

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

## EXPERIMENTAL STUDIES

### Ксенотрансплантация гемопоэтических стволовых клеток человека мышам линии NBSGW: базовая модель для доклинической разработки подходов генной терапии

### Xenotransplantation of Human Hematopoietic Stem Cells into NBSGW Mice: A Basic Model for Preclinical Development of Gene Therapy Approaches

*А.И. Шакирова<sup>1</sup>, В.О. Лаушкина<sup>1</sup>, И.Н. Гапоненко<sup>1</sup>,  
Я.В. Комарова<sup>1</sup>, О.С. Епифановская<sup>1</sup>, Д.А. Сеничкина<sup>1</sup>,  
В.С. Сергеев<sup>1</sup>, А.Р. Муслимов<sup>2</sup>, А.В. Онопченко<sup>2</sup>,  
Е.В. Щелина<sup>2</sup>, С.А. Осипова<sup>2</sup>, О.Г. Бреднева<sup>2</sup>,  
М.Л. Васютина<sup>2</sup>, Я.Г. Торопова<sup>2</sup>, К.В. Лепик<sup>1</sup>,  
М.О. Попова<sup>1</sup>, И.С. Моисеев<sup>1</sup>, А.Д. Кулагин<sup>1</sup>*

*AI Shakirova<sup>1</sup>, VO Laushkina<sup>1</sup>, IN Gaponenko<sup>1</sup>,  
YaV Komarova<sup>1</sup>, OS Epifanovskaya<sup>1</sup>, DA Senichkina<sup>1</sup>,  
VS Sergeev<sup>1</sup>, AR Muslimov<sup>2</sup>, AV Onopchenko<sup>2</sup>,  
EV Shchelina<sup>2</sup>, SA Osipova<sup>2</sup>, OG Bredneva<sup>2</sup>,  
ML Vasyutina<sup>2</sup>, YaG Toropova<sup>2</sup>, KV Lepik<sup>1</sup>, MO Popova<sup>1</sup>,  
IS Moiseev<sup>1</sup>, AD Kulagin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

<sup>1</sup> RM Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation; IP Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

<sup>2</sup> ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197341

<sup>2</sup> VA Almazov National Medical Research Center, 2 Akkuratova ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197341

#### РЕФЕРАТ

#### ABSTRACT

**Актуальность.** Генная терапия на основе трансплантации кроветворных клеток становится мощной и универсальной стратегией лечения все более расширяющегося спектра различных заболеваний человека. Одна из актуальных проблем при внедрении технологий модификации генома в гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) в клиническую практику — обеспечение качества и безопасности продуктов генной и клеточной терапии при их использовании у человека. Это достигается путем тестирования на животных моделях на этапе доклинических исследований. В этом отношении линия мышей NBSGW представляется уникальной и перспективной моделью, которая позволяет обеспечивать приживление ГСК человека без предварительного кондиционирования.

**Background.** The gene therapy based on hematopoietic cell xenotransplantation is becoming a powerful and universally applied therapeutic strategy in an ever-expanding range of human diseases. One of the current issues in implementing the techniques of genome modification in hematopoietic stem cells (HSCs) into clinical practice is to assure the quality and safety of gene and cell therapy products for human use. This is achieved by animal model testing at the stage of preclinical studies. With this purpose in view, NBSGW mice seem to be a unique and promising model for human HSC engraftment without pre-conditioning.

**Цель.** Апробация модели мышей NBSGW для приживления ГСК человека, оптимизация методов оценки состояния животных и мониторинга уровня химеризма для трансляционной доклинической разработки продуктов генной и клеточной терапии на основе ГСК.

**Aim.** To test the NBSGW mouse model for human HSC engraftment, to optimize the methods of assessing the state of the animals and monitoring the chimerism level for translational preclinical development of HSC-based products for gene and cell therapy.

**Материалы и методы.** Для создания моделей ксенотрансплантатов мышей NBSGW использовали образцы отобранных CD34+ ГСК периферической крови здорового донора. Серийную трансплантацию проводили методом внутривенной инъекции клеток костного мозга от первичных реципиентов с высоким уровнем химеризма. Эффективность приживления оценивали методами проточной цитофлюориметрии (ПЦФ) и цифровой капельной полимеразной цепной реакции (цкПЦР). Субпо-

**Materials & Methods.** The xenograft models of NBSGW mice were generated using the samples of the selected peripheral blood CD34+ HSCs from a healthy donor. Serial transplantation was performed by intravenous injection of bone marrow cells from primary recipients with a high chimerism level. Engraftment efficiency was evaluated by flow cytometry (FCF) and droplet digital PCR (ddPCR). Subpopulation pattern of human cell engraftment was assessed by FCF.

**Results.** The tested HSC transplantation regimen is characterized by favorable toxicity profile. In the entire study sample of mice, the FCF analysis showed a long-term engraftment

пуляционный состав приживления клеток человека оценивали с помощью ПЦФ.

**Результаты.** Апробированный протокол трансплантации ГСК отличается благоприятным профилем токсичности. По результатам ПЦФ у всех мышей исследуемой выборки отмечалось долгосрочное приживление клеток человека с высоким уровнем химеризма (23,5–93,6 %) в костном мозге животных, в т. ч. после серийной трансплантации, что было подтверждено данными цкПЦР. Зафиксировано преобладание клеток В-линейной дифференцировки во всех протестированных образцах (периферической крови, костного мозга, селезенки) мышей после первичной и серийной трансплантаций. Метод цкПЦР может использоваться как дополнительный способ валидации данных об уровне приживления клеток человека, полученных с помощью ПЦФ.

**Заключение.** Мыши NBSGW являются перспективной базовой моделью доклинической разработки продуктов генной и клеточной терапии на основе первичных ГСК человека с модифицированным геномом.

**Ключевые слова:** ксенографтная модель, иммунодефицитные мыши NBSGW, трансплантация, гемопоэтические стволовые клетки, доклиническая разработка продуктов генной и клеточной терапии.

**Получено:** 31 августа 2023 г.

**Принято в печать:** 2 марта 2024 г.

*Для переписки:* Алена Игоревна Шакирова, канд. биол. наук, ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022; тел.: +7(911)733-51-48; e-mail: alyona.i.shakirova@gmail.com

*Для цитирования:* Шакирова А.И., Лаушкина В.О., Гапоненко И.Н. и др. Ксенотрансплантация гемопоэтических стволовых клеток человека мышам линии NBSGW: базовая модель для доклинической разработки подходов генной терапии. Клиническая онкогематология. 2024;17(2):82–93.

DOI: 10.21320/2500-2139-2024-17-2-82-93

of human cells with a high chimerism level (23.5–93.6 %) in the bone marrow of the animals, also after serial transplantation, which was confirmed by ddPCR. The B-lineage differentiation cells predominated in all tested samples (of peripheral blood, bone marrow, and spleen) from mice after primary and serial transplantation. The ddPCR assay can be used as an additional tool for validating the level of human cell engraftment determined by FCF.

**Conclusion.** NBSGW mice present a promising reference model for preclinical development of gene and cell therapy products based on human primary HSCs with a modified genome.

**Keywords:** xenograft model, immunodeficient NBSGW mice, transplantation, hematopoietic stem cells, preclinical development of gene and cell therapy products.

**Received:** August 31, 2023

**Accepted:** March 2, 2024

*For correspondence:* Alena Igorevna Shakirova, PhD in Biology, 6/8 L'va Tolstogo ul., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022; Tel.: +7(911)733-51-48; e-mail: alyona.i.shakirova@gmail.com

*For citation:* Shakirova AI, Laushkina VO, Gaponenko IN, et al. Xenotransplantation of Human Hematopoietic Stem Cells into NBSGW Mice: A Basic Model for Preclinical Development of Gene Therapy Approaches. Clinical oncohematology. 2024;17(2):82–93. (In Russ).

DOI: 10.21320/2500-2139-2024-17-2-82-93

## ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия является перспективным и одновременно сложным подходом к лечению широкого спектра заболеваний человека. В настоящее время генотерапевтические лекарственные препараты на основе соматических клеток разрабатываются для наследственных, опухолевых и инфекционных заболеваний [1–3]. Гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) представляют собой привлекательную мишень для генетической модификации *ex vivo*. Трансплантация генетически измененных ГСК обуславливает формирование в костном мозге большого пула кроветворных элементов, обеспечивающего длительный эффект с потенциалом функционального излечения в течение всей жизни [4]. Среди разрабатываемых методов лечения на основе трансплантации ГСК можно выделить подходы, основанные на функциональном замещении или введении в геном ГСК человека терапевтических конструкторов с помощью вирусной трансдукции, а также невирусную модификацию этой

клинически релевантной популяции с использованием программируемых нуклеаз [4].

Технологическая трансляция продуктов на основе соматических клеток с генетической модификацией в клиническую практику проходит в несколько этапов. Их задача заключается в отработке процессов производства и тестирования с целью обеспечить гарантии качества и безопасности использования у человека [5]. Этот путь включает оценку побочных эффектов целевых и возможных нецелевых модификаций генома, детальный функциональный анализ ГСК в отношении их способности к хомингу, приживлению в нишах костного мозга, а также к мультилинейной дифференцировке после генетической коррекции *ex vivo*. Для исследования перечисленных параметров ключевой моделью доклинической разработки является гуманизация мышей с тяжелым иммунодефицитом методом ксенотрансплантации ГСК человека. Наиболее распространенные для такой разработки мыши NSG (NOD.SCID  $\beta 2\mu^{-/-}$ ) имеют глубокий дефицит врожденного и адаптивного иммунитета, а также способность к репопуляции костного мозга ГСК человека

[6]. В то же время для достижения значимого уровня химеризма мышам линии NSG требуется проведение кондиционирования посредством облучения всего тела либо введения цитостатических препаратов. Это сопряжено с токсичностью и повышенным риском развития опухолей, а также осложняет дизайн и интерпретацию результатов исследования [7].

Несмотря на неоспоримые преимущества некоторых новых линий мышей с оптимизированными биологическими свойствами, их признание в научном сообществе требует времени. Одной из самых перспективных в этом отношении является линия мышей NOD.B6.SCID II2γ<sup>-/-</sup>Kit<sup>W41/W41</sup> (NBSGW) [8], способная поддерживать высокие уровни приживления трансплантата ГСК человека без предварительного облучения или режима кондиционирования. Животные этой линии — мыши с глубоким комплексным иммунодефицитом, представляют собой модификацию линии NSG. Их особенность заключается в дополнительной точечной мутации в гене *KIT* (аллель *Kit<sup>W41</sup>*), кодирующем трансмембранный тирозинкиназный рецептор c-Kit III типа. Белок экспрессируется в нескольких типах клеток кроветворного ряда, в т. ч. в гемопоэтических предшественниках [9], а его активация необходима для регуляции нормального кроветворения [10]. Инактивирующая мутация нарушает развитие этих типов клеток, создавая условия для конкурентного преимущества популяций гемопоэтических клеток донора после ксенотрансплантации [11]. Таким образом, степень иммунодефицита животного-хозяина, а также запустение ниш в костном мозге [12] способствуют приживлению и устойчивой экспансии донорских клеток, включая ГСК человека, без предварительной миелоабляции.

**Цель настоящей работы** — впервые в России апробировать модель мышей NBSGW для приживления ГСК человека, оптимизировать методы оценки состояния животных и мониторинга уровня химеризма для трансляционной доклинической разработки продуктов генной и клеточной терапии на основе ГСК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования разработан в лаборатории генной и клеточной терапии НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России.

### Животные

Мыши NBSGW были получены из Jackson Laboratory (США), в последующем разводились и содержались в индивидуально вентилируемых клетках в условиях SPF-вивария барьерного типа на базе ветеринарной службы ЦДТИ ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, где также осуществлялись процедура ксенотрансплантации, наблюдение за животными и отбор биоматериала для анализа. Перед началом работ комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных (IACUC) ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ был утвержден протокол экспериментов на животных (ПЗ\_22\_11\_ВасютинаМЛ\_

**Таблица 1.** Характеристика групп мышей NBSGW, включенных в исследование

Трансплантация	Пол	Число животных	Доза облучения	Клеточность трансплантата
Первичная	Самки	5	0 сГР	1 × 10 <sup>6</sup> клеток CD34+ одного донора
	Самцы	5		
Серийная	Самки	2	0 сГР	2 × 10 <sup>6</sup> клеток костного мозга первичных реципиентов (мышей NBSGW, n = 4)
		2	140 сГР	
	Самки	2	0 сГР	
		2	140 сГР	

**Таблица 2.** Последовательности праймеров и зондов, использованных в работе

Метод	Название	Последовательность (5'-3')
Секвенирование по Сэнгеру	mKitW41_F	TCACAGTGGGTTTACAGCTCA
	mKitW41_R	TTCCTTCACTGGCTGTTTTGG
цКПЦР	mGAPDH_F	AACCTGTATGTATGGGGAGAGC
	mGAPDH-R	AAGTCGCAGGAGACAACCTG
	mGAPDH_Pr	[HEX]TCAGGCCAAGATGATGACATCA[BHQ1]
	hEPOR_F	GCTGCCAGCTTTGAGTACACTA
	hEPOR_R	GAGATGCCAGAGTCAGATACCACAA
	hEPOR_Pr	[HEX]ACCCAGCTCCAGCTCTTGCCT[BHQ1]

h — человека; m — мыши; цКПЦР — цифровая капельная полимеразная цепная реакция.

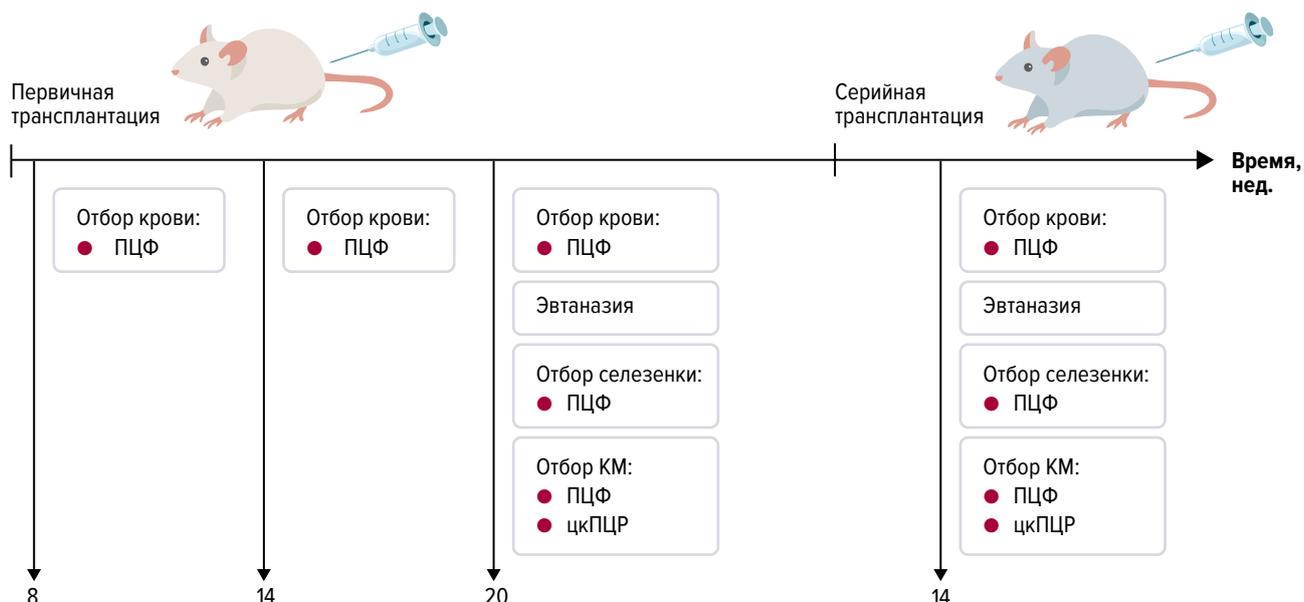
V3). В исследование включено 10 животных (5 самцов и 5 самок мышей) для проведения первичной трансплантации и 8 животных (4 самца и 4 самки мыши) для проведения серийной трансплантации (табл. 1). Возраст животных-реципиентов ко времени выполнения инфузии составлял 8–10 нед. Распределение по группам осуществлялось случайным образом с применением генератора случайных чисел.

### Подтверждающее генотипирование

Для подтверждения аллеля *Kit<sup>W41</sup>* мышей генотипировали по однонуклеотидному полиморфизму G/A в позиции 75652562 в гене *KIT Mus musculus* (NC\_000071.6) [8] с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. Для амплификации применяли праймеры, последовательности которых представлены в табл. 2. Основу полимеразной цепной реакции (ПЦР) составлял 2-кратный концентрированный раствор PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование проводили на генетическом анализаторе 3500 Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, США) с применением реагентов BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

### Селекция CD34+ ГСК здорового донора

Для магнитной селекции клеток CD34+ использовали свежий образец стимулированных ГСК периферической крови 1 здорового донора, собранный путем аппаратного афереза в НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России. Все процедуры с участием донора проводи-



**Рис. 1.** Дизайн эксперимента по ксенотрансплантации клеток CD34<sup>+</sup> человека мышам NBSGW и мониторингу уровня химеризма КМ — костный мозг; ПЦФ — проточная цитофлюориметрия; цкПЦР — цифровая капельная полимеразная цепная реакция.

**Fig. 1.** Experimental design of human CD34<sup>+</sup> cell xenotransplantation into NBSGW mice and monitoring of chimerism levels КМ — bone marrow; ПЦФ — flow cytofluorometry; цкПЦР — droplet digital polymerase chain reaction.

лись в соответствии с Хельсинкской декларацией. Для мобилизации ГСК применяли гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). Магнитную селекцию клеток CD34<sup>+</sup> выполняли из продукта афереза мобилизованных ГСК периферической крови с использованием набора CD34 MicroBead kit (Miltenyi Biotec, Германия). Чистота селекции, определенная методом проточной цитофлюориметрии (ПЦФ) с использованием панели поверхностных CD-маркеров и витального красителя CD34/CD45/7AAD, составила 84,5 %. После селекции ГСК криоконсервировали до выполнения процедуры ксенотрансплантации.

#### Пробоподготовка и процедура ксенотрансплантации

Общая схема эксперимента по созданию ксенографтной модели гемопоэза человека представлена на рис. 1. Разморозку и пробоподготовку клеток осуществляли в день трансплантации. На каждую особь NBSGW был подготовлен ксенотрансплантат с дозой  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> ГСК, ресуспендированных в 150 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS). Трансплантат вводили мышам NBSGW внутривенно в хвостовую вену без предварительного облучения. Для оценки доли клеток человека, персистирующих в периферической крови животных через 8, 14 и 20 нед. после инфузии, проводили отбор ее образцов. Оценку уровня химеризма в костном мозге и селезенке осуществляли однократно через 20 нед. после трансплантации.

Для выполнения серийной трансплантации было отобрано 4 особи со средним уровнем химеризма в костном мозге  $85,5 \pm 7,8$  % (диапазон 78,6–93,6 %) по результатам ПЦФ после первой трансплантации. Все выбранные особи были самками. Костный мозг для серийной трансплантации выделяли из бедренных костей животных по описанному ниже протоколу, пулировали и вводили реципиентам внутривенно.

Клеточность трансплантата составила  $2 \times 10^6$  ядро-содержащих клеток на мышь. Предварительно животные-реципиенты для серийной трансплантации были разделены на две равные группы, одна из которых получила облучение в дозе 140 сГр (X-rad 225) за 4 ч перед инфузией (см. табл. 1), а другая — без облучения. Приживление клеток человека в периферической крови, костном мозге и селезенке оценивали через 14 нед. после серийной трансплантации (рис. 1).

#### Оценка состояния животных

На всем протяжении эксперимента мыши находились под наблюдением ветеринарного врача. Общее состояние мышей оценивали ежедневно. В ходе ежедневного клинического осмотра оценивали следующие показатели: поведение/активность (без изменений/угнетенное/возбужденное), поедание корма (без изменений/повышено/снижено), координация движений (без изменений/измененная/круговые движения), сутулая поза (нет/есть), тонус скелетных мышц (без изменений/повышен/снижен), судороги (нет/есть), реакция на тактильные раздражители (есть, обычная/нет/есть, ослабленная/есть, повышенная), шерстный покров (без изменений/взъерошен/алопеции), окраска слизистых оболочек (розовая/бледная/покраснение), дегидратация (нет/есть), издаваемые звуки (без изменений/хрипы/визг/чиханье), частота дыхания (без изменений/учащенная/замедленная), описание дыхания (нормальное, ритмичное/неритмичное/затрудненное), консистенция кала (обычная/жидкая/твердая). Оценку массы животных проводили еженедельно.

#### Отбор и подготовка образцов тканей

Для оценки динамики уровня химеризма в периферической крови проводили отбор образцов объемом 200 мкл в пробирки с раствором ЭДТА посредством

пункции ретроорбитального синуса. Первая точка отбора периферической крови после трансплантации составила 8 нед. Далее анализ периферической крови выполняли каждые 6 нед. до 20-й недели после трансплантации (см. рис. 1). В конечной точке наблюдения (Д+140) животным проводили эвтаназию путем передозировки изофлурана и отбирали образцы периферической крови, костного мозга и селезенки. Для отбора костного мозга грудную конечность очищали от кожи и мышечной ткани, затем отрезали головку плечевой кости и промывали костный мозг раствором PBS с помощью шприца объемом 2 мл. Для подготовки образцов клеток селезенки к ПЦФ фрагмент органа растирали между двумя покровными стеклами с последующей промывкой раствором PBS.

#### Оценка уровня химеризма и субпопуляционного клеточного состава в органах мышей методом ПЦФ

Для оценки приживления клеток человека в органах мышей методом ПЦФ образцы периферической крови, костного мозга и селезенки окрашивали следующей комбинацией флуоресцентно меченных моноклональных антител против поверхностных антигенов клеток человека (h) и мыши (m): CD3/CD14/mCD45/CD19/DRAQ-7/hCD45. Подробная характеристика используемых в работе антител представлена в табл. 3.

Подготовленные по описанному выше протоколу образцы периферической крови, костного мозга и селезенки инкубировали с коктейлем моноклональных антител в темноте в течение 20 мин при комнатной температуре. Далее эритроциты лизировали, осадили и повторно отмывали буфером FACS Cell wash (BD Biosciences, США). После инкубации клеток с витальным красителем DRAQ-7 в течение 15 мин в условиях темноты окрашенные клетки ресуспендировали в буфере FACS Cell wash и анализировали на приборе FACSCanto II (BD Biosciences, США). Регистрировали 20 000–50 000 событий. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo (TreeStar Inc., США). Стратегия гейтирования представлена на рис. 2. Пороговый уровень химеризма клеток человека в костном мозге мышей для констатации приживления ксенотрансплантата составил 0,1 % клеток hCD45+ с признаками линейной дифференцировки в конечной точке наблюдения [13].

#### Оценка уровня химеризма методом цифровой капельной ПЦР

Выделение ДНК из периферической крови, костного мозга и селезенки проводили с использованием набора ExtractDNA Blood & Cells («Евроген», Россия). Праймеры и зонды для оценки персистенции клеток человека в органах мышей методом цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) подбирали к генам рецептора эритропоэтина человека *hEPOR* и «домашнего хозяйства мыши» *mGAPDH*. Последовательности олигонуклеотидов для цкПЦР приведены в табл. 2. Реакцию цкПЦР осуществляли с использованием реагентов ddPCR™ Supermix for Probes (Bio-Rad, США) с добавлением 50 нг геномной ДНК, а также праймеров и зондов в концентрации 0,45 и 0,15 мкмоль/л соответственно.

**Таблица 3.** Панель антител для определения уровня химеризма и субпопуляционного клеточного состава в костном мозге мышей методом ПЦФ

Антиген и флюорохром	Компания, номер в каталоге	Клон
Anti-mouse CD45 PE/Cyanine7	BioLegend, #147704, RRID:AB_2563536	I3/2.3
Anti-human CD3 FITC	BioLegend, #300440, RRID:AB_2562046	UCHT1
Anti-human CD14 PE	BD Biosciences, #345785, RRID:AB_2868811	МфР9
Anti-human CD34 PerCP-Vio® 700	Miltenyi Biotec, #130-113-181, RRID:AB_2726007	AC136
Anti-human CD19 APC	BD Biosciences, #345791, RRID:AB_2868817	SJ25C1
Anti-human CD45 Krome Orange	Beckman Coulter, #B36294, RRID:AB_2833027	J.33
DRAQ7™	BioLegend, #424001	N/A

Объем реакции составлял 25 мкл. Применяли следующий протокол амплификации: 95 °C — 10 мин, 40x (94 °C — 30 с, 61 °C — 1 мин), 98 °C — 10 мин. Генерацию и считывание флуоресценции капель осуществляли на приборе QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, США). Уровень химеризма рассчитывали как долю *hEPOR*-позитивных капель от суммы аллелей *mGAPDH* и *hEPOR* в реакции.

#### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics и Prism. Выполняли расчет средних значений, стандартного отклонения, а также коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для оценки статистической значимости различий в выборках использовали *t*-критерий Стьюдента. Значение  $p < 0,05$  считали статистически значимым.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

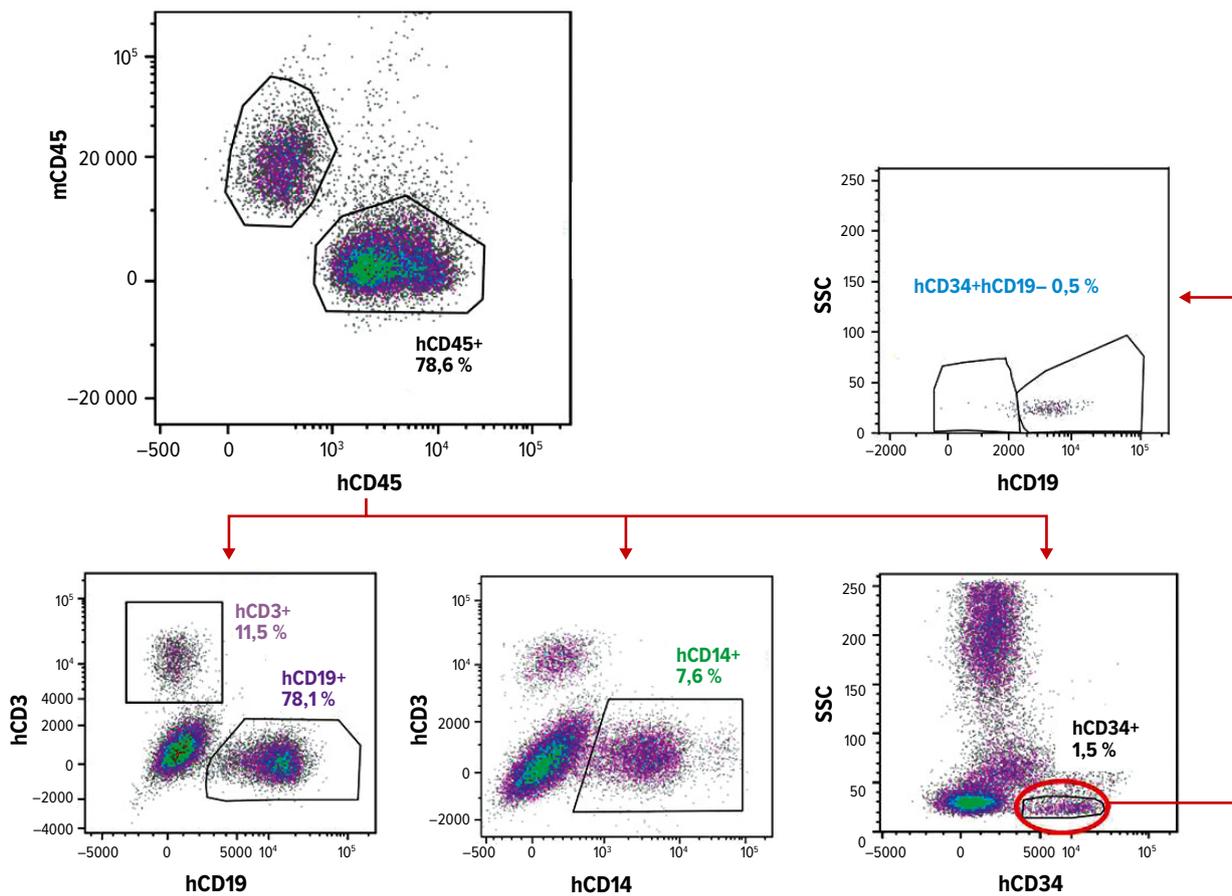
#### Оценка состояния и поведения мышей после первичной трансплантации ГСК человека

За время наблюдения случаев гибели животных, как и признаков неблагополучия по оцениваемым параметрам, не зарегистрировано. Зафиксирована еженедельная прибавка в массе тела в пределах видовой нормы (рис. 3), признаки реакции «трансплантат против хозяина» отсутствовали.

#### Оценка приживления и мультилинейной дифференцировки ксенотрансплантата CD34+ ГСК

По данным ПЦФ у всех животных, включенных в исследование, зафиксировано приживление трансплантата (рис. 4, А, Б). К 20-й неделе после первичной трансплантации в костном мозге значения уровня химеризма варьировали от 23,5 до 93,6 % ( $64,2,1 \pm 23,7$  %), в селезенке — от 42,3 до 98,5 % ( $66,3 \pm 18,1$  %), в периферической крови — от 5,2 до 44,2 % ( $21,1 \pm 15,1$  %).

Представленные на рис. 4, В данные мониторинга уровня химеризма в периферической крови животных демонстрируют, что в самой ранней точке измерений

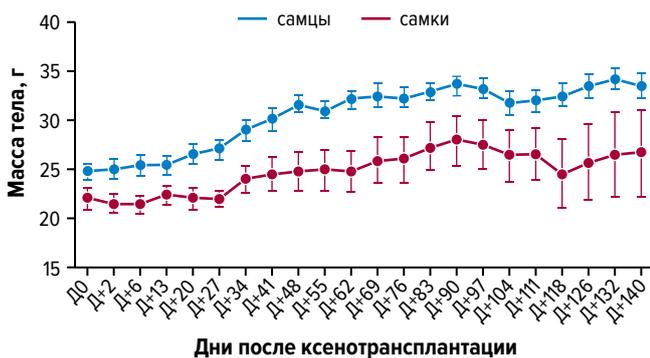


**Рис. 2.** Стратегия гейтирования и оценка доли В-клеток (hCD19+), Т-клеток (hCD3+), моноцитов и макрофагов (hCD14+), гемопоэтических стволовых клеток (hCD34+CD19-) среди клеток CD45+ человека в периферической крови, костном мозге и селезенке мышей NBSGW

h — антитела, специфические к антигенам человека; m — антитела, специфические к антигенам мыши; SSC — боковое светорассеяние.

**Fig. 2.** Gating strategy and the proportions of B-cells (hCD19+), T-cells (hCD3+), monocytes and macrophages (hCD14+), and hematopoietic stem cells (hCD34+CD19-) among the human CD45+ cells in peripheral blood, bone marrow, and spleen of NBSGW mice

h — human antigen-specific antibodies; m — mouse antigen-specific antibodies; SSC — side scattering.



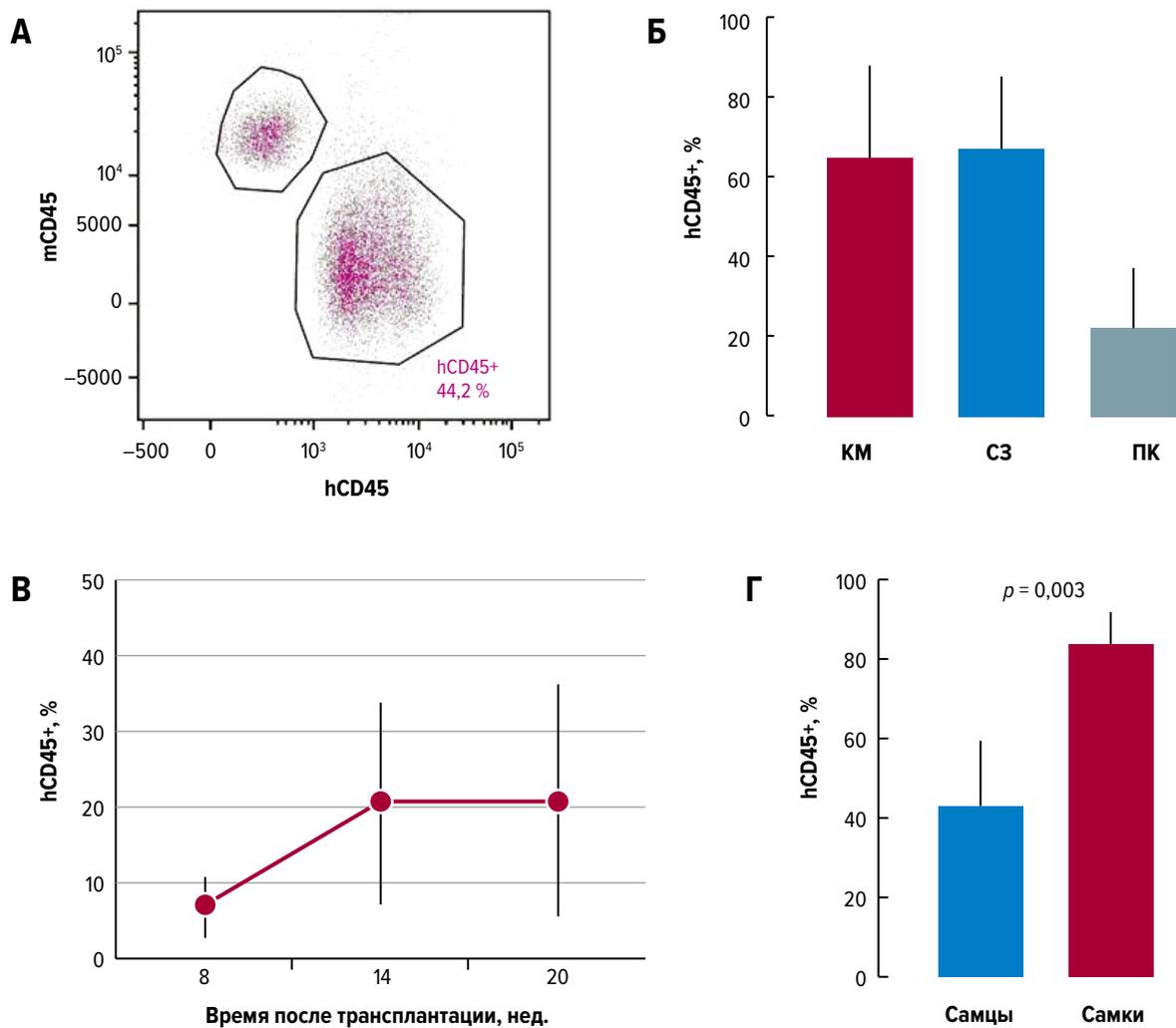
**Рис. 3.** Ежедневная динамика изменений массы тела мышей NBSGW после первичной трансплантации CD34+ ГСК человека с распределением групп животных по полу. Представлены средние значения и стандартные отклонения

**Fig. 3.** Weekly changes of body weight of NBSGW mice after primary transplantation of human CD34+ HSCs depending on sex. Mean values and standard deviations

относительное число клеток человека не превышало 11,5 %. Максимальные значения ( $\leq 43,3$  %) были достигнуты уже к 14-й неделе после введения клеток человека. Среднее значение доли клеток hCD45+ при

этом составляло  $20,7 \pm 13,2$  %. Достигнутый уровень химеризма в периферической крови сохранялся до конца периода наблюдения ( $21,1 \pm 15,1$  %). В конечной точке зафиксированы различия в уровне приживления клеток человека в костном мозге мышей в группах самцов ( $42,8 \pm 15,9$  %) и самок ( $83,6 \pm 7,9$  %). Различия оказались статистически значимыми ( $p = 0,003$ ) (рис. 4, Г).

Анализ субпопуляционного состава клеток человека в периферической крови, костном мозге и селезенке показал успешное восстановление клеток лимфоидной и миелоидной линий дифференцировки после первичной трансплантации (рис. 5). В костном мозге были наиболее представлены В-лимфоциты CD19+ ( $34,4 \pm 7,4$  %) и клетки CD14+ моноцитарно-макрофагального ряда ( $31,6 \pm 7,4$  %) (рис. 5, А). При этом у самок доля клеток CD14+ оказалась выше, чем у самцов ( $36,6 \pm 6,8$  vs  $26,7 \pm 4$  % соответственно;  $p = 0,028$ ). Доля клеток CD3+ в костном мозге варьировала в пределах 0,0–7,7 % ( $1,3 \pm 2,6$  %). В конечной точке наблюдения статистически значимых различий в уровне персистенции В- и Т-лимфоцитов человека в костном мозге животных-реципиентов разного пола не выявлено ( $p = 0,398$  и  $p = 0,214$  соответственно). Следует отметить, что в нашем исследовании в пе-

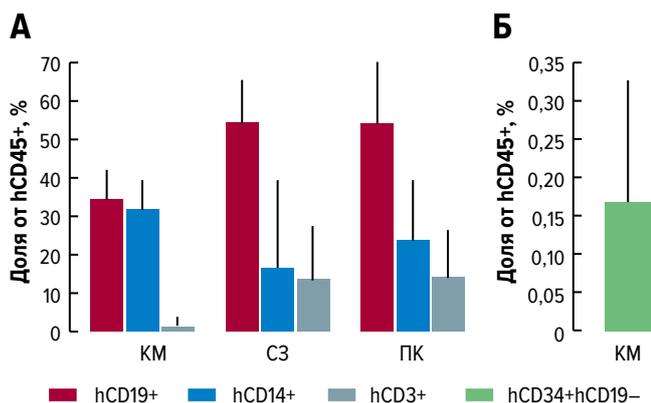


**Рис. 4.** Оценка приживления ксенотрансплантата CD34+ ГСК человека у мышей линии NBSGW методом проточной цитофлуориметрии. Представлены средние значения и стандартные отклонения:

А — результаты проточной цитофлуориметрии ПК мыши NBSGW через 20 нед. после ксенотрансплантации (доля клеток CD45+ мыши и человека); Б — доля клеток CD45+ человека в ПК, КМ и селезенке мышей через 20 нед. после первичной трансплантации; В — доля клеток CD45+ человека в ПК мышей на разных сроках после первичной ксенотрансплантации; Г — различия средних значений приживления клеток человека в КМ мышей разного пола  
h — человека; m — мыши; КМ — костный мозг; ПК — периферическая кровь; СЗ — селезенка.

**Fig. 4.** Human CD34+ HSC xenotransplant engraftment in NBSGW mice assessed by flow cytofluorometry. Mean values and standard deviations:

А — NBSGW mouse PB analyzed by flow cytofluorometry 20 weeks after xenotransplantation (the proportion of CD45+ mouse and human cells); Б — the proportion of CD45+ human cells in the PB, BM, and spleen of mice 20 weeks after primary transplantation; В — the proportion of CD45+ human cells in the PB of mice at different time-points after primary xenotransplantation; Г — different mean values of human cell engraftment in the BM of mice depending on sex  
h — human; m — mouse; КМ — bone marrow; ПК — peripheral blood; СЗ — spleen.

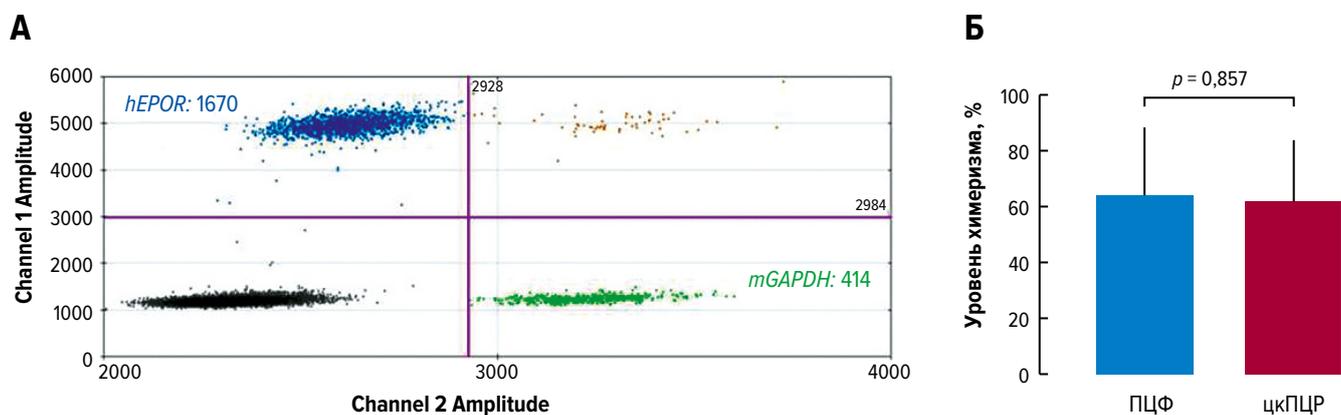


**Рис. 5.** Доля субпопуляций клеток CD45+ человека в тканях мышей NBSGW через 20 нед. после первичной ксенотрансплантации CD34+ ГСК:

А — доля В-клеток (hCD19+), Т-клеток (hCD3+), моноцитов и макрофагов (hCD14+); Б — доля ГСК (hCD34+hCD19-)  
h — человека; КМ — костный мозг; ПК — периферическая кровь; СЗ — селезенка.

**Fig. 5.** The proportion of human CD45+ subpopulations in the tissues of NBSGW mice 20 weeks after primary CD34+ HSC xenotransplantation:

А — the proportions of B-cells (hCD19+), T-cells (hCD3+), monocytes and macrophages (hCD14+); Б — the proportion of HSCs (hCD34+hCD19-)  
h — human; КМ — bone marrow; ПК — peripheral blood; СЗ — spleen.



**Рис. 6.** Оценка приживления трансплантатов CD34+ ГСК человека методами цкПЦР и ПЦФ:

А — пример диаграммы распределения *hEPOR*<sup>+</sup> и *mGAPDH*<sup>+</sup> после цкПЦР; Б — сравнение показателей химеризма клеток человека в костном мозге мышей NBSGW через 20 нед. после первичной ксенотрансплантации, полученных методами цкПЦР и ПЦФ  
ПЦФ — проточная цитофлуориметрия; цкПЦР — цифровая капельная полимеразная цепная реакция.

**Fig. 6.** Human CD34+ HSC transplant engraftment assessed by ddPCR and FCF:

А — an example of a diagram showing the *hEPOR*<sup>+</sup> and *mGAPDH*<sup>+</sup> distribution after ddPCR; Б — comparison of human cell chimerism values in the bone marrow of NBSGW mice determined by ddPCR and FCF 20 weeks after primary xenotransplantation  
ПЦФ — flow cytometry; цкПЦР — droplet digital polymerase chain reaction.

риферической крови и селезенке Т-лимфоциты CD3+ достигали значений 47,6 и 45,9 % соответственно, а в среднем их доля составляла  $13,7 \pm 14,1$  и  $13,3 \pm 12,6$  % соответственно.

Что касается приживления наиболее ранних CD34+ ГСК человека в костном мозге животных, их персистенция по данным ПЦФ зафиксирована у всех животных к 20-й неделе после первой трансплантации и составляла 0,03–0,54 % (рис. 5, Б). Отмечена тенденция к более высоким значениям CD34+CD19–ГСК в костном мозге самцов, чем самок ( $0,26 \pm 0,18$  vs  $0,07 \pm 0,04$  % соответственно;  $p = 0,07$ ).

#### Оценка приживления трансплантатов CD34+ ГСК человека методом цифровой капельной ПЦР

Согласно полученным данным цкПЦР, в костном мозге мышей через 20 нед. после трансплантации доля аллелей гена *hEPOR* человека от всех проанализированных аллелей составляла  $61,3 \pm 22$  % (диапазон 25,1–84,7 %). При этом полученные значения коррелировали с данными ПЦФ, коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил 0,967 ( $p < 0,0001$ ). Статистически значимых различий в уровне химеризма, определенном методами цкПЦР и ПЦФ, не выявлено (рис. 6).

#### Результаты серийной трансплантации

При анализе результатов серийной трансплантации у всех животных, включенных в исследование, отмечено приживление трансплантата. В периферической крови, костном мозге и селезенке мышей после серийной трансплантации доля клеток человека оказалась ниже, чем после первичной трансплантации. В костном мозге значения клеток hCD45+ варьировали от 0,5 до 33,6 % (рис. 7, А). Персистенцию клеток человека в образцах с уровнем химеризма в костном мозге мышей менее 1 % ( $n = 2$ ) дополнительно подтверждали методом цкПЦР (данные не приводятся). Статистически значимых различий в уровне приживления клеток человека в костном мозге после серийной

трансплантации в группах мышей с облучением и без такового не выявлено ( $10,8 \pm 15,2$  vs  $3,9 \pm 4,3$  % соответственно;  $p = 0,441$ ). В селезенке доля клеток hCD45+ после серийной трансплантации составляла  $8,0 \pm 1,3$  % в группе с облучением и  $7,3 \pm 3,4$  % в группе без него. В периферической крови эти же показатели в тех же группах животных были  $0,5 \pm 0,3$  и  $0,2 \pm 0,1$  % соответственно. Различия оказались статистически незначимыми ( $p = 0,741$  и  $p = 0,164$  для селезенки и периферической крови соответственно).

Анализ субпопуляционного состава клеток костного мозга у мышей NBSGW после серийной трансплантации показал преобладание клеток В-линейной дифференцировки ( $66,0 \pm 22,4$  %), причем различий в группах животных с облучением и без такового мы не наблюдали (рис. 7, Б). Клетки Т-лимфоцитарной линии дифференцировки (CD3+) были обнаружены в костном мозге только у 1 животного в группе без облучения и у 3 животных в группе с облучением на уровне 0,02 и  $0,1 \pm 0,12$  % соответственно (рис. 7, В). Клетки моноцитарной линии дифференцировки (CD14+) были представлены у 3 (75 %) из 4 животных в группе без облучения в объеме  $5,2 \pm 5,3$  % и у всех животных в группе с облучением на уровне  $5,7 \pm 6,6$  % (см. рис. 7, В). Следует отметить, что после серийной трансплантации в костном мозге мышей-реципиентов была зафиксирована персистенция ГСК с иммунофенотипом CD34+CD19– (см. рис. 7, В). В группе животных с облучением приживление клеток CD34+CD19– составило  $6,1 \pm 5,0$  %, в группе без облучения приживление этой субпопуляции ГСК наблюдалось у 3 из 4 животных на уровне  $4,9 \pm 0,6$  %.

## ОБСУЖДЕНИЕ

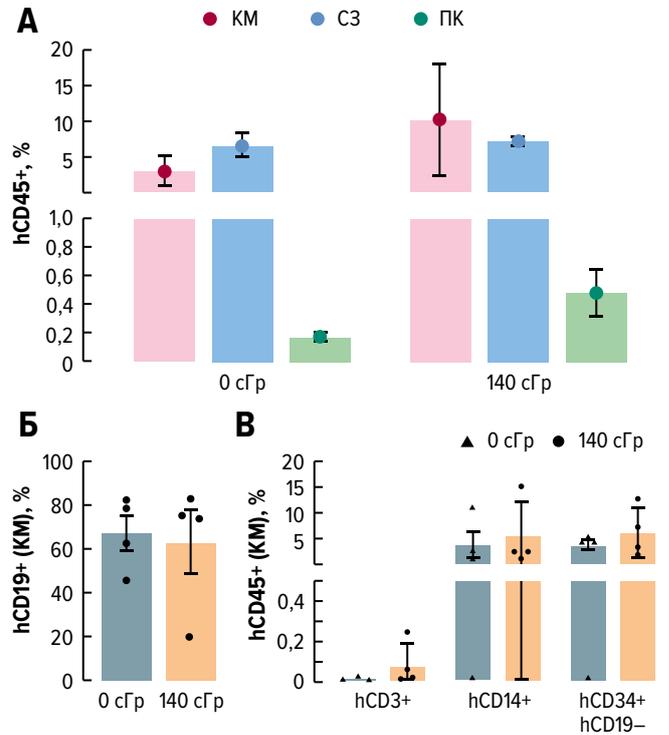
Мыши NBSGW являются многообещающей моделью для доклинической разработки клеточных генотерапевтических препаратов на основе первичных генетически модифицированных ГСК человека. К таким

исследованиям может относиться доклиническая оценка безопасности с точки зрения проверки способности этих клеток к поддержанию кроветворной функции, самообновлению и мультилинейной дифференцировке [14–17]. Возможность эффективного приживления донорских клеток человека у мышей NBSGW без кондиционирования за счет мутации в гене *KIT* выглядит привлекательно с точки зрения расширения возможностей по стандартизации проведения исследований на этой модели.

Следует отметить, что на степень приживления ГСК человека у мышей NBSGW оказывают влияние многие факторы. Среди них можно указать пол животных-реципиентов, источник и дозу ГСК, способ мобилизации ГСК для выделения из периферической крови, индивидуальные особенности донора (возраст), присутствие в трансплантате примеси иммунных клеток донора и даже степень его обогащенности длительно репопулирующими ГСК [15–22]. Помимо учета перечисленных выше факторов разработка протоколов доклинической оценки безопасности продуктов генной и клеточной терапии на основе ГСК включает в себя оценку необходимого количества животных для исследования, распределение животных в группах по возрасту и полу. Кроме того, проводится определение контрольных точек и параметров наблюдения за состоянием животных, выбор методов оценки функционального состояния и персистенции вводимых клеток в изучаемых органах.

Настоящее исследование посвящено разработке протокола гуманизации животных линии NBSGW методом трансплантации CD34+ ГСК человека, выделенных из периферической крови после предварительной мобилизации Г-КСФ. Прежде всего, оптимизация касалась не только процедур первичной и серийной трансплантации клеток человека животным, но и протоколов оценки их приживления, предложены сроки выполнения контрольных исследований. Важная особенность работы в том, что источником CD34+ ГСК для создания ксенографтной модели служат стимулированные ГСК периферической крови, которые наиболее часто используются для трансплантации в клинической практике. Фундаментальных работ, касающихся биологических особенностей приживления таких клеток, немного [18, 19]. В основном подобные исследования сосредоточены на функциональных свойствах CD34+ ГСК и относящихся к ним субпопуляций, выделенных из пуповинной крови человека [8, 20].

Апробированный в настоящей работе протокол трансплантации ГСК отличается благоприятным профилем токсичности. В исследуемой группе животных случаев гибели либо клинических признаков неблагополучия при ветеринарных осмотрах не зафиксировано. Согласно полученным данным, все мыши исследуемой выборки продемонстрировали долгосрочное приживление клеток человека на высоком уровне. По результатам ПЦФ наиболее высокие значения химеризма наблюдались в костном мозге ( $\leq 93,6\%$ ) и селезенке ( $\leq 98,5\%$ ). Это было подтверждено собственными данными цкПЦР, а также литературы [8, 15, 19, 20, 23]. В нашей работе проведенный в динамике мониторинг доли клеток человека в периферической



**Рис. 7.** (А) Доля клеток CD45+ человека в ПК, КМ и селезенке мышей через 14 нед. после серийной трансплантации, оцененная методом проточной цитофлюориметрии. (Б, В) Результаты анализа субпопуляционного состава клеток КМ у мышей NBSGW после серийной трансплантации: Б — доля клеток CD19+ человека, В — доля клеток CD3+, CD14+ и ГСК CD34+CD19- человека

h — человека; КМ — костный мозг; ПК — периферическая кровь; СЗ — селезенка.

**Fig. 7.** (A) The proportion of human CD45+ cells in the mouse PB, BM, and spleen 14 weeks after serial transplantation assessed by flow cytometry. (B, B) The results of analyzing the subpopulation pattern of BM cells in NBSGW mice after serial transplantation: Б — the proportion of human CD19+ cells, В — the proportions of human CD3+, CD14+ cells, and CD34+CD19- HSCs

h — human; КМ — bone marrow; ПК — peripheral blood; СЗ — spleen.

крови животных показал, что максимальное значение (43,3 %) в исследованной группе мышей NBSGW было достигнуто уже к 14-й неделе после трансплантации (среднее значение составило  $20,7 \pm 13,2\%$ ). Высокий уровень приживления сохранялся до конца периода наблюдения. К 20-й неделе после инфузии клеток человека максимальное значение химеризма в периферической крови животных hCD45+ составляло 44,2 % при среднем значении  $21,1 \pm 15,1\%$ .

Таким образом, апробированная нами доза  $1 \times 10^6$  клеток CD34+ человека на мыш, по всей видимости, является достаточной для достижения уровня химеризма около 65 % ( $\leq 93,6\%$ ) без предварительного кондиционирования. По данным литературы, количество клеток в трансплантате на основе отобранных ГСК периферической крови может быть и выше ( $\leq 2,0-2,5 \times 10^6$  клеток) [18, 19]. Следует отметить, что существенных преимуществ увеличение дозы вводимых ГСК без генетической модификации, выделенных из периферической крови, не продемонстрировало. Необходимо учитывать, что на эффективность приживления ГСК человека у мышей NBSGW могут оказывать влияние и индивидуальные особенности донора, что

имело место в опубликованных исследованиях при оптимальных значениях количества клеток в трансплантате [15]. При выполнении доклинических исследований важно не ограничиваться одним донором для заготовки трансплантата ГСК.

Отдельно следует отметить, что в нашей работе были выявлены отличия степени приживления ГСК человека у самцов и самок мышей NBSGW в отношении доли клеток hCD45+. Они согласуются с данными литературы, полученными для других источников ГСК [20]. Этот фактор необходимо учитывать при составлении программы доклинической разработки биомедицинских клеточных препаратов и расчете количества и пола животных, планируемых к исследованию [15].

По результатам изучения способности трансплантированных CD34+ ГСК человека к мультилинейной дифференцировке в органах мышей NBSGW мы обнаружили преобладание клеток В-линейной дифференцировки во всех протестированных образцах тканей мышей после трансплантации (периферической крови, костном мозге, селезенке). Кроме того, мы наблюдали восстановление клеток CD14+ миелоидной линии дифференцировки и CD34+ ГСК в костном мозге. При этом отмечалось увеличенное количество клеток hCD14+ в костном мозге у самок, а также тенденция к лучшему приживлению ранних предшественников CD34+ у самцов в костном мозге, что требует дальнейшего подтверждения на большей выборке животных.

Особый интерес представляют полученные нами данные о наличии в периферической крови мышей Т-лимфоцитов CD3+ человека. Приживление Т-лимфоцитов в костном мозге и селезенке было также зарегистрировано, но на более низком уровне. Следует отметить, что данные литературы в отношении эффективности восстановления Т-клеточного ростка у мышей NBSGW противоречивы. В большинстве исследований указывается на наличие Т-клеток человека в костном мозге и селезенке мышей [8, 14]. В то же время, по данным отдельных публикаций, Т-лимфоциты CD3+ в костном мозге животных не обнаруживаются [19]. Выявление Т-лимфоцитов в тканях животного может быть связано как с образованием этой популяции клеток из предшественников кроветворения, так и с их присутствием в самом трансплантате. С точки зрения стандартизации протоколов доклинической разработки клеточных препаратов на основе ГСК с генетической модификацией важным может быть этап тестирования примеси Т-лимфоцитов и других субпопуляций клеток человека в исходном трансплантате.

В ряде работ показана возможность выполнения мышам NBSGW серийной трансплантации костного мозга без предварительного кондиционирования. Данный подход наряду с длительным наблюдением за животными является важным методическим приемом для исследования способности трансплантируемых клеток, в т. ч. с генетической модификацией, к самообновлению *in vivo* [15, 19, 20]. При серийной трансплантации животные исследуемой линии способны поддерживать кроветворение не только из клеток CD34+ пуповинной крови [8, 19], но и из стимулированных ГСК периферической крови и костного мозга [15, 19].

Окончательное описание субпопуляционного состава клеток человека после серийной трансплантации в костном мозге мышей NBSGW к настоящему времени отсутствует. Единственная работа, опубликованная на эту тему, свидетельствует о предпочтительном формировании предшественников миелоидной линии дифференцировки (CD33+) при трансплантации клеток CD34+ пуповинной крови или костного мозга [19]. По нашим данным, в конечной точке наблюдения в периферической крови, костном мозге и селезенке статистически значимых различий в уровне приживления клеток человека в группах мышей с облучением и без такового не выявлено. При этом полученные нами значения оказались одними из самых высоких среди опубликованных в литературе. Показатели химеризма в костном мозге варьировали от 0,5 до 9,5 % в группе без предварительного тотального облучения. Анализ субпопуляционного состава клеток костного мозга мышей NBSGW после серийной трансплантации в костном мозге показал преобладание клеток В-линейной дифференцировки. Методическим отличием проведенного нами эксперимента от опубликованных работ является, с одной стороны, альтернативный источник ГСК, а с другой — то, что для серийной трансплантации были выбраны животные-доноры с самыми высокими значениями приживления клеток человека в костном мозге после первичной трансплантации ( $85,5 \pm 7,8$  %). По всей видимости, данный фактор может определять успех серийной трансплантации для такого источника ГСК человека, как стимулированные клетки периферической крови.

Несмотря на то что ПЦФ является «золотым стандартом» в оценке химеризма ксенотрансплантатов, эта методика обладает рядом ограничений [24]. Существенными представляются неточность при оценке низких значений химеризма и необходимость добавления реагента, блокирующего мышиный FcR при стандартном протоколе окрашивания. Преимущество цкПЦР как аналитического инструмента заключается в возможности отложенной оценки результатов, поскольку в ходе пробоподготовки к цкПЦР происходит лизис клеток с последующим выделением ДНК, которая может храниться до выполнения анализа без потери качества. Кроме того, протоколы лизиса клеток, как правило, более эффективны и менее тканеспецифичны, чем буферы для ферментативной диссоциации клеток. Это устраняет диссоциативную погрешность и значительно облегчает подготовку образцов внутренних органов для анализа. В связи с этим мы поставили задачу отработать метод цкПЦР в качестве дополнительного способа валидации данных ПЦФ в сложных случаях. Согласно полученным данным, метод цкПЦР позволил зафиксировать приживление клеток человека после первичной трансплантации в костном мозге мышей NBSGW на уровне, сравнимом с данными ПЦФ. Немаловажно и то, что метод цкПЦР оказался достаточно чувствительным и в плане оценки химеризма в образцах с низкой долей (< 1 %) клеток человека по данным ПЦФ. Показатели приживления клеток человека 0,5 и 0,64 % мы наблюдали в образцах костного мозга 2 из 8 животных после серийной трансплантации. Методом цкПЦР дополнительно подтвердили присутствие клеток человека в

этих образцах на уровне 0,13 и 0,4 % соответственно. Использование цкПЦР перспективно именно в таких сложных для интерпретации данных ПЦФ случаях.

Модель мышей NBSGW все больше используется в настоящее время для оценки безопасности клеточных продуктов на основе генетически модифицированных ГСК человека, хотя эта модель пока не занимает лидирующей позиции [25]. Опубликованные в исследованиях протоколы не стандартизованы. В зависимости от типа генетической модификации ГСК изменяются число вводимых клеток, сроки наблюдения, а в отдельных случаях выполняется тотальное облучение животных с целью увеличить эффективность приживления минимально необходимых доз ГСК [14, 17]. Проведенное нами исследование может служить еще одним шагом к стандартизации доклинических исследований, направленных на оценку безопасности редактирования генома ГСК.

Несомненно, возможность применения модели животных NBSGW для конкретных заболеваний должна рассматриваться через призму биологических особенностей мышей. В частности, животные этой линии обладают слабой способностью к поддержанию зрелых эритроцитов человека в периферической крови, хотя существуют методы транзитного увеличения количества данных форменных элементов у мышей за счет ингибирования активности макрофагов [19, 20]. Учитывая эту особенность, в исследованиях подходов генной терапии  $\beta$ -талассемии и гемоглобинопатий биологические эффекты модификации генома ГСК в линии эритроидной дифференцировки успешно оценивали на уровне эритробластов и ретикулоцитов костного мозга мышей [16, 26] либо проводили жидкостную культуральную дифференцировку эритроцитов из клеток CD34+ [23]. Что касается расширения возможностей доклинической оценки эффективности генной и клеточной терапии ВИЧ-инфекции, важно исследовать механизмы восстановления Т-клеток CD3+ и особенности функционирования тимуса у мышей NBSGW в норме и после трансплантации ГСК человека. Данные литературы в этом отношении противоречивы. Часть из них свидетельствует о полной атрофии тимуса у этих животных и отсутствии восстановления клеток hCD3+ в костном мозге [19]. Другие работы и наши собственные данные свидетельствуют о наличии Т-лимфоцитов в периферической крови, костном мозге и селезенке мышей NBSGW [20].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мыши NBSGW являются перспективной базовой моделью для доклинической разработки продуктов генной и клеточной терапии на основе ГСК человека. Разработанная впервые в России модель ксенотрансплантации может использоваться при создании отечественных продуктов на основе генетически модифицированных ГСК. При соблюдении строго идентичного процессинга клеток опытных и контрольных образцов модель NBSGW позволяет оценить влияние доставки модифицированных геном средств и собственно генетической модификации на функциональные свойства ГСК. Фундаментальные

исследования особенностей приживления и восстановления клеток человека у мышей NBSGW могут способствовать продвижению препаратов генной и клеточной терапии к клиническому применению.

## КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках реализации стратегического проекта Центра геномной медицины ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России по программе развития университета «Приоритет 2030».

## ВКЛАД АВТОРОВ

**Концепция и дизайн:** К.В. Лепик, А.И. Шакирова, М.Л. Васютина, Я.Г. Торопова.

**Сбор и обработка данных:** В.О. Лаушкина, А.Р. Муслимов, А.И. Шакирова.

**Предоставление материалов исследования:** Я.В. Комарова, В.С. Сергеев, И.Н. Гапоненко, О.С. Епифановская, М.Л. Васютина, А.В. Онопченко, Е.В. Щелина, С.А. Осипова, О.Г. Бреднева.

**Анализ и интерпретация данных:** А.И. Шакирова.

**Подготовка рукописи:** А.И. Шакирова, В.О. Лаушкина, Я.В. Комарова, И.Н. Гапоненко, О.С. Епифановская, К.В. Лепик.

**Окончательное одобрение рукописи:** все авторы.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Koniali L, Lederer CW, Kleanthous M. Therapy development by genome editing of hematopoietic stem cells. *Cells*. 2021;10(6):1492. doi: 10.3390/cells10061492.
- Cring MR, Sheffield VC. Gene therapy and gene correction: targets, progress, and challenges for treating human diseases. *Gene Ther*. 2022;29(1–2):3–12. doi: 10.1038/s41434-020-00197-8.
- Sagoo P, Gaspar HB. The transformative potential of HSC gene therapy as a genetic medicine. *Gene Ther*. 2023;30(3–4):197–215. doi: 10.1038/s41434-021-00261-x.
- Morgan RA, Gray D, Lomova A, Kohn DB. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress and lessons learned. *Cell Stem Cell*. 2017;21(5):574–90. doi: 10.1016/j.stem.2017.10.010.
- Radtke S, Humbert O, Kiem HP. Mouse models in hematopoietic stem cell gene therapy and genome editing. *Biochem Pharmacol*. 2020;174:113692. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113692.
- Mian SA, Anjos-Afonso F, Bonnet D. Advances in Human Immune System Mouse Models for Studying Human Hematopoiesis and Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2021;11:619236. doi: 10.3389/fimmu.2020.619236.
- McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, et al. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood*. 2010;116(2):193–200. doi: 10.1182/blood-2010-02-271841.
- McIntosh BE, Brown ME, Duffin BM, et al. Nonirradiated NOD.B6.SCID Il2ry<sup>-/-</sup> Kit(W41/W41) (NBSGW) mice support multilineage engraftment of human hematopoietic cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4(2):171–80. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.12.005.
- Sun G, Liang X, Qin K, et al. Functional analysis of KIT gene structural mutations causing the porcine dominant white phenotype using genome edited mouse models. *Front Genet*. 2020;11:138. doi: 10.3389/fgene.2020.00138.
- Rojas-Sutterlin S, Lecuyer E, Hoang T. Kit and Scl Regulation of Hematopoietic Stem Cells. *Curr Opin Hematol*. 2014;21(4):256–64. doi: 10.1097/moh.0000000000000052.

11. Cosgun KN, Rahmig S, Mende N, et al. Kit regulates HSC engraftment across the human-mouse species barrier. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):227–38. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.001.
  12. Theocharides AP, Rongvaux A, Fritsch K, et al. Humanized hemato-lymphoid system mice. *Haematologica*. 2016;101(1):5–19. doi: 10.3324/haematol.2014.115212.
  13. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002;100(9):3175–82. doi: 10.1182/blood-2001-12-0207.
  14. Patabhi S, Lotti SN, Berger MP, et al. In vivo outcome of homology-directed repair at the HBB gene in HSC using alternative donor template delivery methods. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;17:277–88. doi: 10.1016/j.omtn.2019.05.025.
  15. Wu Y, Zeng J, Roscoe BP, et al. Highly efficient therapeutic gene editing of human hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2019;25(5):776–83. doi: 10.1038/s41591-019-0401-y.
  16. Metais JY, Doerfler PA, Mayuranathan T, et al. Genome editing of HBG1 and HBG2 to induce fetal hemoglobin. *Blood Adv*. 2019;3(21):3379–92. doi: 10.1182/bloodadvances.2019000820.
  17. Everette KA, Newby GA, Levine RM, et al. Ex vivo prime editing of patient hematopoietic stem cells rescues sickle-cell disease phenotypes after engraftment in mice. *Nat Biomed Eng*. 2023;7(5):616–28. doi: 10.1038/s41551-023-01026-0.
  18. Leonard A, Yapundich M, Nassehi T, et al. Low-dose busulfan reduces human CD34(+) cell doses required for engraftment in c-kit mutant immunodeficient mice. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019;15:430–7. doi: 10.1016/j.omtm.2019.10.017.
  19. Hess NJ, Lindner PN, Vazquez J, et al. Different human immune lineage compositions are generated in non-conditioned NBSGW mice depending on HSPC source. *Front Immunol*. 2020;11:573406. doi: 10.3389/fimmu.2020.573406.
  20. Adigbli G, Hua P, Uchiyama M, et al. Development of LT-HSC- reconstituted nonirradiated NBSGW mice for the study of human hematopoiesis in vivo. *Front Immunol*. 2021;12:642198. doi: 10.3389/fimmu.2021.642198.
  21. Amoah A, Keller A, Emini R, et al. Aging of human hematopoietic stem cells is linked to changes in Cdc42 activity. *Haematologica* 2022;107(2):393–402. doi: 10.3324/haematol.2020.269670.
  22. Karuppusamy KV, Demosthenes JP, Venkatesan V, et al. The CCR5 gene edited CD34+CD90+ hematopoietic stem cell population serves as an optimal graft source for HIV gene therapy. *Front Immunol*. 2022;13:792684. doi: 10.3389/fimmu.2022.792684.
  23. Magis W, DeWitt MA, Wyman SK, et al. High-level correction of the sickle mutation is amplified in vivo during erythroid differentiation. *iScience* 2022;25(6):104374. doi: 10.1016/j.isci.2022.104374.
  24. Suchy FP, Nishimura T, Seki S, et al. Streamlined and quantitative detection of chimerism using digital PCR. *Sci Rep*. 2022;12(1):10223. doi: 10.1038/s41598-022-14467-5.
  25. Maganti HB, Bailey AJM, Kirkham AM, et al. Persistence of CRISPR/Cas9 gene edited hematopoietic stem cells following transplantation: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10(7):996–1007. doi: 10.1002/sctm.20-0520.
  26. Fiorini C, Abdulhay NJ, McFarland SK, et al. Developmentally-faithful and effective human erythropoiesis in immunodeficient and Kit mutant mice. *Am J Hematol*. 2017;92(9):E513–E519. doi: 10.1002/ajh.24805.
-