

ГЕННАЯ КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ВИЧ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ КРОВЕТВОРНОЙ И ЛИМФАТИЧЕСКОЙ ТКАНИ НА ОСНОВЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

М.О. Попова¹, В.С. Сергеев¹, К.В. Лепик¹, А.И. Шакирова¹, А.Я. Поттер¹, И.М. Бархатов¹, Б. Фезе², Б.В. Афанасьев¹

¹ Научно-исследовательский институт детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский отдел клеточной и генной терапии, отдел трансплантации стволовых клеток, медицинский центр университета Гамбург-Эппендорф, Гамбург, Германия

Gene-cell therapy of HIV and hematological malignancies based on hematopoietic stem cell transplantation and site-specific genome editing

М.О. Popova¹, V.S. Sergeev¹, K.V. Lepik¹, A.I. Shakirova¹, A.Ya. Potter¹, I.M. Barhatov¹, B. Fehse², B.V. Afanasyev¹

¹ Science Research Institute of Children's Oncology, Hematology and Transplantation named after R.M. Gorbacheva of First Saint-Petersburg State Medical University named after academician I.P. Pavlov, Saint-Petersburg, Russia

² Research Department Cell and Gene Therapy, Dept. of Stem Cell Transplantation, University Medical Center (UKE) Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Резюме

По данным ежегодных докладов UNAIDS, с 1983 г. количество ВИЧ-инфицированных пациентов неуклонно растет. Антиретровирусная терапия (АРВТ) позволяет увеличить продолжительность жизни, но проблемы качества жизни и долговременной выживаемости не решены. Одной из основных причин летальности у пациентов с ВИЧ в эру АРВТ являются онкологические заболевания, среди которых значительную часть составляют злокачественные лимфомы. Лечение лимфом включает этапную противоопухолевую химиотерапию (ПХТ) с потенциалом полного излечения пациента. Высокодозная ПХТ с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) — основное средство лечения рецидивов и рефрактерных форм агрессивных злокачественных лимфом. В последние годы с появлением технологии редактирования генома аутологичная ТГСК становится также одним из самых перспективных методов лечения ВИЧ-инфекции. История излечения от ВИЧ «Берлинского пациента» благодаря аллогенной ТГСК от донора с мутацией гена *CCR5* продемонстрировала эффективность подхода генной терапии на основе трансплантации.

Высокодозная химиотерапия с трансплантацией аутологичных, подвергнутых редактированию (инактивации гена *CCR5*, с помощью генно-инженерных нуклеаз), гемопоэтических стволовых клеток потенциально представляет собой способ комплексного лечения этих пациентов. С одной стороны, высокодозная ПХТ с ауто-ТГСК обеспечивает излечение от злокачественной опухоли, с другой стороны, она является способом доставки отредактированных клеток и создания условий для реализации лечебного эффекта против ВИЧ.

Abstract

Based on the annual UNAIDS reports the number of HIV-infected patients is continually growing since 1983. Antiretroviral Therapy (ART) allows to prolong life expectancy, but the problem of life quality and overall survival is still remaining. Nowadays, in the era of ART, one of the main cause of mortality in HIV-infected patients is malignancies. Lymphomas play one of the key roles in this group of diseases. The treatment of lymphomas includes combined regimens of chemotherapy with a curative potential. High dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplant (auto-HSCT) is the main path of the treatment for relapsed / refractory lymphomas. In the last few years with a development of the genome editing technology auto-HSCT is becoming one of the most promising methods of HIV treatment. The case of "Berlin patient" when allogeneic HSCT from donor with mutation *CCR5-delta32* lead to cure from HIV and proof of concept the efficacy of the gene therapy for HIV based on HSCT. Hematopoietic stem cell transplantation with edited autologous HSC (*CCR5* knockout by site-specific genome editing tools with engineering nucleases) is a comprehensive treatment for this cohort of patients. On one hand, high dose chemotherapy with auto-HSCT cures the malignancy; on the other hand auto-HSCT works as a delivery method for the edited cells and creates an environment for the HIV eradication. This review is dedicated to HIV and oncology, methods of treatment of hematological malignancies and HIV-infection using genome editing technology based on HSCT.

Данный обзор посвящён методам лечения опухолей кроветворной и лимфатической ткани и ВИЧ-инфекции с использованием редактирования генома на основе трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Ключевые слова: ВИЧ, генная клеточная терапия, CCR5, редактирование генома, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9.

Введение

В связи с внедрением АРВТ увеличилась продолжительность жизни пациентов с ВИЧ, и вопросы онкологической помощи становятся все более актуальными. В условиях современной АРВТ и сопроводительной терапии ПХТ, ауто-ТГСК и алло-ТГСК являются безопасными методами лечения, несущими куративный потенциал. С учетом продолжающегося увеличения количества людей, живущих с ВИЧ, при сохранении настоящей концепции лечения, в перспективе острота экономических и социальных аспектов ВИЧ-инфекции будет увеличиваться. Это подчеркивает необходимость поиска радикального метода лечения ВИЧ, что, без сомнений, является признанной общемировой проблемой здравоохранения. Благодаря научно-технологическому прогрессу, открытиям в области биологии, физиологии и медицины, пациенты со злокачественными опухолями кроветворной и лимфатической ткани и ВИЧ оказались примером и служат моделью для разработки принципиально новых подходов в медицине. Технологии редактирования генома являются одними из наиболее прогрессивных разработок в медицинской науке, а в лечении ВИЧ-инфекции, по мнению ряда экспертов, будут внедрены в рутинную практику в ближайшем будущем.

ВИЧ

Всего лишь за 10 лет с момента открытия вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) в 1983 г. заболеваемость достигла уровня эпидемии. В мире в 2014 г. зарегистрировано до 41 400 000 ВИЧ-инфицированных пациентов [1]. На территории РФ и стран бывшего СССР проблема ВИЧ-инфекции имеет особую актуальность. В РФ на 31.12.2014, по официальным данным Федерального центра СПИД, зарегистрировано 1 300 000 ВИЧ-инфицированных пациентов [1, 2]. Благодаря введению протоколов антиретровирусной терапии (АРВТ) удалось добиться существенного увеличения продолжительности жизни, что естественным образом привело к возрастанию числа зарегистрированных случаев неинфекционных заболеваний у данной категории пациентов.

Key words: HIV, gene cell therapy, CCR5, genome editing, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9.

ВИЧ и лимфомы

Инфицированные ВИЧ пациенты относятся к группе повышенного риска развития злокачественных новообразований [3]. Внедрение АРВТ привело к изменению структуры летальности. Летальность, непосредственно связанная с ВИЧ-инфекцией, значительно снизилась, при этом летальность, ассоциированная со злокачественными опухолями, вышла на второе место после случайных причин смерти у ВИЧ-инфицированных пациентов. Заболеваемость саркомой Капоши и неходжкинскими лимфомами снизилась, однако заболеваемость другими видами злокачественных опухолей, особенно лимфомой Ходжкина, возросла [4].

Лимфомы занимают особое место среди злокачественных опухолей у пациентов, инфицированных ВИЧ, вследствие высокой заболеваемости и сложности противоопухолевой терапии. В настоящее время доля лимфом среди онкологических заболеваний в этой группе пациентов составляет 32% и занимает второе место после сакромы Капоши [5].

В последние десятилетия достигнут значительный прогресс в лечении лимфом за счет разработки и внедрения программы терапии, включающей противоопухолевую химиотерапию (ПХТ), моноклональные антитела, высокодозную ПХТ с аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ауто-ТГСК) и аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Современная программная терапия имеет высокий потенциал полного излечения.

С внедрением АРВТ значительно улучшились результаты лечения лимфом у ВИЧ-инфицированных пациентов, эффективность программной терапии и прогноз не отличаются от пациентов, не инфицированных ВИЧ [6, 7].

Основным средством лечения рецидивов и рефрактерных агрессивных лимфом остается высокодозная ПХТ с аутологичной ТГСК (ауто-ТГСК). По данным ежегодного отчета Европейской организации по трансплантации крови и костного мозга (European Society for Blood and Marrow Transplantation, EBMT), в 2014 г. в Европе выполнено 23 883 ауто-ТГСК. Доля лимфом составляет 39% от всех показаний к ауто-ТГСК [8].

Данные о применении ауто-ТГСК у пациентов с лимфомами и ВИЧ ограничены несколькими небольшими исследованиями [9–11]. В двух качественно спланированных исследованиях, проведенных независимыми группами, в которых проводился парный анализ (пациенты с лимфомами на фоне ВИЧ-инфекции сравнивались с пациентами из общей популяции больных с лимфомами), результаты лечения были сравнимыми. Эти данные свидетельствуют об эффективности и безопасности высокодозной ПХТ с ауто-ТГСК у пациентов с лимфомами на фоне ВИЧ при условии совместного применения АРВТ [12, 13].

По данным ЕВМТ, в 2014 г. в Европе проведено 16 943 аллогенных ТГСК (алло-ТГСК). В последнее десятилетие отмечается отчетливая тенденция к увеличению трансплантационной активности в Европе при лимфомах, с 1990 по 2010 г. общее количество алло-ТГСК для лечения лимфом увеличилось втрое. Место алло-ТГСК в лечении лимфом — преимущественно рецидив после ауто-ТГСК.

Опыт применения алло-ТГСК в том виде, в котором она существует сейчас, для лечения лейкозов и лимфом у пациентов с ВИЧ-инфекцией ограничен публикациями нескольких клинических случаев. Впервые алло-ТГСК пациенту с хроническим миелолейкозом и ВИЧ на фоне непрерывной АРВТ была выполнена в 1997 г. Первый опыт в последующем позволил успешно применять этот метод для лечения пациентов с лейкозами и лимфомами на фоне ВИЧ-инфекции [14–16]. В группе пациентов, у которых по тем или иным причинам прием препаратов АРВТ был прекращен, наблюдался возврат активной инфекции ВИЧ и ухудшение общей выживаемости [16, 17]. В целом, исследователи приходят к выводу, что алло-ТГСК на фоне АРВТ является эффективным и безопасным методом лечения опухолей кроветворной и лимфатической ткани у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток как метод лечения ВИЧ

В 2007 г. произошло событие, которое открыло новое направление в области разработки способов излечения от ВИЧ-инфекции, — случай «Берлинского пациента». На сегодняшний день «Берлинский пациент» — единственный человек, который полностью излечился от ВИЧ-инфекции. Это пациент с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ), которому в соответствии с планом лечения было показано проведение алло-ТГСК. В международной базе данных было найдено более 100 потенциальных доноров, поэтому окончательный подбор донора был осуществлен с учетом мутационного статуса гена CCR5. Мутация в гене CCR5, делеция (del32) в двух аллелях этого гена, то есть в гомозиготном состоянии, обуславливают природную

невосприимчивость к R5 тропным штаммам ВИЧ [18]. После алло-ТГСК от донора с гомозиготной мутацией CCR5-Δ32 в 2007 г. пациент прекратил прием АРВТ и в течение 9 лет находится в состоянии ремиссии ОМЛ. При этом в крови и биоптатах различных тканей не обнаруживается ВИЧ даже при использовании ультрачувствительных методов детекции. Благодаря «Берлинскому пациенту» в настоящее время алло-ТГСК от донора с мутацией в гене CCR5 рассматривается как способ излечения не только от злокачественной опухоли, но и от ВИЧ-инфекции.

Естественная мутация гена CCR5 Δ32 была описана в 1996 г. [18]. Наличие мутации в одном аллеле гена (гетерозиготное состояние) ведут к замедлению прогрессирования ВИЧ-инфекции. Мутации обоих аллелей гена ведут к невосприимчивости к заражению ВИЧ-1. Таким образом, трансплантация ГСК от гомозиготного донора может приводить к излечению от инфекции. Встречаемость данной мутации крайне низка, в целом менее 1%, однако в некоторых популяциях встречается чаще. Аллель CCR5-Δ32 встречается в европейской популяции с частотой 5–14%, а в северной части Европы частота этой мутации достигает 21% [19].

Неоднократно проводились попытки повторить случай «Берлинского пациента», то есть выполнить алло-ТГСК пациенту с показаниями к трансплантации от гомозиготного CCR5-Δ32 донора. Ряд экспертов сходятся во мнении, что перспективным направлением развития этого метода является трансплантация клеток пуповинной крови в сочетании или без ко-трансплантации костного мозга от гаплоидентичного донора [20]. Выполнено несколько трансплантаций CCR5-Δ32/CCR5-Δ32 клеток пуповинной крови, однако все они оказались безуспешными — пациенты умерли от разных причин, в том числе от рецидива основного заболевания или осложнений трансплантации. Кроме того, рассматривалась гипотеза, что алло-ТГСК от донора без мутации CCR5-Δ32, но на фоне непрерывной АРВТ может так же привести к излечению. Опубликованные данные свидетельствуют, что отмена АРВТ двум пациентам после успешной алло-ТГСК от доноров без мутации, у которых длительное время после трансплантации не определялся ВИЧ в крови и органах-мишенях («Бостонские пациенты»), привела к возврату ВИЧ-инфекции [21].

Таким образом, несмотря на то, что прецедент «Берлинского пациента» воодушевил многих исследователей как успешный способ лечения ВИЧ-инфекции, масштабирование и развитие этой технологии для широкого круга ВИЧ-инфицированных пациентов выглядит малоперспективным.

Редактирование генома в лечении ВИЧ

Случаи алло-ТГСК у пациентов с ВИЧ послужили толчком к разработке новых подходов к лечению ВИЧ. По сути «Берлинский пациент» является примером природной генной терапии, и длительное наблюдение за пациентом подтвердило, что гемопоэтические стволовые клетки с мутантным геном CCR5 могут обеспечить долгосрочный контроль над ВИЧ-1 и привести к эрадикации вируса из организма человека. Это открытие побудило исследователей к интенсификации поиска способов воспроизведения мутации CCR5 $\Delta 32$, и одним из наиболее перспективных инструментов является геномное редактирование.

Редактирование генома осуществляется с помощью так называемых «дизайнерских нуклеаз», наиболее развитыми из которых на сегодняшний день являются нуклеазы цинковых пальцев (Zinc-finger Nuclease, ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALEN), а также CRISPR/Cas9 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats; короткие кластерные палиндромные повторы, равномерно удаленные друг от друга). Данные системы объединяют общий принцип структурной организации, включающей специфические ДНК-связывающие участки и нуклеазный домен.

Основным принципом редактирования генома является основанная на нуклеотидной последовательности специфичность в отношении сайтов узнавания, благодаря чему достигается точность внесения двуцепочечного разрыва в ДНК. Искусственно задавая специфичность нуклеаз к определенным последовательностям, имеется возможность направлять инструменты в любой локус ДНК, таким образом выбирая мишень для коррекции.

В результате активации нуклеазного домена в ДНК клетки-мишени вносится двухцепочечный разрыв в области, соседней с сайтом узнавания ДНК-связывающего домена. Последующая активация естественных механизмов репарации может обеспечивать стойкие, наследуемые в ряду поколений клеток изменения последовательности нуклеотидов и/или экспрессии целевого гена. После внесения двуцепочечного разрыва, эксплуатируя естественный механизм репарации ДНК, могут быть созданы мутации гена по типу коротких инсерций и делеций, что приводит к нокауту — «выключению гена» благодаря смещению рамки считывания, или «переписывание» — изменение нуклеотидной последовательности некорректного гена/участка ДНК, или интеграции нового гена — «трансгена» с высокой точностью. Для этого необходимо доставить к месту двуцепочечного раз-

рыва матрицу, с которой будет копироваться последовательность нуклеотидов в ходе восстановления разрыва.

Ген CCR5 – мишень для редактирования

Самой привлекательной мишенью для редактирования в контексте лечения ВИЧ-инфекции является ген корецептора CCR5. С помощью специфичных нуклеаз производится двуцепочечный разрыв в определенном локусе гена CCR5. Благодаря естественным механизмам репарации ДНК происходит негомологичное сшивание концов, что приводит к формированию делеций и инсерций. Появление искусственных мутаций в участке гена CCR5 приводит к смещению рамки считывания и, следовательно, нарушению трансляции. В результате действия нуклеазы на уровне первичной последовательности копии гена сдвиг рамки считывания приводит к изменению аминокислотной последовательности синтезируемого в дальнейшем белка и быстрой деградации в клетках.

ZFN

Исторически первые инструменты редактирования генома, нуклеазы цинковых пальцев (ZFN) были открыты и охарактеризованы в 1996 г. [22]. Они представляют собой гибридные белки, состоящие из соединенных между собой бактериального фермента — эндонуклеазы FokI (ДНК-разрезающий домен) и химерных ДНК-связывающих протеинов «цинковых пальцев» (ДНК-связывающий домен). Эндонуклеаза FokI осуществляет двуцепочечный разрыв ДНК. Эта нуклеаза не имеет специфичности в отношении каких-либо последовательностей ДНК и способна функционировать в любом участке генома. «Цинковые пальцы» являются ДНК-связывающими белковыми комплексами, в которых каждая отдельная субъединица распознает специфическую последовательность ДНК длиной в три нуклеотида. Комбинируя разные субъединицы, стало возможным создавать комплексы с очень высокой специфичностью практически к любому участку генома. Оба домена, работая вместе, теоретически позволяют внести изменения в любом необходимом участке генома с беспрецедентной точностью.

Результаты преclinical исследований, подтверждающих эффективность и безопасность использования нуклеаз цинковых пальцев для нокаута гена CCR5, были опубликованы в 2008 г. в лимфоцитах и в 2010 г. в ГСК [23, 24]. В последующих работах были достигнуты увеличение эффективности и оптимизация технологии для нужд клинического применения. В настоящее время проходит ряд клинических испытаний (NCT02388594, NCT00842634, NCT01044654, NCT02500849, NCT015431526 NCT02225665), в которых оцени-

вается эффективность и безопасность технологии для человека. Во всех исследованиях основной лечебный эффект достигается путем нокаута гена *CCR5 ex vivo* в Т-клетках человека и в одном исследовании — путем редактирования ГСК.

В первом клиническом исследовании (ClinicalTrials.gov NCT00842634) редактирования генома, опубликованом Tebas с соавт. [25], были продемонстрированы обнадеживающие результаты. В частности, отмечается четырехкратное увеличение продолжительности периода, в котором *CCR5*-модифицированные лимфоциты обнаруживаются в организме пациента, в сравнении с немодифицированными лимфоцитами той же популяции. При этом у одного пациента, являвшегося гетерозиготой в отношении *CCR5*-32 аллеля, уровень вирусной нагрузки временно снизился ниже минимально детектируемых значений. В то же время обращает внимание небольшой размер когорты пациентов ($n=6$), включенных в исследование. Продолжающиеся клинические исследования, включающие значительно большее число участников, позволят сделать более определенные выводы о безопасности и эффективности технологии. На сегодняшний день более 80 пациентов с ВИЧ-инфекцией включены в клинические исследования с введением отредактированных Т-лимфоцитов человека и отменой АРВТ. Результаты 2 фазы этих исследований станут известны в ближайшем будущем.

В то время как технология с использованием нуклеаз цинковых пальцев крайне перспективна, особенно с учетом того, что ни один из других инструментов редактирования генома для нокаута *CCR5* на сегодняшний день не вступил в стадию клинических исследований, применение этой технологии имеет некоторые ограничения.

Основное ограничение — относительная сложность синтеза нуклеаз. Создание структуры и синтез нуклеазы цинковых пальцев — длительный и трудоемкий процесс, требующий значительных финансовых затрат. В то же время следует отметить, что если нуклеазы цинковых пальцев уже созданы для конкретного локуса (как, например, *CCR5* ZFN), то масштабирование созданной нуклеазы не является значимой технической проблемой.

TALEN

Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), являются рекомбинантными белками, структурно и функционально схожими с нуклеазами цинковых пальцев, однако используют большую степень специфичности к нуклеотидной последовательности. TALEs (эффекторы, не сопряженные с нуклеазой) были обнаружены в природе у бактерий рода *Xanthomonas*.

Открытие модульной структуры TALE, подобно ZFN, открыло возможность создания ДНК-связывающих доменов произвольной специфичности.

ДНК-связывающий домен TALEN содержит повторяющиеся консервативные структурные единицы нескольких типов, каждая из которых специфична к одному из нуклеотидов, что значительно удобнее при конструировании новых белков для произвольных последовательностей в сравнении с ZFN. Библиотека TALENs достаточно быстро была собрана для 18 740 генов человека. Кроме того, связывание большого количества специфичных пар оснований TALENs предполагает, что конструкция, вероятно, будет обладать большей специфичностью.

На основе опубликованных исследований *in vitro* на сегодняшний день можно заключить, что технология TALEN является перспективной альтернативой ZFNs в редактировании генома. Данные ряда исследований *in vitro* демонстрируют аналогичную по сравнению с ZFNs эффективность. Высокоэффективное редактирование *CCR5* при помощи системы TALEN было разработано в Университете Гамбурга под руководством профессора Бориса Фезе. В серии исследований с редактированием человеческих Т-лимфоцитов продемонстрированы высокая эффективность (60%) и безопасность изобретения *CCR5-Uco-TALEN* [26, 27]. По предварительным результатам совместной научной группы Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова и Университета Гамбурга с использованием системы *CCR5-Uco-TALEN*, общая эффективность модификации *CCR5* в человеческих ГСК составляет не менее 40% (неопубликованные данные), что позволяет рассчитывать на высокую эффективность при отработке протокола клинического применения. Исследования данного изобретения продолжаются в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. академика И.П. Павлова. В исследовании, опубликованном В. Shi et al., с целью нокаута гена *CCR5* были созданы и протестированы двадцать восемь TALE-нуклеаз, специфичных к разным участкам гена *CCR5* [28]. При этом наиболее эффективная в плане редактирования нуклеаза TALEN была специфична к тому же локусу, что и ранее разработанная нуклеаза *CCR5-Uco-TALEN*. При ее использовании были продемонстрированы более высокая эффективность и низкое количество нецелевых мутаций в сравнении с известной нуклеазой «цинковых пальцев» (*CCR5-ZFN*), которые уже применяются в клинических исследованиях.

CRISPR-Cas9

Новейшим инструментом редактирования генома является система CRISPR-Cas9 (короткие кластерные палиндромные повторы, равномерно удаленные друг от друга), описанная в результате исследований механизмов клеточной защиты прокариот от экзогенной генетической информации. CRISPR-Cas9 представляет собой комплекс Cas9 эндонуклеазы и короткой искусственной молекулы РНК, называемой направляющей РНК (single-guide RNA, sgRNA), которая используется в качестве матрицы для узнавания гомологичной последовательности. Белок Cas9 создает двуцепочечные разрывы рядом с тем местом генома, где направляющая РНК связала целевую последовательность. Конечным результатом является sgRNA:Cas9 нуклеолитический комплекс со специфичностью, близкой к технологиям ZFN или TALENs. В отличие от описанных ранее нуклеаз, комплекс CRISPR-Cas9 не требует изменения белковых субъединиц, так как специфичность определяется направляющей РНК, что значительно упрощает перенаправление Cas9 на любую желаемую последовательность ДНК.

Возможность применения системы CRISPR-Cas9 для нокаута CCR5 в ГСК была впервые продемонстрирована в 2014 г. В работе была продемонстрирована высокая эффективность биаллельной модификации: 26,8% (± 7.1) от ГСК, в которых произошло редактирование, с минимальным уровнем нецелевых модификаций [29].

Учитывая легкость изготовления молекул нуклеиновых кислот произвольной последовательности, CRISPR-Cas9 уже в настоящее время в значительной степени превосходит по распространенности применения другие технологии редактирования генома в исследовательских целях.

Другие мишени редактирования генома для лечения ВИЧ

Описанные инструменты редактирования генома могут использоваться для удаления генов-мишеней, что обуславливает возможность их применения для полного удаления интегрированных в геномную ДНК генов ВИЧ. Исследование, проведенное Ebina et al. [30] показало, что редактирование (удаление интегрированной в ДНК ВИЧ) в Т-лимфоцитах привело к 65% редукции активности ВИЧ после повторной реактивации. Удаление генов ВИЧ из геномной ДНК было подтверждено методом секвенирования. В 2016 г. опубликовано подобное исследование Kaminski et al. [31], подтверждающее эффективность использования CRISPR-Cas9 в качестве инструмента для удаления, интегрированного в ДНК ВИЧ, и безопасность метода, включая отсутствие нецелевых

модификаций и сохранение жизнеспособности и функциональной активности отредактированных Т-лимфоцитов человека.

В то же время подобный подход к терапии ВИЧ с использованием интегрированных генов вируса в качестве мишеней для инженерных эндонуклеаз может привести к появлению нечувствительных к такой терапии штаммов ВИЧ. Исследование De Silva Feelixge et al. [32] показало, что при применении ZFNs небольшие мутации, возникающие внутри рамки считывания в месте разрезания вирусного гена, не всегда являются инактивирующими, однако могут создавать резистентность к повторному разрезанию эндонуклеазами. Подобные результаты были также получены при использовании CRISPR-cas9 в качестве инструмента редактирования [33].

Несколько исследовательских групп использовали ген CXCR4 в качестве мишени редактирования для лечения ВИЧ инфекции. Х4-тропный ВИЧ использует этот корецептор для проникновения в клетку. Кроме того, возможна трансформация CCR5-специфичного варианта ВИЧ в CXCR4-специфичный, что может сделать неэффективным подход с модификацией гена CCR5. Для редактирования CXCR4 в Т-лимфоцитах были успешно использованы как ZFN, так и CRISPR/Cas9. Использование CXCR4 в качестве гена-мишени невозможно при редактировании ГСК. Это связано с тем, что этот рецептор играет важное функциональное значение для ГСК, прежде всего для осуществления хоуминг-эффекта, что не позволяет использовать его для разработки метода лечения ВИЧ-инфекции на основе трансплантации модифицированных ГСК. Авторы предполагают перспективу применения этого подхода с использованием редактирования Т-лимфоцитов [34].

Заключение

В настоящее время с помощью различных инструментов была продемонстрирована возможность редактирования целого ряда генов-мишеней, модификация которых может привести к излечению от ВИЧ-инфекции. Редактирование генома *ex vivo* хорошо сочетается с уже существующими протоколами клеточной терапии, и в первую очередь с трансплантацией ГСК. В связи с этим ГСК являются одной из наиболее перспективных популяций клеток для редактирования генома [35]. В то же время ГСК являются родоначальницами всех клеток крови, в том числе и CD4+ Т-лимфоцитов, являющихся основными мишенями для ВИЧ. Наиболее перспективным подходом является редактирование гена CCR5 ГСК с последующей трансплантацией, что искусственно в определенной степени может воссоздать случай «Берлинского пациента». Таким образом, сочетание широко

применяемой для лечения некоторых онкологических заболеваний трансплантации ГСК с *ex vivo* редактированием генома представляет собой идеальное решение для пациентов с лимфомой на фоне ВИЧ-инфекции для излечения от обоих заболеваний.

Высокий уровень развития методов получения, выделения, очистки, оценки биологических свойств ГСК и обширный опыт медицинского применения трансплантации, в том числе успешный опыт лечения пациентов со злокачественными опухолями кроветворной и лимфатической ткани у пациентов с ВИЧ, включая ауто- и алло-ТГСК, а также актуальность проблемы ВИЧ и онкологии являются мощными предпосылками для быстрого перехода в фазу клинических исследований.

Авторы благодарят сотрудников Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и транспантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, а также профессора Ф.Д. Урнову за консультации, комментарии и замечания к статье.

Литература

1. <http://aidsinfo.unaids.org/>
2. Информационный бюллетень №40 Федерального научно-методического Центра по профилактике и борьбе со СПИДом. – М., 2015. – http://www.hivrussia.org/files/bul_40.pdf
3. Grulich A. E., van Leeuwen MT, Falster MO, et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 370(9581):59–67. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61050-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61050-2).
4. Engels E.A., Pfeiffer R.M., Goedert J.J., et al. HIV/AIDS Cancer Match Study. Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980-2002. *AIDS*.2006;20:1645–54. doi: 10.1097/01.aids.0000238411.75324.59
5. Shiels M., Pfeiffer R., Gail M., et al. Cancer Burden in the HIV-Infected Population in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:753–762. DOI: 10.1093/jnci/djr076.
6. Oriol A, Ribera JM, Bergua J, et al. High-dose chemotherapy and immunotherapy in adult Burkitt lymphoma: comparison of results in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients. *Cancer*. 2008;113(1):117-125.
7. Montoto S., Shaw K., Okosun J., et al. HIV Status Does Not Influence Outcome in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma Treated With Chemotherapy Using Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine, and Dacarbazine in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era. *JCO* 2012;30:4111-4116. doi: 10.1200/JCO.2012.44.8373.
8. Passweg JR, Baldomero H, Bader P et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40000 transplants annually. *Bone Marrow Transplantation* (2016);1-7; doi: 10.1038/bmt.2016.20.
9. Krishnan A, Molina A, Zaia J, et al. Durable remissions with autologous stem cell transplantation for high-risk HIV-associated lymphomas. *Blood*. 2005;105:874–878. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-04-1532>.
10. Balsalobre P, Díez-Martín JL, Re A, et al. Autologous stem-cell transplantation in patients with HIV-related lymphoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(13):2192–2198.
11. Re A, Michieli M, Casari S, et al. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation as salvage treatment for AIDS-related lymphoma: long-term results of the Italian Cooperative Group on AIDS and Tumors (GICAT) study with analysis of prognostic factors. *Blood*. 2009;114:1306–1313. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-02-202762>.
12. Díez-Martín JL, Balsalobre P, Re A, et al. Comparable survival between HIV+ and HIV– non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood*. 2009;113(23):6011–6014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-12-195388>.
13. Krishnan A, Palmer JM, Zaia JA, et al. HIV status does not affect the outcome of autologous stem cell transplantation (ASCT) for non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010;16(9):1302–1308. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.03.019>.
14. Serrano D, Miralles P, Balsalobre P, et al. Graft-Versus-Tumor Effect After Allogeneic Stem Cell Transplantation in HIV-Positive Patients With High-Risk Hematologic Malignancies. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES* 2013; Vol 29, N10: 1340-5. DOI: 10.1089/aid.2013.0001.
15. Afanasyev B., Popova M., Bondarenko S., et al. Saint-Petersburg experience of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia and human immunodeficiency virus. *Cellular Therapy and Transplantation (CTT)*. Vol.4, No.1-2, 2015. doi: 10.18620/1866-8836-2015-4-1-2-24-30.
16. Hütter G. and Zaia J. A. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with human immunodeficiency virus: the experiences of more than 25 years. *Clinical and Experimental Immunology*, 163: 284–295. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04312.x.
17. Kang EM, de Witte M, Malech H et al. Nonmyeloablative conditioning followed by transplantation of genetically modified HLA-matched peripheral blood progenitor cells for hematologic malignancies in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 2002; 99:698–701.
18. Liu R, Paxton WA, Choe S., et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86: 367–377.
19. Кофиади, И.А. Генетическая устойчивость к заражению ВИЧ и развитию СПИД в популяциях России и сопредельных государств : автореф. дисс. ... канд. биол. наук / И.А. Кофиади. – М., 2008.
20. Burnett JC, Li H., et al. Progress toward curing HIV infection with hematopoietic cell transplantation. *Stem Cells Cloning*. 2015 Jul 28;8:109-16. doi: 10.2147/SCCAA.S56050.
21. Marrow Transplants Fail to Cure Two H.I.V. Patients. *New York Times* Dec. 6, 2013 by Donald G. McNeil Jr.. (<http://www.nytimes.com>).
22. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* (2010) 11(9):636–46.10.1038/nrg2842
23. Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*. 2008;26(7):808-816.
24. Holt N, Wang J, Kim K, et al. Zinc finger nuclease-mediated CCR5 knockout hematopoietic stem cell transplantation controls HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol* (2010) 28(8):839–47.10.1038/nbt.1663.
25. Tebas P, Stein D, Tang W, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014;370: 901–10. doi: 10.1056/NEJMoa1300662 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01044654>).

26. Mock U., Machowicz R., Hauber I., et al. mRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5. *Nucl. Acids Res.* first published online May 11, 2015 doi:10.1093/nar/gkv469.

27. Mock U., Hauber I., Fehse B. Digital PCR to assess gene-editing frequencies (GEF-dPCR) mediated by designer nucleases. *Nat Protoc.* 2016;11(3):598-615.

28. Shi, B., Li, J., Shi, X., et al. TALEN-mediated knockout of CCR5 confers protection against infection of human immunodeficiency virus. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: Post Acceptance: October 03, 2016.* doi:10.1097/QAI.0000000000001190.

29. Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell.* 2014;15(5):643–52. doi:10.1016/j.stem.2014.10.004.

30. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y. et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 System to Disrupt Latent HIV-1 Provirus. *Scientific Reports* 3 (August 26, 2013), doi:10.1038/srep02510.

31. Kaminski R., Chen Y., Fischer T., et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Scientific Reports* 6, Article number: 22555 (2016). doi:10.1038/srep22555.

32. De Silva Feelixge H.S., Stonea D., Pietz H.L., et al. Detection of treatment-resistant infectious HIV after genome-directed antiviral endonuclease therapy. *Antiviral Research, Vol 126, Feb 2016, P 90 – 98.* doi:10.1016/j.antiviral.2015.12.007.

33. Wang Z., Pan Q., Gendron P., et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Reports* 15, Issue 3, p481 – 489, 19 April 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.042>.

34. Hou P, Chen S, Wang S, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Scientific Reports.* 2015;5:15577. doi:10.1038/srep15577.

35. Lepik K.V., Popova M.O., Shakirova A.I. Site-specific genome editing for hematopoietic stem cells transplantation-based gene therapy approaches. *Genes and Cells.* 2016;11(2):21-9.

References

- <http://aidsinfo.unaids.org/>
- Informacionnyj bjulleten' №40 Federal'nogo nauchno-metodicheskogo Centra po profilaktike i bor'be so SPIDom. Moskva 2015 (http://www.hivrusia.org/files/bul_40.pdf).
- Gulich A. E., van Leeuwen MT, Falster MO, et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 370(9581):59–67. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61050-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61050-2).
- Engels E.A., Pfeiffer R.M., Goedert J.J., et al. HIV/AIDS Cancer Match Study. Trends in cancer risk among people with AIDS in the United States 1980-2002. *AIDS.*2006;20:1645–54. doi: 10.1097/01.aids.0000238411.75324.59
- Shiels M., Pfeiffer R., Gail M., et al. Cancer Burden in the HIV-Infected Population in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:753–762. DOI: 10.1093/jnci/djr076.
- Oriol A, Ribera JM, Bergua J, et al. High-dose chemotherapy and immunotherapy in adult Burkitt lymphoma: comparison of results in human immunodeficiency virus-infected and noninfected patients. *Cancer.* 2008;113(1):117-125.
- Montoto S., Shaw K., Okosun J., et al. HIV Status Does Not Influence Outcome in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma Treated With Chemotherapy Using Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine, and Dacarbazine in the Highly Active Antiretroviral Therapy Era. *JCO* 2012;30:4111-4116. doi:10.1200/JCO.2012.44.8373.
- Passweg JR, Baldomero H, Bader P et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40000 transplants annually. *Bone Marrow Transplantation* (2016);1-7; doi: 10.1038/bmt.2016.20.
- Krishnan A, Molina A, Zaia J, et al. Durable remissions with autologous stem cell transplantation for high-risk HIV-associated lymphomas. *Blood.* 2005;105:874–878. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-04-1532>.
- Balsalobre P, Dez-Martín JL, Re A, et al. Autologous stem-cell transplantation in patients with HIV-related lymphoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(13):2192–2198.
- Re A, Michieli M, Casari S, et al. High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation as salvage treatment for AIDS-related lymphoma: long-term results of the Italian Cooperative Group on AIDS and Tumors (GICAT) study with analysis of prognostic factors. *Blood.* 2009;114:1306–1313. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-02-202762>.
- Diez-Martin JL, Balsalobre P, Re A, et al. Comparable survival between HIV+ and HIV– non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood.* 2009;113(23):6011–6014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-12-195388>.
- Krishnan A, Palmer JM, Zaia JA, et al. HIV status does not affect the outcome of autologous stem cell transplantation (ASCT) for non-Hodgkin lymphoma (NHL). *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(9):1302–1308. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.03.019>.
- Serrano D, Miralles P, Balsalobre P, et al. Graft-Versus-Tumor Effect After Allogeneic Stem Cell Transplantation in HIV-Positive Patients With High-Risk Hematologic Malignancies. *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES* 2013; Vol 29, N10: 1340-5. DOI: 10.1089/aid.2013.0001.
- Afanasyev B., Popova M., Bondarenko S., et al. Saint-Petersburg experience of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with acute leukemia and human immunodeficiency virus. *Cellular Therapy and Transplantation (CTT).* Vol.4, No.1-2, 2015. doi: 10.18620/1866-8836-2015-4-1-2-24-30.
- Hütter G. and Zaia J. A. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in patients with human immunodeficiency virus: the experiences of more than 25 years. *Clinical and Experimental Immunology*, 163: 284–295. doi:10.1111/j.1365-2249.2010.04312.x.
- Kang EM, de Witte M, Malech H et al. Nonmyeloablative conditioning followed by transplantation of genetically modified HLA-matched peripheral blood progenitor cells for hematologic malignancies in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 2002; 99:698–701.
- Liu R, Paxton WA, Choe S., et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86: 367–377.
- Kofiadi I.A. Geneticheskaja ustojchivost' k zarazheniju VICH i razvitiju SPID v populjacijah Rossii i sopredel'nyh gosudarstv. Avtoreferat dissertacii na soiskanie uchenoj stepeni kandidata biologicheskijh nauk, 16 APR 2008, Moskva.
- Burnett JC, Li H., et al. Progress toward curing HIV infection with hematopoietic cell transplantation. *Stem Cells Cloning.* 2015 Jul 28;8:109-16. doi: 10.2147/SCCAA.S56050.
- Marrow Transplants Fail to Cure Two H.I.V. Patients. *New York Times* Dec. 6, 2013 by Donald G. McNeil Jr.. (<http://www.nytimes.com>).
- Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* (2010) 11(9):636–46. doi:10.1038/nrg2842
- Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology.* 2008;26(7):808-816.

24. Holt N, Wang J, Kim K, et al. Zinc finger nuclease-mediated CCR5 knockout hematopoietic stem cell transplantation controls HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol* (2010) 28(8):839–47. doi:10.1038/nbt.1663.
25. Tebas P, Stein D, Tang W, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014;370: 901–10. doi: 10.1056/NEJMoa1300662 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01044654>).
26. Mock U., Machowicz R., Hauber I., et al. mRNA transfection of a novel TAL effector nuclease (TALEN) facilitates efficient knockout of HIV co-receptor CCR5. *Nucl. Acids Res.* first published online May 11, 2015 doi:10.1093/nar/gkv469.
27. Mock U., Hauber I., Fehse B. Digital PCR to assess gene editing frequencies (GEF-dPCR) mediated by designer nucleases. *Nat Protoc*. 2016;11(3):598-615.
28. Shi, B., Li, J., Shi, X., et al. TALEN-mediated knockout of CCR5 confers protection against infection of human immunodeficiency virus. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: Post Acceptance: October 03, 2016*. doi: 10.1097/QAI.0000000000001190.
29. Mandal PK, Ferreira LM, Collins R, et al. Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell*. 2014;15(5):643–52. doi:10.1016/j.stem.2014.10.004.
30. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y. et al. Harnessing the CRISPR/Cas9 System to Disrupt Latent HIV-1 Provirus. *Scientific Reports* 3 (August 26, 2013), doi:10.1038/srep02510.
31. Kaminski R., Chen Y., Fischer T., et al. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR/Cas9 Gene Editing. *Scientific Reports* 6, Article number: 22555 (2016). doi:10.1038/srep22555.
32. De Silva Feelixge H.S., Stonea D., Pietz H.L., et al. Detection of treatment-resistant infectious HIV after genome-directed antiviral endonuclease therapy. *Antiviral Research*, Vol 126, Feb 2016, P 90–98. doi:10.1016/j.antiviral.2015.12.007.
33. Wang Z., Pan Q., Gendron P., et al. CRISPR/Cas9-Derived Mutations Both Inhibit HIV-1 Replication and Accelerate Viral Escape. *Cell Reports* 15, Issue 3, p481–489, 19 April 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.042>.
34. Hou P, Chen S, Wang S, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Scientific Reports*. 2015;5:15577. doi:10.1038/srep15577.
35. Lepik K.V., Popova M.O., Shakirova A.I. Site-specific genome editing for hematopoietic stem cells transplantation-based gene therapy approaches. *Genes and Cells*. 2016;11(2):21-9.

Авторский коллектив:

Попова Марина Олеговна — врач-гематолог, заведующая научной лабораторией трансплантологии отдела биотехнологии Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, к.м.н., доцент кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова; тел.: +7-911-711-39-77, e-mail: marina.popova.spb@gmail.com

Сергеев Владислав Сергеевич — врач клинической лабораторной диагностики, заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова; тел.: +7-911-129-75-80, e-mail: sergeev.vlad@gmail.com

Лепик Кирилл Викторович — врач-гематолог Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова; тел.: +7-911-783-95-08, e-mail: lepikkv@gmail.com

Шакирова Алена Игоревна — биолог лаборатории трансплантологии и молекулярной гематологии Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова; тел.: +7-911-173-35-14, e-mail: lilyur@yandex.ru

Поттер Алиса Яновна — младший научный сотрудник лаборатории трансплантологии и молекулярной гематологии Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова; тел.: +7-921-866-98-23, e-mail: potteralisa@gmail.com

Бархатов Ильдар Мунерович — врач клинической лабораторной диагностики, заведующий лабораторией трансплантологии и молекулярной гематологии Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, к.м.н.; тел.: +7-911-778-27-85, e-mail: i.barkhatov@gmail.com

Фезе Борис — заведующий лабораторией, руководитель проекта научно-исследовательского отдела клеточной и генной терапии, отдела трансплантации стволовых клеток, медицинского центра университета Гамбург-Эппендорф, доктор естественных наук, профессор; тел.: +4915222816577, e-mail: fehse@uke.uni-hamburg.de

Афанасьев Борис Владимирович — врач-гематолог, врач-онколог, директор Научно-исследовательского института детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, заведующий кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, д.м.н., профессор; тел.: 8(812)338-62-65, e-mail: bmt-director@spb-gmu.ru