon 351 changed ATG to ACG coding for threonine completely (M351T) in a patient, BC2 (B) and to TTG coding for leucine partially (M351 and M351L) in another patient, CP9 (C).



**Fig. 4.** 3D structure of ABL kinase domain acquired from PDB Number 1IEP using Cn3D program ver 4.1. M351 is not in contact with imatinib and is not within the sequence of P-loop or activation-loop.

RT-PCR을 시행한 후, BCR-ABL mRNA가 증폭되지 않은 2명을 제외한 9명의 염기서열을 분석하였다. 세포유전학적 이차 내성을 가진 2명 중 1명과 혈액학적 내성 환자 4명 중 1명에서 BCR-ABL tyrosine kinase 부

위의 351번째 아미노산이 치환되는 돌연변이가 관찰되었다(Fig. 3, 4). 그 중 후자는 치료당시 가속기였으며, 이후 혈액학적 완전관해상태에 있다가 다시 가속기로 재발하였다. 이 환자의 재발 후의 말초혈액 검체로 염기서열을 분석한 결과 ABL cDNA (NM\_005157)과 비교하였을 때 1,416번째 염기가 thymine에서 cytosine으로 완전히 치환(ATG→ACG; 1426T>C)되어 351번째 아미노산이 methionine에서 threonine으로 치환(M351T)되는 소견이 관찰되었다(Fig. 3B). 다른 1명은 혈액학적 완전관해상태가 유지되고 있었으나, 세포유전학적으로는 완전관해 상태의 소실이 관찰되는 이차 내성을 보이는 환자였다. Ph 양성 염색체가 재출현하였던 골수 검체로 염기서열을 분석한 결과 1,415번째 염기가 adenine에서 thymine으로 치환(ATG→TTG; 1425A>T)되었고, 원래 클론과 치환된 클론의 peak가 같은 크기로 나타나 혼재되어 있는 양상이었다(Fig. 3C). 이로써, 351번째 아미노산이 methionine에서 leucine으로 치환(M351L)된 클론이 있음이 관찰되었다. 그 외 나머지 7명의 경우 BCR-ABL tyrosine kinase 부위의 돌연변이는 관찰되지 않았다.

또한, NM\_005157 염기서열과 비교하였을 때, 1258 (A→G), 1426 (A→G), 1739 (A→G)번째 염기의 변화

가 9명 모두에서 관찰되었으며, 이는 기존에 보고된 SNP (single nucleotide polymorphism)에 해당하는 결과였으며,<sup>13,16)</sup> 모두 동일한 haplotype 양상(G-G-G)을 보여 주었다. 이 SNP들은 한국인에서 특징적으로 관찰되는 소견일 가능성이 있다.

## 고 찰

Imatinib이 CML 환자의 치료에 사용되기 시작되면서 항암치료에 있어서 원인에 대한 치료(target-directed therapy)라는 새 장을 열게 되었다. 그러나 탁월한 치료효과에도 불구하고 imatinib에 대해 내성을 보이는 환자들이 생겨났고, 이를 설명하기 위한 기전으로 BCR-ABL tyrosine kinase 부위의 돌연변이가 그 원인으로 보고되고 있다.

본 연구에서 imatinib으로 치료받은 CML 환자들에 대해 병력을 조사한 결과, 만성기 환자의 100%, 가속기 및 급성기 환자의 67%에서 혈액학적 관해소견을 보였으며, 또한 만성기 환자의 67%에서 세포유전학적 주요 관해 소견을 보였다. 이는 international STI-571 group의 보고<sup>5)</sup>와 유사하였으며, 한국인의 특성이 imatinib의 작용에 영향을 미치지 않는다고 하겠다.

BCR-ABL kinase 부위의 염기서열 분석이 가능하였던 9명의 환자들 중에서 혈액학적 내성이 있던 4명 중 1명, 혈액학적 내성 없이 세포유전학적 내성만 있던 5명 중 1명에서 BCR-ABL 유전자의 점 돌연변이가 관찰되었다. 두 명 모두 ABL 유전자의 351번째 아미노산의 돌연변이가 있었으나, 돌연변이가 일어난 염기의 위치는 1,416번째 thymine이 cytosine으로, 1,415번째 adenine이 thymine으로 바뀌어 아미노산이 각각 threonine (ACG)과 leucine (TTG)으로 치환되었다.

본 연구에서 돌연변이가 관찰된 부위인 351번째 아미노산은 가장 많이 보고되었던 세 가지 위치 중 하나로써 지금까지 25명에서 관찰되었다. 보고<sup>13,15,16)</sup>된 경우는 모두 methionine (ATG)이 threonine (ACG)으로 치환(M351T)되었으며, 본 연구에서도 혈액학적 재발이 있던 환자 1명에서 관찰되었다. 그러나 세포유전학적 재발만 있었던 다른 환자에서는 새로운 돌연변이(M351L)가 발견되었으며, 이는 in vitro 및 환자들을 대상으로 한 연구에서 아직까지 보고되지 않았고, 치환된 아미노산의 차이가 가지는 임상적인 의미도 알려진 바가 없다.

BCR-ABL 유전자의 돌연변이들이 imatinib의 작용을 억제하고, BCR-ABL tyrosin kinase의 재활성화를

일으키는 기전은 단백질의 crystal 구조 연구를 통해 밝혀지고 있다. Schindler 등<sup>17)</sup>과 Nagar 등<sup>18)</sup>의 연구에 의하면, imatinib의 작용기전은 ABL tyrosine kinase의 activation loop (아미노산 서열 381-402)가 불활성화 구조 상태에 있어서 자가인산화(autophosphorylation)를 일으킬 수 없을 때 imatinib이 결합하여 이 상태를 유지시킴으로써 ABL tyrosine kinase의 활성화를 억제한다고 설명하고 있다. 이러한 연구를 바탕으로 하여 환자에서 관찰되었던 BCR-ABL 유전자의 돌연변이를 imatinib의 작용을 억제하는 기전에 따라 크게 3가지로 나눌 수 있다.<sup>19)</sup> 첫째, imatinib이 BCR-ABL tyrosine kinase에 결합하는 부위, 즉 수소 결합이나 Van der Waals 상호작용에 의해 직접 접촉을 하는 부위의 돌연변이(V289A, T315I, F317L 등)는 imatinib의 결합능력을 감소시킨다. 둘째, ATP-결합부위인 P-loop의 돌연변이들(Y253F/H, G250E, E255K, Q252H 등)이 있다. Y253H나 Y253F는 N322 위치의 수소결합을 없애는 것으로 알려져 있으며, G250E는 imatinib-결합 pocket의 입구 역할을 감소시키는 작용을 한다. 마지막으로, activation loop의 돌연변이(H396R 등)는 tyrosine kinase를 불활성화 구조에서 활성화 구조로 전환시켜 결합을 방해할 것이라고 설명하고 있다. 본 연구에서 발견된 351번째 아미노산은 이러한 세 가지 주요한 부위에 위치하지 않는다(Fig. 4). Schindler 등<sup>17)</sup>은 ABL kinase의 모든 부분의 돌연변이가 단백질 구조의 변화를 일으켜 imatinib의 결합을 방해하여 내성을 일으킬 수 있다고 하였다. M351T는 nonpolar 아미노산인 methionine에서 polar 아미노산인 threonine으로 치환되는 것이므로 BCR-ABL kinase 구조 변화에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각하며, 본 연구의 환자에서도 이 치환이 발생함으로써 imatinib 결합에 장애를 주어 혈액학적 내성 원인으로 작용하였을 것으로 생각한다. 본 연구에서 발견된 다른 아미노산 치환인 M351L은 같은 nonpolar 계열인 leucine으로 바뀌는 것이어서 구조적인 영향이 덜할 것으로 예상되어, 실제 내성을 일으키는 지는 불확실하다. Azam 등<sup>20)</sup>이 in vitro mutagenesis로 M351T와 M351I를 만들었는데, cellular IC<sub>50</sub> ( $\mu$ M)이 M351T는 4.9, M351I는 1.6으로 차이를 보였다. Isoleucine이 leucine과 유사한 nonpolar 구조임을 감안할 때, M351L 치환의 경우 실제 내성에 미치는 영향은 작을 것으로 추측된다. Corbin 등<sup>21)</sup>은 혈중 농도보다 낮은 IC<sub>50</sub>을 가지는 여러 돌연변이들이 imatinib에 감수성이 있다고 보고하였으며, 일시적으로 감수성이 떨어져 내성이 발생하였다면 용량의 증가가 도움이 될 수 있을 것이라

하였다. 그러므로 M351L 치환이 관찰된 환자는 아직 혈액학적 재발이 일어나지 않은 상태이고, 추후 이 환자에서 혈액학적 내성이 관찰될지는 불확실하며, 추적 관찰을 통해 혈액학적 내성 유무 및 돌연변이 변화 등을 관찰할 필요가 있다.

염기서열 분석이 가능했던 환자들 중 나머지 환자에서는 돌연변이가 관찰되지 않았다. 다른 연구<sup>9-16)</sup>에 비해 돌연변이의 빈도가 낮은 것은, 다른 연구들이 급성기 환자 또는 ALL의 치료 후 재발하였던 환자들을 다수 포함하였던 것과 달리 본 연구는 주로 만성기 환자들을 대상으로 하였기 때문에 환자군 선정에 의한 차이가 한 가지 원인일 수 있다. 본 연구에서 염기서열 분석이 가능한 2명의 급성기 환자 중 한명만 재발한 환자였으며 이 경우 돌연변이가 관찰되었다. 만성기 상태에서 치료 후 혈액학적 내성이 있었던 2명에서 돌연변이가 관찰되지 않았는데, 이는 혈액학적 내성의 대부분이 돌연변이가 원인이라는 Shah의 보고<sup>15)</sup>와 일치하지 않는다. 그러나 2명 모두 조기 만성기 환자(진단 후 12개월 내 imatinib 투여)였으며, 이것은 조기 만성기에서 내성의 원인으로 돌연변이가 한명도 관찰되지 않았던 Branford 등의 결과<sup>16)</sup>와 일치한다. Imatinib 초기 치료에서 드물지만 내성이 발생한 경우는 BCR-ABL 유전자의 돌연변이에 의한 것이 아닌 다른 원인의 가능성을 제시한다. 본 연구에서 만성기 CML 환자에서 조기 치료군과 후기 치료군을 비교한 결과, 혈액학적 세포유전학적 관해에 유의한 차이가 없었다. 그러나 조기 치료군 환자 중 혈액학적 재발이 2명에서, 세포유전학적 재발이 2명에서 관찰되었고, 후기 치료군에서는 관찰되지 않았다. 후기 치료군의 관찰수가 적어서 비교하기에 문제가 있으며, 추후 많은 관찰수를 통한 연구에서 결과를 재확인하여야 하겠다.

서론에 기술한 치료 전 클론의 expansion model이 일반적인 가설로서 받아들여지면서, 치료 전 소량의 클론을 확인하기 위한 여러 가지 방법이 제시되었다. Shannon<sup>22)</sup>은 PCR-SSCP나 DHPLC 방법이 5%의 돌연변이 클론을 검출할 수 있다고 소개하였고, 다른 연구에서는 ASO-PCR,<sup>14)</sup> PNA-based PCR clamping technique<sup>23)</sup> 등을 이용하였으며, 검출의 예민도가 높아지면서 대상 검체를 mRNA가 아닌 DNA를 이용하여 치료 전 클론을 확인하려는 방법도 시도되었다. 이러한 검사방법이 발전되어 실제 검사실에서 imatinib을 투여하기 전에 치료 전 돌연변이 클론을 확인할 수 있다면, 병합치료나 신약 등 치료방향의 결정에 도움을 줄 수 있을 것이다. 본 연구에서 돌연변이가 관찰되었던 2명의 환자들

도 치료 전에 돌연변이 클론이 있었는지를 예민한 방법으로 확인해 볼 필요가 있다.

예민도를 높이기 위해 Shah 등<sup>15)</sup>은 치료 전 검체가 아닌 내성 당시의 검체에서 BCR-ABL 유전자의 돌연변이를 검출하기 위해 클로닝을 이용하였다. Branford 등<sup>16)</sup>은 이를 위해 RNA의 질을 중요시했으며, 이것이 나쁜 경우 검사에서 배제시킬 것을 강조하였다. 본 연구에서는 직접 염기서열 분석방법만을 실시하였고, 이는 돌연변이를 가진 클론이 소량 있는 경우에는 검출해 내기 어려운 단점이 있다. 본 연구의 일부 검체에서 RT-PCR 산물을 얻기가 어려웠는데, 이는 imatinib 치료 후 골수와 말초의 세포수가 절대적으로 감소하고 BCR-ABL 양성 세포수도 현저히 줄어든 상태에서 1576 bp의 긴 염기서열을 증폭하기에는 BCR-ABL mRNA의 양이 절대적으로 부족하기 때문으로 생각한다.

BCR-ABL 유전자의 돌연변이에 대한 연구가 활발하게 이루어졌음에도 imatinib의 내성을 모두 설명할 수는 없다. 일차적 혈액학적 내성이나 세포유전학적 내성을 보이면서 혈액학적 관해를 보인 환자에서 BCR-ABL 유전자의 돌연변이의 빈도가 상당히 낮았으므로, 이런 환자에서 다른 기전이 주요한 역할을 할 것이다. Gorre 등<sup>11)</sup>과 Hochhaus 등<sup>14)</sup>은 내성이 있는 환자의 상당수에서 BCR-ABL 유전자의 증폭(amplification)을 관찰하였으며, 내성의 원인 중 하나로서 설명하였다. 본 연구에서 돌연변이가 관찰되지 않은 나머지 환자들에 대해 추가적으로 BCR-ABL 유전자의 증폭에 대해 조사해 볼 필요성이 있다. 또한 Hochhaus 등<sup>14)</sup>은 내성이 발생한 CML 환자 중 세포유전학적 검사가 가능한 36명 중 19명에서 추가적인 염색체 변화(clonal evolution)가 일어났다고 하였다. BCR-ABL 유전자의 돌연변이가 없는 내성환자 6명에서 BCR-ABL kinase 활성도의 재증가가 관찰되지 않았지만 이 중 2명에서 추가적인 염색체 변화가 있다고 했다. 이것은 BCR-ABL tyrosine kinase가 imatinib에 의해 잘 억제되어도 내성이 일어날 수 있는 가능성을 보여주었다. Markel 등<sup>24)</sup>은 imatinib 투여 중인 환자 102명 중 15명에서 추가적인 염색체 변화를 관찰하였고 이 중 10명은 혈액학적 완전관해상태에 있었다. 이들에서 예후의 차이가 있었고, 추가적인 염색체 변화는 질병 진행의 위험인자로 작용하므로 혈액학적 완전관해 상태에서 세포유전학적 검사의 필요성을 강조하였다. 본 연구에서는 만성기 환자 한명이 세포유전학적 내성 상태에서 Ph 음성 세포의 일부가 trisomy 8을 가지고 있었고 1년 후 소실되었는데, 이 경우 내성과의 연관성은 명확하지 않다.

본 연구의 결과 imatinib 사용 후 발생한 내성의 빈도는 다른 보고와 유사하였으나, 그 병리 기전의 하나인 돌연변이의 빈도는 낮았다. 돌연변이의 검출 빈도를 높이기 위해 검체 및 검사법의 예민도를 높여서 추가적인 검사를 시행할 필요가 있으며, imatinib 내성에 대한 다른 원인에 대한 부가적인 연구가 요구된다. 또한 imatinib 치료 후 주기적인 세포유전학적 검사가 내성 기전에 대한 이해 및 예후판정에 도움을 줄 것으로 사료된다.

## 요 약

**배경:** BCR-ABL 유전자 재배열로 인해 비정상적으로 활성화된 tyrosine kinase를 목표로 하는 imatinib mesylate는 만성골수성백혈병 환자에서 탁월한 치료효과를 보여주었다. 그러나 일부환자에서 imatinib에 대해 내성을 나타내었으며, BCR-ABL 유전자의 돌연변이가 주요 원인으로 알려지고 있다. 본 연구는 한국인 만성골수성백혈병 환자를 대상으로 imatinib의 내성 빈도를 알아보고 BCR-ABL 유전자의 돌연변이를 확인하고자 하였다.

**방법:** 울산의대 서울아산병원에서 2002년 1월부터 2003년 8월까지 골수검사 및 세포유전학적 검사가 의뢰된 CML 환자 중 imatinib을 3개월 이상 복용하였던 32명을 대상으로 혈액학적 및 세포유전학적 내성 정도를 알아보았다. 내성을 보였던 환자들을 대상으로 RT-PCR 및 직접염기서열분석법을 이용하여 BCR-ABL kinase domain의 돌연변이를 조사하였다.

**결과:** 만성기 환자 모두와 가속기 및 급성기 환자의 67%에서 혈액학적 완전관해가 관찰되었고, 추적관찰 동안 4명(만성기 2명, 급성기 2명)이 재발하였다. 만성기 환자의 67%가 세포유전학적 주요관해를 보였고, 이 중 2명은 추적검사에서 세포유전학적 재발을 하였다. 돌연변이 분석 결과 2명에서 BCR-ABL kinase domain의 351번째 아미노산이 치환되는 돌연변이가 관찰되었으며, 여러 차례 보고되었던 M351T와 처음 발견된 M351L이었다.

**결론:** 한국인에서 imatinib 내성이 다른 보고와 비슷한 빈도로 보고되었으며, BCR-ABL kinase domain의 돌연변이가 병리기전으로 일부 관찰되었다. 추후 내성의 여러 기전을 포함한 계획적이고 광범위한 연구가 진행되어야 한다.

## 참 고 문 헌

- 1) Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999;340:1330-40.
- 2) Druker BJ. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell* 2002;1:31-6.
- 3) Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2:561-6.
- 4) Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996;56:100-4.
- 5) Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al; International STI571 CML Study Group: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2002;346:645-52.
- 6) Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344:1038-42.
- 7) Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 2002;99:1928-37.
- 8) von Bubnoff N, Peschel C, Duyster J. Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia* 2003;17: 829-38.
- 9) Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001; 293:876-80.
- 10) Barthe C, Gharbi M, Lagarde V, et al. Mutation in the ATP-binding site of BCR-ABL in a patient with chronic myeloid leukaemia with increasing resistance to STI571. *Br J Haematol* 2002;119:109-11.
- 11) Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 2002;99:3472-5.

- 12) von Bubnoff N, Schneller F, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia to STI-571: a prospective study. *Lancet* 2002;359:487-91.
- 13) Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 2002;16:2190-6.
- 14) Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Gradel-Duflos N, et al. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002;100:1014-8.
- 15) Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002;2:117-25.
- 16) Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003;102:276-83.
- 17) Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of Abelson tyrosine kinase. *Science* 2000;289:1938-42.
- 18) Nagar B, Hantschel O, Young MA, et al. Structural basis of the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 2003;112:859-71.
- 19) Gambacorti-Passerini CB, Gunby RH, Piazza R, Galletta A, Rostagno R, Scapozza L. Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *Lancet Oncol* 2003;4:75-85.
- 20) Azam M, Latek RR, Daley GQ. Mechanisms of autoinhibition and STI-571/Imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 2003;112:831-43.
- 21) Cobin AS, La Rosee P, Stofferger EP, Druker BJ, Deininger MW. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 2003;101:4611-4.
- 22) Shannon KM. Resistance in the land of molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2:99-102.
- 23) Kreuzer KA, le Coutre P, Landt O, et al. Preexistence and evolution of imatinib mesylate-resistant clones in chronic myelogenous leukemia detected by a PNA-based PCR clamping technique. *Ann Hematol* 2003;82:284-9.
- 24) Marktel S, Marin D, Foot N, et al. Chronic myeloid leukemia in chronic phase responding to imatinib: the occurrence of additional abnormalities predicts disease progression. *Haematologica* 2003;88:260-7.