

Мониторинг минимальной остаточной болезни в перспективе лечения острых лимфобластных лейкозов у детей

Е.С.Захарова^{1,2,3}, Н.В.Гнучев², Г.П.Георгиев², С.С.Ларин^{1,2}

¹Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

²Институт биологии гена РАН, Москва, Российская Федерация;

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Научно-исследовательский институт трансляционной медицины, Москва, Российская Федерация

Лечение и диагностика острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) у детей достигли большого прогресса в последние годы. Разработаны высокоэффективные протоколы лечения ОЛЛ, позволяющие достичь ремиссии у более 90% пациентов. Исследование уровня минимальной остаточной болезни (МОБ) позволяет отнести пациента к определенной группе риска, что предполагает конкретную схему терапии, а также выбрать оптимальные сроки для проведения трансплантации костного мозга (ТКМ). Образцы костного мозга (КМ) МОБ-положительных пациентов очень важны для выяснения механизмов устойчивости опухоли к терапии. Внедрение методов нового поколения (высокопроизводительное секвенирование, протеомика, биоинформатика) позволит выявить дополнительные генетические и белковые маркеры, связанные с повышенным уровнем МОБ, что, в свою очередь, может привести к созданию новых эффективных маркеров и таргетных терапевтических препаратов.

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь (МОБ), острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), полимерно-цепная реакция (ПЦР), проточная цитометрия, реаранжировки генов иммуноглобулинов и T-клеточного рецептора

Для цитирования: Захарова Е.С., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Мониторинг минимальной остаточной болезни в перспективе лечения острых лимфобластных лейкозов у детей. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2016; 15(4): 34–41. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-34-41

Monitoring of minimal residual disease in the perspective of treatment of acute lymphoblastic leukemias in children

E.S.Zakharova^{1,2,3}, N.V.Gnuchev², G.P.Georgiev², S.S.Larin^{1,2}

¹Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation;

³N.I.Pirogov Russian National Research Medical University, Research Institute of Translational Medicine, Moscow, Russian Federation

Treatment and diagnosis of acute lymphoblastic leukemias (ALL) in children have achieved much progress in the past years. Highly effective protocols for treatment of ALL have been developed, permitting to obtain remission in more than 90% of patients. Study of the level of minimal residual disease (MRD) permits to refer a patient to a certain group of risk, requiring a particular scheme of therapy and also to choose the optimal terms for bone marrow transplantation (BMT). Bone marrow (BM) samples of MRD-positive patients are very important for clarification of the mechanisms of tumour resistance to therapy. Introduction of new generation methods (high throughput sequencing, proteomics, bioinformatics) will permit to determine additional genetic and protein markers associated with higher levels of MRD, which in its turn might lead to creation of new effective markers and target therapeutic preparations.

Key words: minimal residual disease (MRD), acute lymphoblastic leukemia (ALL), polymerase chain reaction (PCR), flow cytometry, immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement

For citation: Zakharova E.S., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Larin S.S. Monitoring of minimal residual disease in the perspective of treatment of acute lymphoblastic leukemias in children. Vopr. gematol./onkol. immunopatol. pediatri. (Pediatric Haematology/ Oncology and Immunopathology). 2016; 15(4): 34–41. DOI: 10.20953/1726-1708-2016-4-34-41

Для корреспонденции:

Захарова Елена Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генной терапии Института биологии гена РАН, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

Телефон: (499) 135-9970

E-mail: eszakh@gmail.com

Статья поступила 05.07.2016 г., принята к печати 22.12.2016 г.

For correspondence:

Elena S. Zakharova, PhD in biology, senior research fellow at the laboratory of gene therapy, Institute of Gene Biology RAS, senior research fellow at the laboratory of molecular immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology, senior research fellow at the laboratory of molecular oncology, N.I.Pirogov Russian National Research Medical University

Address: 34/5, ul. Vavilova, Moscow, 119334, Russian Federation

Phone: (499) 135-9970

E-mail: eszakh@gmail.com

The article was received 05.07.2016, accepted for publication 22.12.2016

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) – самое распространенное онкологическое заболевание у детей. В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями детского населения России (0–17 лет) в 2013 г. удельный вес гемобластозов составил 44,5%, среди которых большую долю составляют В- и Т-клеточные ОЛЛ [1]. Бурное развитие в последние десятилетия терапевтических подходов лечения ОЛЛ у детей позволяет достичь ремиссии у более 90% пациентов. Основным терапевтическим решением остается высокодозная полихимиотерапия.

Диагноз ОЛЛ объединяет группу генетически-гетерогенных заболеваний. Причиной ОЛЛ является набор генетических изменений в предшественниках лимфоцитов, которые блокируют дифференцировку В- или Т-предшественников и обеспечивают им выживание и пролиферацию. Генетические дефекты, включающие транслокации, анеуплоидность, мутации в генах, и эпигенетические факторы приводят к появлению ОЛЛ с различным генотипом и, как следствие, с различными клиническими особенностями и различным ответом на проводимую терапию. Общеизвестным мощным прогностическим признаком является минимальная остаточная болезнь (МОБ). Во многих странах мира лечение детских ОЛЛ сопровождается мониторингом МОБ [2, 3].

Под МОБ понимают оставшееся после терапии количество опухолевых клеток, которое невозможно оценить классическими морфологическими методами. Уровень МОБ позволяет в рамках протокола лечения разделять пациентов на группы риска, для каждой из которых применяется своя схема лечения. Для измерения МОБ разработан набор методов: проточная цитометрия, ПЦР-анализ, высокопроизводительное геномное секвенирование [4]. Однако валидированными и самыми распространенными в клинике на настоящее время являются 4–6-цветовая проточная цитометрия и ПЦР в реальном времени с использованием продуктов реаранжировки генов антигенраспознающих рецепторов.

1. Методы определения МОБ

Традиционный метод диагностики ОЛЛ и оценки ответа пациента на терапию – это цитоморфология с использованием микроскопии. Данная технология позволяет обнаружить одну и более клеток на фоне 100 здоровых (1% и выше). Развитие современных технологий привело к созданию новых методов детекции оставшихся лейкоэмических клеток с чувствительностью 0,01–0,001% и выше.

Методы, применимые для детекции МОБ, должны с высокой точностью отличать раковую клетку, способную изменяться в процессе терапии, от нормальной, меняющейся по многим параметрам в процессе созревания. К таким методам на настоящий момент можно отнести проточную цитометрию с использованием множественных поверхностных маркеров, количественный ПЦР-анализ гибридных транскриптов, количественный ПЦР-анализ продуктов реаранжировки генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора и высокопродуктивное секвенирование [4]. Методы должны быть стандартизированы и воспроизводиться в разных лабораториях. Наибольшее распространение в клинике получили два метода: классическая многоцветовая (4–6 цветов)

проточная цитометрия и количественный ПЦР-анализ продуктов реаранжировки генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора.

1.1. Классическая многоцветная проточная цитометрия

В основе этого метода лежит отличие опухолевого иммунофенотипа от иммунофенотипа обычных клеток. Данный метод позволяет получить результаты в течение одного рабочего дня. В качестве биологического материала используют свежий костный мозг (КМ). Метод позволяет детектировать необычные иммунофенотипы лимфоцитов, тем самым получается дополнительная информация о лейкозном клоне. Метод требует специалистов высокой квалификации в применении его для разных вариантов ОЛЛ.

1.2. Детекция химерных транскриптов

Около 40% ОЛЛ имеют стандартные транслокации (BCR-ABL1, ETV6-RUN1 и другие), в результате которых образуются гибридные гены и, как следствие, гибридные транскрипты. Существование таких транскриптов используется для оценки МОБ методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией, нацеленной на химерный транскрипт. В европейской практике проводится мониторинг МОБ с использованием BCR-ABL1 химерного транскрипта BCR-ABL1 (6% детских ОЛЛ) [5]. Данная транслокация ассоциирована с плохим прогнозом для пациентов, поэтому для таких пациентов разработан специальный метод детекции МОБ.

1.3. Количественная ПЦР с использованием продуктов реаранжировки генов иммуноглобулина и Т-клеточного рецептора

В основе метода лежат молекулярно-биологические процессы формирования функциональных генов антигенраспознающих рецепторов при созревании лимфоцитов. Функциональные гены иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора образуются при созревании лимфоцитов путем соединения генных сегментов (V-D-J рекомбинация) на границах соединения сегментов образуются гетерогенные по размеру и составу участки ДНК. Для каждого лимфоцита характерна своя уникальная конфигурация функциональных генов иммуноглобулинов (для В-клеток) и Т-клеточного рецептора (для Т-клеток). В геноме лейкозного клона могут быть одновременно перестроены локусы обоих антигенраспознающих рецепторов. Для определения МОБ применяют количественную ПЦР и с использованием аллель-специфичных праймеров (ASO) на соединительные области функциональных генов антигенраспознающих рецепторов. Данный метод широко применяется для определения МОБ во многих странах. Метод разработан и стандартизован в рамках европейских программ BIOMED-1 и BIOMED-2 [6, 7], позднее объединенных под названием EuroMRD (www.EuroMRD.org). Группа европейских лабораторий провела большую работу по стандартизации данного метода и внедрению его в клиническую практику. Метод получил большое распространение благодаря своей высокой чувствительности (0,01–0,001%), стандартизованности и надежности, применяется в 60 лабораториях разных стран [4]. В настоящее время в большинстве публикаций по клиническим исследованиям

Таблица. Сравнение методов детекции МОБ

	ПЦР-анализ соединительных областей генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора	ПЦР-анализ BCL-ABL транскриптов	Проточная цитометрия
Чувствительность	10^{-4} – 10^{-5}	10^{-4} – 10^{-6}	10^{-3} – 10^{-4}
Границы применения	В-ОЛЛ: 90–95% Т-ОЛЛ: 90–95%	ОЛЛ с транслокациями BCL-ABL (5–8% детей)	В-ОЛЛ: 80–95% Т-ОЛЛ: 90–95%
Достоинства	Высокая чувствительность Высокая степень стандартизации Хорошо исследованный инструмент стратификации в различных клинических испытаниях Много опубликованных данных по принятию клинических решений: • применим к большинству пациентов с ОЛЛ; • стабильность субстрата реакции – ДНК	Высокая чувствительность Стабильность мишени в течение терапии Быстрый в исполнении Относительно недорогой	Применим к большинству пациентов с ОЛЛ Количественный Быстрый в исполнении Дополнительная характеристика доброкачественных клеток Дополнительная характеристика опухолевых клеток Быстро развивающаяся стандартизация
Недостатки	Требуются трудозатраты и время на подбор мишеней Потенциальная нестабильность мишеней (клональная эволюция) Относительно дорогой Длительность исполнения Требует высококвалифицированного персонала	Применим только к пациентам с транслокациями BCL-ABL Нестабильность субстрата анализа РНК Вариации в уровне транскрипции Необходима стандартизация	Часто низкая чувствительность из-за экспансии В-предшественников и низкой клеточности во время и после индукции Относительно дорогой (цена зависит от количества маркеров и качества используемых цитометров) Нестабильность иммунофенотипа в течение лечения Для более точной характеристики клеток требуется использование более 6 цветов

по терапии ОЛЛ с использованием МОБ применялся именно этот метод.

С использованием полного спектра мишеней метод может быть применим к 90–95% всех пациентов с ОЛЛ [8, 9]. Для избегания ложноотрицательных результатов из-за потери мишени для каждого пациента выбирают 2–3 чувствительных мишени. Метод требует высококвалифицированных специалистов и времени (около 2–3 нед) на проведение анализа.

Сравнительные характеристики методов приведены в таблице.

1.4. Новые технологии детекции МОБ

Новые технологии активно развиваются, учитывая потребности клиники. Так, в области детекции МОБ можно отметить два быстро развивающихся в последние годы подхода. Это дальнейшее развитие многоцветной проточной цитометрии и применение высокопроизводительного геномного секвенирования [4]. Оба развивающихся направления используют опыт, полученный при использовании вышеперечисленных классических методов.

Увеличение количества маркеров в проточной цитометрии от 4–6 до 8–10 и более позволяет увеличить чувствительность проточной цитометрии и уменьшить количество ложноотрицательных результатов. Такой анализ позволяет получить больше информации о каждом лейкозном клоне.

Применение платформ высокопроизводительного геномного секвенирования и программного приложения для анализа соединительных областей антигенраспознающих рецепторов позволяет измерять уровень МОБ без использования количественной ПЦР, в таком случае нужно секвенировать первичный образец и образец после лечения. Возможен вариант совместного использования высокопроизводительного геномного секвенирования и количественной ПЦР. Секвенированию подвергается первичный образец, на основе знаний о последовательности создаются ASO-праймеры,

которые в дальнейшем используются в количественной ПЦР по схеме, описанной выше.

Оба метода имеют хорошие перспективы, но пока не нашли широкого клинического применения из-за высокой стоимости анализа.

2. Внедрение МОБ в клинику. Европейский опыт

Мониторинг МОБ был впервые использован в исследовании ALL-BFM 90 с применением ПЦР на соединительные области иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора (молекулярный метод). Было предложено на основании уровня МОБ в КМ на 33-й и 78-й дни после начала терапии разделить пациентов на три группы риска. МОБ была признана превосходящим все другие клинические данные прогностическим параметром в исследовании на 240 пациентах [10]. Сделанные выводы были подтверждены другими авторами [11]. После 10 лет наблюдения эти данные остались в силе [12].

Авторами предложен ясный количественный критерий разделения пациентов на группы риска по результатам МОБ [12]. Следует отметить, что по сравнению с распределением пациентов на группы риска по традиционным критериям (возраст, количество blasts, цитогенетика, ответ на преднизолон), между группами произошли перемещения пациентов (из низкого риска в высокий и наоборот) [13].

Определение МОБ молекулярным методом было положено в основу более широких терапевтических исследований. В исследование “Associazione Italiana di Ematologia Oncologia Pediatrica and the BFM-ALL Group (AIEOPBFM ALL 2000)” вошли более 4000 пациентов за 2000–2006 гг. С самого начала новых исследований особое внимание уделялось стандартизации внедряемых молекулярных методов [5, 6, 14]. Осознав важность такого рода исследований, опыт был расширен до международного мультицентрового исследования “International BFM Study Group (I-BFM-SG)” [12].

МОБ-стратификация с использованием двух и более чувствительных мишеней (10^{-4}) была применима к 80% пациентов. По крайней мере, 1 мишень была возможна для 94% пациентов с В-ОЛЛ и 82% Т-ОЛЛ. Пациентов, у которых не смогли померить МОБ, стратифицировали по традиционным параметрам. МОБ измеряли на 33-й и 78-й дни в 7 лабораториях. Стратификация выполнялась на 13–14-й неделе от начала лечения. В результате “AIEOP-BFM ALL 2000” 3184 пациент с В-ОЛЛ и 464 пациента с Т-ОЛЛ были успешно стратифицированы согласно МОБ-критерию (молекулярный метод) [12, 15].

Таким образом, было показано, что при обеих формах лейкоза (В и Т) наблюдается хороший результат бессобытийной 7-летней выживаемости в группе стандартного риска. Хорошие результаты были получены и для других групп. Исследование показало, что у пациентов с Т-ОЛЛ уменьшение количества лейкозных клеток идет с задержкой по сравнению с В-ОЛЛ. Если у пациента с Т-ОЛЛ нет лейкозных клеток на 33-й день – он имеет очень хороший прогноз. Более того, 32% всех Т-ОЛЛ пациентов в группе промежуточного риска с низким МОБ-положительным результатом на 78-й день тоже имеют хороший прогноз. Из этого можно заключить, что значение МОБ на 33-й день клинически более важно для В-ОЛЛ, чем для Т-ОЛЛ. Показано, что большее количество остаточных лейкозных клеток ($\geq 10^{-3}$) увеличивает вероятность рецидива Т-ОЛЛ пациентов [12].

Исследование “AIEOP-BFM ALL 2000” установило международный стандарт для стратификации детей с ОЛЛ. Прогноз на основе МОБ показал превосходство над всеми остальными критериями. Этот вывод сделан на основании ряда независимых исследований. Что примечательно, это справедливо для детей и для взрослых, несмотря на то, что патогенез ОЛЛ (включая молекулярно-генетический патогенез) очень разный в двух возрастных группах [16–19]. Важно подчеркнуть, что МОБ – это независимый от других фактор, имеющий терапевтическое значение.

Мониторинг МОБ для детей включен в обязательный диагностический репертуар для пациентов, проходящих лечение по протоколам BFM-ALL в Германии и ряде других стран. На первых этапах применения МОБ исследования финансировались из грантов German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe). Теперь затраты на эту диагностику покрываются Немецкими нормативными медицинскими страховыми компаниями.

3. Клинически значимый уровень МОБ и согласованность данных МОБ, полученных разными методами

МОБ-мониторинг завоевал свое место в клинике, но возникли вопросы: какой метод измерения МОБ предпочтительней и какой уровень МОБ является клинически значимым. Исторически сложилось, что молекулярный метод был создан и получил первое распространение в Европе, а проточная цитометрия – в США. Однако сейчас оба метода широко применяются в клиниках всего мира.

Любой метод детекции МОБ имеет свой уровень чувствительности, и детекция опухолевых клеток напрямую связана с уровнем чувствительности применяемого метода в каждом конкретном случае. Так, чувствительность проточной цито-

метрии зависит от количества клеток, вносимых в анализ, чувствительность ПРЦ зависит от выбранного аллель-специфичного праймера и генетической мишени. Поэтому, по мере накопления опыта, пациентов стали делить на положительных и отрицательных с использованием порогового значения МОБ 0,01% (это чувствительность, наиболее достижимая на практике) [20–23].

Для сравнения двух методов детекции МОБ (в перспективе их рутинного и самостоятельного применения) в исследовании “AIEOP-BFM ALL 2000” уровень МОБ измеряли двумя классическими методами (молекулярный и проточная цитометрия) для 3565 образцов от 1547 пациентов, включенных в протокол на 15-, 33- и 78-й день индукционной терапии. Для более реалистичного сравнения методов было введено пороговое значение уровня МОБ – 0,01%. Все пациенты с МОБ $>0,01\%$ считались МОБ-положительными, с МОБ $<0,01\%$ – МОБ-отрицательными. При таком подходе совпадение двух методов составило 80%. Совпадение было выше на 15- и 78-й дни (86 и 87% соответственно), чем на 33-й день (70%). Самое низкое совпадение было для Т-ОЛЛ [24].

Наибольший процент несовпадений между ПЦР и проточной цитометрией для В-ОЛЛ был на 33-й день. Для дальнейшего анализа пациентов разделили на 4 подгруппы с совпадающими или несовпадающими результатами МОБ. Хорошие результаты по 5-летней бессобытийной выживаемости (91,6%) были получены для согласованно негативных пациентов (564 пациента) и плохой исход (50,9% выживаемости) – для согласованно позитивных пациентов (223 пациента) [24].

Интересно, что пациенты из двух не совпадающих по результатам МОБ групп показали различные результаты по пятилетней выживаемости. Лучший процент пятилетней выживаемости 77,1% был достигнут в группе ПЦР-позитивных, но и негативных по проточной цитометрии пациентов. Пятилетняя выживаемость в группе позитивных по проточной цитометрии и негативных по ПЦР пациентов составила 50,9%. Частично это наблюдение можно объяснить тем, что несовпадающие образцы имели низкий уровень МОБ по ПЦР, неизмеримый из-за чувствительности проточной цитометрии. Данные результаты совпадают с ранее опубликованными результатами другой группы [24]. Однако опубликовано несколько работ с отличающимися данными, процент совпадений результатов в данных работах больше [22–25]. Расхождение данных может объясняться статистикой и выборкой пациентов. У МОБ-негативных пациентов расхождение меньше.

Важно понимать причины, влияющие на расхождение результатов МОБ, полученных двумя методами. Самой важной причиной является чувствительность методов в каждом конкретном случае. На результаты проточной цитометрии может влиять также потеря поверхностных маркеров при проведении терапии. Для ПЦР-анализа важны события, происходящие в клетке на уровне ДНК, потеря мишени или амплификация мишени в клетке. В исследовании “AIEOP-BFM ALL 2000” описывается несколько сильно различающихся по результатам образцов. Четыре образца (три собранных на 15-й день и один – на 33-й день) имели 10–50% МОБ по ПЦР и были негативны по проточной цитометрии. Эти образцы показали морфологическую картину КМ с большим распространением апоптоза, но без

очевидного присутствия лейкоэмических клеток, что показывает, что существует возможность детектировать ПЦР-анализом уже погибшие клетки с задержкой деградации ДНК. И, наоборот, в трех образцах наблюдалось $\geq 1\%$ МОБ по проточной цитометрии и негативность по ПЦР. Эти факты, возможно, показывает явление клональной эволюции ПЦР-мишени, хотя это не было формально доказано. Еще в одном не согласующемся образце с МОБ $>1\%$ по проточной цитометрии и негативном по ПЦР наблюдалась активная регенерация КМ, предполагающая ложнопозитивную МОБ, благодаря присутствию созревающих лимфоцитов, по фенотипу близких к лейкоэмическим бластам [24]. Таким образом, подробный анализ не совпадающих по двум методам образцов позволяет лучше понимать процессы, протекающие в лейкозных клетках.

В зависимости от протокола и клинической задачи значимый пороговый уровень МОБ может меняться. Так, для лечения рецидивов по протоколу "ALL-REZ BFM 2002" было показано, что оптимальным пороговым значением МОБ является 10^{-3} [26].

В конечном итоге выбор метода анализа МОБ в каждом исследовании зависит от многих факторов: дизайна протокола, наличия оборудования и квалификации персонала, поставленных задач и финансирования проекта.

4. Применение результатов мониторинга МОБ на практике

Исследования, проведенные многими группами авторов во всем мире, демонстрируют важное прогностическое значение уровня МОБ при ОЛЛ. Часть исследований сфокусирована на впервые диагностированных ОЛЛ, часть – на лечении первичных рецидивов и часть – на мониторинге МОБ перед ТКМ [10, 27–38]. Данные этих исследований единогласно рекомендуют использовать МОБ как мощный независимый прогностический критерий. ОЛЛ – самое распространенное онкологическое заболевание среди детей всех стран, поэтому для решения задачи повышения эффективности и качества лечения этих заболеваний нужны международные усилия. В европейских странах (Германии, Италии, Австрии, Франции, Швеции, Голландии) проводится много исследований, использующих МОБ-критерий AIEOP-BFM ALL2000, ALL Interim 2008 (ALL-Intercontinental-BFM), ALL-REZ BFM 2002 (Relapse SG Germany, Austria and Switzerland), COALL-07-2003, DCOG ALL10, EORTC-CLG 58 951, F2000 (FRALLE French Acute Lymphoblastic Leukaemia Group), LAL 0904, LAL 0201A, LAL 0201B, LAL1205 (GIMEMA Gruppo Italiano Malattie EMatologiche dell'Adulto), GMALL 07/03, GRAALL-2005, NILG-ALL 10/07 NILG, NOPHO ALL-2008, PETHEMA ALL-AR-03, PETHEMA ALL-RI-08, UK NCRI Adult ALL (MRD feasibility study), UKALL 2003, UKALL R3. Для координации усилий и систематизации опыта по лечению ОЛЛ нужно международное сотрудничество. Участники всех ведущих исследовательских групп по взрослым и детским ОЛЛ и участники европейских групп по стандартизации и оптимизации ПЦР и проточной цитометрии в ОЛЛ (ESG-MRD-ALL, EuroFlow, I-BFM-ALL-FLOW-MRD Network) принимают участие в разработке рекомендаций к проведению клинических испытаний в Европе с использованием МОБ [5].

Для стандартизации ПЦР метода создана группа ESG-MRD-ALL, которая сейчас включает около 35 лабораторий в Европе, Израиле, Сингапуре, Австралии. Эти лаборатории каждые 6 мес проводят программы по контролю качества, стандартизации мониторинга МОБ и интерпретации данных количественной ПЦР. Успешное участие в таких программах является необходимым условием для лаборатории, которая принимает участие в детекции МОБ для Международных медицинских исследований и для принятия клинического решения.

Для стандартизации метода проточной цитометрии, в дополнение к национальным семинарам, два международных консорциума I-BFM-ALL-FLOW-MRD Network и EuroFlow Consortium были основаны в Европе для оптимизации и стандартизации измерений МОБ, основанных на проточной цитометрии. I-BFM-ALL-FLOW-MRD Network установил критерии оценки риска и стратификации при лечении детских ОЛЛ, основанных на BFM-протоколах, с целью сопоставить контроль качества двух программ, чтобы достигнуть согласованности данных среди разных лабораторий с использованием разного оборудования, программного обеспечения или различных маркеров [39, 40]. EuroFlow Consortium работает по полной стандартизации оборудования, приготовления образцов, процедура окрашивания immunostaining procedures, fluorochromes and eight-color antibody panels, и программного обеспечения и автоматизированного анализа данных [41–43].

ПЦР и проточная цитометрия не приводят к полностью сопоставимым результатам, проточная цитометрия не может полностью заменить текущие результаты ПЦР-стратификации в тех же временных точках [20–22]. Тем не менее, стратификация на основании проточной цитометрии (как независимая) возможна, и поэтому должна быть независимо валидирована в уже созданных протоколах или новых протоколах.

МОБ – это количественный критерий, позволяющий наблюдать кинетику уменьшения лейкозного клона и на основании этой кинетики делать прогнозы на результат терапии. Поэтому для первичных пациентов важны ранние временные точки протокола. Для резистентных к терапии рецидивов важно найти временной момент для проведения ТКМ. Риск рецидива после трансплантации КМ напрямую зависит от уровня МОБ перед ТКМ [40]. ТКМ – сложная и дорогостоящая процедура, применяемая в тяжелых случаях ОЛЛ для спасения жизни пациента. Проведение МОБ-мониторинга перед трансплантацией повышает вероятность успешного исхода [10, 36–38].

5. Молекулярный профиль ОЛЛ и чувствительность к терапии

Еще одним важным моментом в использовании МОБ для изучения и терапии ОЛЛ является поиск новых молекулярных маркеров для разных подтипов ОЛЛ и создание новых таргетных препаратов для лечения ОЛЛ.

Известно, что 10–20% пациентов в разных протоколах плохо отвечают на проводимую терапию. Применение в таких случаях ТКМ тоже не всегда позволяет спасти жизнь пациенту. Поэтому остро стоит задача – найти новые биомаркеры для предварительной оценки эффективности при-

меняемых протоколов и пытаться создать новые таргетные препараты. Значение МОБ после проведения индукции показывает чувствительность лейкозного клона к проводимой терапии.

Несомненный интерес представляет работа исследователей из США с применением метода анализа транскриптомов. Авторы сравнили молекулярный профиль экспрессии генов в МОБ-положительных и МОБ-отрицательных образцах для пяти подтипов ОЛЛ среди 189 лейкозных клонов. Изучались гены, включенные в клеточный цикл, апоптоз, транспорт и ДНК-репарацию. Молекулярный профиль экспрессии значительно различался между МОБ-положительными и МОБ-отрицательными образцами. Среди значительно различающихся по уровню экспрессии генов были идентифицированы *BCL2*, *BECN1*, *CBFB*, *IKZF1*, *PAX5*, *SH2B3*, и *TOX* [43]. Все эти гены участвуют в патогенезе ОЛЛ [44, 45].

Острой клинической потребностью остается идентификация новых прогностических маркеров для стратификации пациентов и назначения лечения. Необходимы маркеры, предсказывающие устойчивость к терапии в каждом подтипе уже на этапе диагностики. Для каждого подтипа было выбрано по 10 наиболее различающихся по экспрессии генов, которые могут быть связаны с устойчивостью к терапии. Для гиперплоидных ОЛЛ такими генами оказались гены *CMMD10*, *DHX29*, *CAMK2G*, *NRF1*, *LOC100132832*, *PMS2P1*, *WISP1*, *CANX*, *ALPL* и *EMP1* ($P, 8,0 \times 10^{-4}$). Для ОЛЛ с MLL перестройками гены *BHLHE40*, *BIRC5*, *C2ORF27*, *C7ORF25*, *CC2D1A*, *CD8A*, *CDK16*, *CES2* и *CHAT* ($P, 2,0 \times 10^{-4}$). Для ETV6-RUNX1 подтипа ОЛЛ гены – *FAM204A*, *ICOS*, *RYBP*, *CLIP3*, *ZHX2*, *BMP8A*, *MPL*, *MYH11*, *TCL6* и *SLC7A6* ($P, 8,0 \times 10^{-4}$). Для подгруппы «другие» ОЛЛ – *CTDSPL*, *FGF17*, *HIST1H2AB*, *IL8*, *ITGB3*, *KDM3A*, *MYL6*, *NPDC1*, *ST8SIA3* и *TSPYL2* ($P, 2,0 \times 10^{-4}$) [43]. Как и ожидалось, между различными подтипами ОЛЛ наблюдалась значительная вариабельность в уровне экспрессии генов [43]. Результаты исследования показали, что молекулярная стратификация должна проводиться по-разному для каждого из подтипов ОЛЛ. Можно предполагать, что профиль экспрессии генов может стать клинически значимым инструментом для стратификации при лечении В-ОЛЛ пациентов.

Исследование показало, что в разных подтипах ОЛЛ возникновение устойчивости клона к терапии возникает с использованием различных молекулярных механизмов и, следовательно, нужно искать разные терапевтические решения. Это исследование идентифицировало широкий молекулярный профиль экспрессии генов, характерный для клонов, устойчивых к терапии для разных подтипов ОЛЛ.

Ранее были опубликованы данные о взаимосвязи экспрессии генов, уровне МОБ и прогнозе бессобытийного выживания [46–47].

6. Терапия ОЛЛ в Российской Федерации

Основным центром лечения детских лейкозов в Российской Федерации и СНГ является ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Еще совсем недавно смертность от лейкозов достигала 70%. С внедрением и развитием протоколов Москва-Берлин достигнуты существенные результаты. Более 90% достигают ремиссии.

Организация онкологической диагностики и помощи в нашей стране имеет свои особенности благодаря огромной территории и большой численности населения. Диагностика и лечение лейкозов проходит в нескольких медицинских территориальных центрах, наиболее сложные случаи попадают в ФНКЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Учитывая статистику заболеваемости лейкозами и численность населения страны, у нас каждый год диагностируются около 800 новых случаев ОЛЛ. Для разработки новых протоколов и проверки их на эффективность очень важен статистический рандомизированный анализ. Возможность набрать достаточное количество пациентов в протокол есть не у каждой страны. При должных организации и финансировании результаты, полученные в РФ, могут существенно расширить мировой опыт лечения ОЛЛ. К сожалению, до настоящего времени мониторинг МОБ не введен в рутинную практику лечения ОЛЛ. Хочется надеяться, что это отставание будет преодолено.

Заключение

Мониторинг МОБ признан важным независимым прогностическим фактором при лечении первичных ОЛЛ, рецидивов ОЛЛ и проведения ТКМ. Выбор метода измерения МОБ зависит от множества факторов. При использовании протоколов, прошедших клинические испытания, необходимо использовать рекомендуемый метод измерения МОБ. При разработке новых протоколов лечения необходимо проводить испытания по мониторингу МОБ, подбирать метод, временные точки и пороговые значения МОБ для распределения пациентов на группы в точках ветвления протокола. Эти точки и пороговые значения МОБ могут отличаться для разных протоколов (терапия первичных ОЛЛ, рецидивов, подготовка к ТКМ). Выявление МОБ-положительных пациентов и составление коллекции таких образцов – очень важная задача для дальнейшего продвижения в эффективности лечения ОЛЛ и разработке новых терапевтических препаратов. Исследование молекулярного профиля экспрессии генов МОБ-положительных пациентов с разными подтипами ОЛЛ показывает разные патологические сигнальные пути, которые могут быть мишенями для эффективного лечения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00105)

Литература/References

1. Злокачественные новообразования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна АД, Старинского ВВ, Петрова ГВ. М.: МНИОИ им. П.А.Герцена, 2015. / Malignancies in Russia in 2013 (morbidity and mortality). Ed. by Kaprin AD, Starinsky VV, Petrova GV. Moscow: MNIIOI named after P.A.Gercena, 2015. (In Russian).
2. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010;115(16):3206-14.
3. Gaipa G, Basso G, Biond A, Campana D. Detection of Minimal Residual Disease in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. 2013;84(6):359-69.

4. van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125(26):3996-4008.
5. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M., Ottmann OG, et al. European Working Group for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia (EWALL); International Berlin-Frankfurt-Münster Study Group (I-BFM-SG). Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the second international symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia*. 2010;24(3):521-35.
6. Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. 1999;13(1):110-8.
7. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PAS, Humme M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17(12):2257-317.
8. van der Velden VHJ, Willems MJ, van der Schoot CE, Haëhlen K, van Wering ER, van Dongen JJM. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia*. 2002;16(5):928-36.
9. van der Velden VHJ, Wijkhuijs JM, Jacobs DCH, van Wering ER, van Dongen JJM. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia*. 2002;16(7):1372-80.
10. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998;352(9142):1731-8.
11. Cave H, van der Werff ten Bosch J, Suci S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 1998;339(9):591-8.
12. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, et al. International BFM Study Group (I-BFM-SG). Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008;22(4):771-82.
13. Bartram CR, Schrauder A, Köhler R, Schrappe M. Acute lymphoblastic leukemia in children: treatment planning via minimal residual disease assessment. *Dtsch Arztebl Int*. 2012 Oct;109(40):652-8. doi: 10.3238/arztebl.2012.0652. Epub 2012 Oct 5.
14. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grümayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007;21(14):604-11.
15. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood*. 2011;118(8):2077-84.
16. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008;111(12):5477-85.
17. Stow P, Key L, Chen X, Pan Q, Neale GA, Coustan-Smith E, et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(23):4657-63.
18. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2009;113(18):4153-62.
19. Gokbuget N, Kneba M, Raff T, Trautmann H, Bartram CR, Arnold R, et al. Adults with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor diagnosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood*. 2012;120(9):1868-76.
20. Neale GA, Coustan-Smith E, Pan Q, Chen X, Gruhn B, Stow P, et al. Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 1999;13(8):1221-6.
21. Malec M, van der Velden VH, Björklund E, Wijkhuijs JM, Söderhäll S, Mazur J, et al. Analysis of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: analysis of Ig/TCR gene rearrangements and multicolor flow cytometric immunophenotyping. *Leukemia*. 2004;18(10):630-6.
22. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol*. 2005;128(6):774-82.
23. Ryan J, Quinn F, Meunier A, Boublikova L, Crampe M, Tewari P, et al. Minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukaemia patients at multiple time points reveals high levels of concordance between molecular and immunophenotypic approaches. *Br J Haematol*. 2009;144(1):107-15.
24. Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, Panzer-Grümayer R, Buldini B, Silvestri D, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2012;97(10):1586-93.
25. Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui CH, et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(5):934-8.
26. Eckert C, Hagedorn N, Sramkova L, Mann G, Panzer-Grümayer R, Peters C, et al. Monitoring minimal residual disease in children with high-risk relapses of acute lymphoblastic leukemia: Prognostic relevance of early and late assessment. *Leukemia*. 2015;29(8):1648-55.
27. Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberg D, Wang H, et al.; Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCL ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood*. 2007;110(5):1607-11.
28. Stow P, Key L, Chen X, Pan Q, Neale GA, Coustan-Smith E, et al. Clinical significance of low levels of minimal residual disease at the end of remission induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(23):4657-63.
29. Yamaji K, Okamoto T, Yokota S, Watanabe A, Horikoshi Y, Asami K, et al. Japanese Childhood Cancer Leukemia Study Group. Minimal residual disease-based augmented therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Japanese Childhood Cancer and Leukemia Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2010;55(7):1287-95.
30. Katsibardi K, Moschovi MA, Braoudaki M, Papadimitriou SI, Papathanasiou C, Tzortzou-Stathopoulou F. Sequential monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: 7-year experience in a pediatric hematology/oncology unit. *Leuk Lymphoma*. 2010;51(5):46-52.
31. Meleshko AN, Savva NN, Fedasenko UU, Romancova AS, Krasko OV, Eckert C, et al. Prognostic value of MRD-dynamics in childhood acute lymphoblastic leukemia treated according to the MB-2002/2008 protocols. *Leuk Res*. 2011;35(10):1312-20.

32. Eckert C, Biondi A, Seeger K, Cazzaniga G, Hartmann R, Beyersmann B, et al. Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2001;358(9289):1239-41.
33. Paganin M, Zecca M, Fabbri G, Polato K, Biondi A, Rizzari C, et al. Minimal residual disease is an important predictive factor of outcome in children with relapsed 'high-risk' acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2008;22(12):2193-200.
34. Raetz EA, Borowitz MJ, Devidas M, Linda SB, Hunger SP, Winick NJ, et al. Reinduction platform for children with first marrow relapse in acute lymphoblastic lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(24):3971-78.
35. Krejci O, van der Velden VH, Bader P, Kreyenberg H, Goulden N, Hancock J, et al. Level of minimal residual disease prior to haematopoietic stem cell transplantation predicts prognosis in paediatric patients with acute lymphoblastic leukaemia: A report of the Pre-BMT MRD Study Group. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(8):849-51.
36. Bader P, Kreyenberg H, Henze GH, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. ALL-REZ BFM Study Group. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27(3):377-84.
37. Leung W, Campana D, Yang J, Pei D, Coustan-Smith E, Gan K, et al. High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukemia. *Blood*. 2011;118:223-30.
38. Zhao XS, Liu YR, Zhu HH, Xu LP, Liu DH, Liu KY, et al. Monitoring MRD with flow cytometry: An effective method to predict relapse for ALL patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2012;91(2):183-92.
39. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, Veltroni M, Schumich A, Maglia O, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74(6):331-40.
40. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvetri D, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5168-74.
41. da Costa ES, Peres RT, Almeida J, Lecrevisse Q, Arroyo ME, Teodosio C, et al. Harmonization of light scatter and fluorescence flow cytometry profiles obtained after staining peripheral blood leucocytes for cell surface-only versus intracellular antigens with the Fix & Perm reagent. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(1):11-20.
42. Pedreira CE, Costa ES, Almeida J, Fernandez C, Quijano S, Flores J, et al. A probabilistic approach for the evaluation of minimal residual disease by multiparameter flow cytometry in leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Cytometry A*. 2008;73A(12):1141-50.
43. Sitthi-Amorn J, Herrington B, Megason G, Pullen J, Gordon C, Hogan S, et al. Transcriptome Analysis of Minimal Residual Disease in Subtypes of Pediatric B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Med Insights Oncol*. 2015 May 24;9:51-60. doi: 10.4137/CMO.S17049. eCollection 2015.
44. Pedreira CE, Costa ES, Barrena S, Lecrevisse Q, Almeida J, van Dongen JJM, et al. Generation of flow cytometry data files with a potentially infinite number of dimensions. *Cytometry A*. 2008;73(9):834-46.
45. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3407-15.
46. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, Bedrick EJ, et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2010;116(23):4874-84.
47. Kang H, Chen IM, Wilson CS, Bedrick EJ, Harvey RC, Atlas SR, et al. Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(7):1394-405.

Информация о соавторах:

Гнучев Николай Васильевич, член-корреспондент РАН, советник РАН, профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной иммуногенетики рака Института биологии гена РАН

Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

Телефон: (499) 135-9970

E-mail: gnuchev@igb.ac.ru

Георгиев Георгий Павлович, советник РАН, академик РАН, профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории геномной терапии Института биологии гена РАН

Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

Телефон: (499) 135-9970

E-mail: georgiev@igb.ac.ru

Ларин Сергей Сергеевич, кандидат биологических наук, заместитель директора Высшей школы молекулярной и экспериментальной медицины Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, заведующий лабораторией геномной терапии Института биологии гена РАН

Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

Телефон: (499) 135-9970

E-mail: sergei_larin@mail.ru

Information about co-authors:

Nikolay V. Gnuchev, corresponding member of RAS, adviser of the Russian Academy of Sciences, professor, DSc in biology, chief research fellow at the laboratory of molecular immunogenetics of cancer, Institute of Gene Biology

Address: 34/5, ul. Vavilova, Moscow, 119334, Russian Federation

Phone: (499) 135-9970

E-mail: gnuchev@igb.ac.ru

Georgiy P. Georgiev, adviser of the Russian Academy of Sciences, academician of RAS, professor, DSc in biology, chief research fellow at the laboratory of gene therapy, Institute of Gene Biology

Address: 34/5, ul. Vavilova, Moscow, 119334, Russian Federation

Phone: (499) 135-9970

E-mail: georgiev@igb.ac.ru

Sergey S. Larin, PhD in biology, deputy director of the Higher School of Molecular and Experimental Medicine, Dmitry Rogachev Federal Research Centre of Paediatric Haematology, Oncology and Immunology, head of the laboratory of gene therapy, Institute of Gene Biology

Address: 34/5, ul. Vavilova, Moscow, 119334, Russian Federation

Phone: (499) 135-9970

E-mail: sergei_larin@mail.ru