

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991692 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.12.30

(51) Int. Cl. C12N 5/074 (2010.01)
A61K 35/545 (2015.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.01.14

(54) ИММУНОСКОНСТРУИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ

(31) 62/445,969

(32) 2017.01.13

(33) US

(86) PCT/US2018/013688

(87) WO 2018/132783 2018.07.19

(71) Заявитель:
ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)

(72) Изобретатель:
Шрепфер Тоня, Дойзе Тобиас (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к плюрипотентным клеткам, которые используются терапевтически для регенерации тканей, но позволяют избежать отторжения пациентами, которые их получают. В частности, изобретение относится к гипоиммунным плюрипотентным клеткам, которые избегают иммунного отторжения хозяином. В клетках отсутствуют основные антигены иммунной системы, которые запускают иммунные ответы, и клетки сконструированы так, что предотвращается фагоцитарный эндоцитоз. Изобретение дополнительно относится к универсально приемлемым "готовым" плюрипотентным клеткам и их производным для генерации или регенерации определенных тканей и органов.

A1

201991692

201991692

A1

ИММУНОСКОНСТРУИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ**I. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ**

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки в США № 62/445969, поданной 13 января 2017 года.

II. ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Регенеративная клеточная терапия является важным потенциальным лечением для регенерации поврежденных органов и тканей. С учетом низкой доступности органов для трансплантации и сопутствующего длительного ожидания возможность регенерации ткани путем трансплантации легкодоступных клеточных линий пациентам очевидно является привлекательной. Регенеративная клеточная терапия показала многообещающие начальные результаты для восстановления поврежденных тканей после трансплантации на животных моделях (например, после инфаркта миокарда). Однако склонность иммунной системы реципиента трансплантата отторгать аллогенный материал, значительно снижает потенциальную эффективность терапевтических средств и уменьшает возможные положительные эффекты, связанные с таким лечением.

III. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Регенеративная клеточная терапия является важным потенциальным лечением для регенерации поврежденных органов и тканей. С учетом низкой доступности органов для трансплантации и сопутствующего длительного ожидания возможность регенерации ткани путем трансплантации легкодоступных клеточных линий пациентам очевидно является привлекательной. Регенеративная клеточная терапия показала многообещающие начальные результаты для восстановления поврежденных тканей после трансплантации на животных моделях (например, после инфаркта миокарда). Однако склонность иммунной системы реципиента трансплантата отторгать аллогенный материал, значительно снижает потенциальную эффективность терапевтических средств и уменьшает возможные положительные эффекты, связанные с таким лечением.

Аутологичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) теоретически представляют собой неограниченный источник

клеток для стратегий регенерации органов на основе клеток, специфических для пациента. Их генерирование, однако, создает технические и производственные проблемы и является длительным процессом, который концептуально предотвращает любые неотложные методы лечения. Аллогенные процедуры на основе iPSC проще с точки зрения производства и позволяют создавать хорошо отобранные, стандартизированные, высококачественные клеточные продукты. Однако из-за их аллогенного происхождения такие клеточные продукты подвергнутся отторжению. С уменьшением или устранением антигенности клеток могут быть получены универсально приемлемые клеточные продукты. Поскольку плюрипотентные стволовые клетки могут быть дифференцированы в любой тип клеток из трех зародышевых слоев, потенциальное применение терапии стволовых клеток достаточно широко. Дифференцировка может быть выполнена *ex vivo* или *in vivo* путем трансплантации клеток-предшественников, которые продолжают дифференцироваться и созревать в окружении органа места имплантации. Дифференцировка *ex vivo* позволяет исследователям или клиницистам внимательно следить за процедурой и гарантирует, что перед трансплантацией создается правильная популяция клеток.

Однако в большинстве случаев при клинической терапии трансплантатов избегают применения недифференцированных плюрипотентных стволовых клеток из-за их склонности к образованию тератом. Скорее, такие методы лечения имеют тенденцию использовать дифференцированные клетки (например, кардиомиоциты, полученные из стволовых клеток, трансплантированные в миокард пациентов, страдающих сердечной недостаточностью). Клиническое применение таких плюрипотентных клеток или тканей выиграет от «функции безопасности», которая контролирует рост и выживание клеток после их трансплантации.

В данной области ведется поиск стволовых клеток, способные продуцировать клетки, которые используются для регенерации больных или дефектных клеток. Могут быть использованы плюрипотентные стволовые клетки (PSC), потому что они быстро размножаются и дифференцируются во многие возможные типы клеток. Семейство PSC включает несколько членов, созданных различными

способами и обладающих различными иммуногенными свойствами. Совместимость пациента со сконструированными клетками или тканями, полученными из PSC, определяет риск иммунного отторжения и потребность в иммуносупрессии.

Эмбриональные стволовые клетки (ESC), выделенные из внутренней клеточной массы бластоцист, демонстрируют антигены гистосовместимости, которые не соответствуют реципиентам. Этот иммунологический барьер не может быть разрешен с помощью банков ESC, типированных по человеческому лейкоцитарному антигену (HLA), поскольку даже HLA-подобранные трансплантаты PSC подвергаются отторжению из-за несоответствия в молекулах, отличных от HLA, которые функционируют как минорные антигены. До настоящего времени доклинический успех подходов, основанных на PSC, был достигнут только в моделях с иммуносупрессией или иммунодефицитом или когда клетки инкапсулированы и защищены от иммунной системы хозяина. Системная иммуносупрессия, используемая при трансплантации аллогенных органов, однако, не оправдана для регенеративных подходов. Иммуносупрессивные лекарственные средства имеют серьезные побочные эффекты и значительно увеличивают риск инфекций и злокачественных новообразований.

Чтобы обойти проблему отторжения, были разработаны различные методы создания специфичных для пациента плюрипотентных стволовых клеток. К ним относятся перенос ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит (стволовые клетки с переносом ядра соматических клеток (SCNT)), слияние соматической клетки с ESC (гибридная клетка) и перепрограммирование соматических клеток с использованием определенных факторов транскрипции (индуцированные PSC или iPSC). Однако стволовые клетки SCNT и iPSC могут обладать иммунной несовместимостью с донором ядра или клеток, соответственно, несмотря на хромосомную идентичность. Стволовые клетки SCNT несут митохондриальную ДНК (мтДНК), передаваемую из ооцита. Белки, кодируемые мтДНК, могут действовать как релевантные минорные антигены и вызывать отторжение. Мутации ДНК и мтДНК и генетическая нестабильность, ассоциированные с перепрограммированием и наращиванием культуры

iPSC, также могут создавать минорные антигены, важные для иммунного отторжения. Этот ранее неизвестный иммунный барьер снижает вероятность успешного крупномасштабного конструирования совместимых специфичных для пациента тканей с использованием стволовых клеток SCNT или iPSC.

IV. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Были получены гипоиммунные плюрипотентные (HiP) клетки, которые избегают отторжения иммунной системой хозяина. Синцитиотрофобластные клетки плаценты были использованы для формирования границы между материнской кровью и тканью плода. Экспрессия MHC I или HLA-I и MHC II или HLA-II была снижена. Уровень CD47 был увеличен. Этот способ нарушенной способности антигенной презентации и защиты от врожденного иммунного клиренса уклонялся от иммунного отторжения хозяином. Это было показано для клеток HiP и, особенно, для клеток эктодермы, мезодермы и эндодермы, в которые дифференцировались клетки HiP.

Таким образом, изобретение относится к способу получения гипоиммуногенной плюрипотентной стволовой клетки, включающему: устранение активности обоих аллелей гена B2M в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке (iPSC); устранение активности обоих аллелей гена CIITA в iPSC; и увеличение экспрессии CD47 в iPSC.

В предпочтительном варианте осуществления способа iPSC является человеческой, ген B2M является человеческим, ген CIITA является человеческим, и повышенная экспрессия CD47 является результатом введения по меньшей мере одной копии человеческого гена CD47 под контролем промотора в iPSC-клетку. В другом предпочтительном варианте осуществления способа iPSC является мышиной, ген B2m является мышинным, ген Ciita является мышинным, и повышенная экспрессия Cd47 является результатом введения по меньшей мере одной копии мышинового гена Cd47 под контролем промотора в iPSC-клетку. В более предпочтительном варианте осуществления промотор является конститутивным промотором.

В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящем описании, нарушение в обоих аллелях гена B2M является результатом реакции коротких палиндромных повторов, регулярно

расположенных группами (CRISPR)/Cas9, которая разрушает оба аллеля гена B2M. В других вариантах осуществления способа нарушение обоих аллелей гена CIITA является результатом реакции CRISPR, которая нарушает оба аллеля гена CIITA.

Изобретение относится к человеческой гипои иммуногенной плюрипотентной (hNIP) стволовой клетке, содержащей: одно или более изменений, которые инактивируют оба аллеля эндогенного гена B2M; одно или более изменений, которые инактивируют оба аллеля эндогенного гена CIITA; и одно или более изменений, вызывающих повышенную экспрессию гена CD47 в стволовых клетках hNIP; где указанная стволовая клетка hNIP вызывает первый ответ клетки-натурального киллера (NK), который слабее, чем второй ответ NK-клетки, вызванный индуцированной плюрипотентной стволовой клеткой (iPSC), которая включает указанные изменения B2M и CIITA, но не включает указанную повышенную экспрессию гена CD47, и где указанные первый и второй ответы NK-клеток измеряют путем определения уровней IFN- α в NK-клетках, инкубированных с указанными hNIP или iPSC in vitro.

Изобретение относится к человеческой гипои иммуногенной плюрипотентной (hNIP) стволовой клетке, содержащей: одно или более изменений, которые инактивируют оба аллеля эндогенного гена B2M; одно или более изменений, которые инактивируют оба аллеля эндогенного гена CIITA; и изменение, вызывающее повышенную экспрессию гена CD47 в стволовых клетках hNIP; где стволовая клетка hNIP вызывает первый Т-клеточный ответ у гуманизированной мышины линии, который ниже, чем второй Т-клеточный ответ у гуманизированной мышины линии, вызванный iPSC, и где первый и второй Т-клеточные ответы измеряют путем определения уровня IFN- γ у гуманизированных мышей в анализе ELISPOT.

Изобретение относится к способу, включающему трансплантацию человеку-пациенту раскрытых в настоящем описании стволовых клеток hNIP. Изобретение, кроме того, относится к применению раскрытых в настоящем описании стволовых клеток hNIP для получения лекарственного средства для лечения состояний,

требующих трансплантации клеток.

Изобретение относится к гипоиммуногенной плюрипотентной клетке, содержащей эндогенную функцию антигена главного комплекса гистосовместимости класса I (HLA-I), которая снижена по сравнению с родительской плюрипотентной клеткой; эндогенную функцию антигена главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-II), которая снижена по сравнению с родительской плюрипотентной клеткой; и пониженную восприимчивость к NK-клеточному уничтожению по сравнению с родительской плюрипотентной клеткой; где гипоиммуногенная плюрипотентная клетка менее восприимчива к отторжению при трансплантации пациенту в результате снижения функции HLA-I, снижения функции HLA-II и снижения восприимчивости к NK-клеточному уничтожению.

В некоторых вариантах осуществления уровень гипоиммуногенных плюрипотентных клеток уменьшается за счет снижения экспрессии белка β -2-микроглобулина. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий белок β -2-микроглобулина, нокаутирован. В более предпочтительном варианте осуществления белок β -2-микроглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В более предпочтительном варианте осуществления белок β -2-микроглобулина имеет последовательность SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления функция HLA-I снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-A. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий белок HLA-A, нокаутирован. В некоторых вариантах осуществления функция HLA-I снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-B. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий белок HLA-B, нокаутирован. В некоторых вариантах осуществления функция HLA-I снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-C. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий белок HLA-C, нокаутирован.

В другом варианте осуществления гипоиммуногенные плюрипотентные клетки не обладают функцией HLA-I.

Изобретение относится к гипоиммуногенной плюрипотентной

клетке, в которой функция HLA-II снижена за счет снижения экспрессии белка CIITA. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий белок CIITA, нокаутирован. В более предпочтительном варианте осуществления белок CIITA имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. В более предпочтительном варианте осуществления белок CIITA имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления функция HLA-II снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-DP. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий белок HLA-DP, нокаутирован. В некоторых вариантах осуществления функция HLA-II снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-DR. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий белок HLA-DR, нокаутирован. В некоторых вариантах осуществления функция HLA-II снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-DQ. В предпочтительном варианте осуществления ген, кодирующий белок HLA-DQ, нокаутирован.

Изобретение относится к гипоиммуногенным плюрипотентным клеткам, которые не обладают функцией HLA-II.

Изобретение относится к гипоиммуногенным плюрипотентным клеткам с пониженной восприимчивостью к макрофагальному фагоцитозу или NK-клеточному уничтожению. Пониженная восприимчивость вызвана повышенной экспрессией белка CD47. В некоторых вариантах осуществления повышенная экспрессия CD47 является результатом модификации эндогенного генного локуса CD47. В других вариантах осуществления повышенная экспрессия CD47 является результатом экспрессии трансгена CD47. В предпочтительном варианте осуществления белок CD47 имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. В более предпочтительном варианте осуществления белок CD47 имеет последовательность SEQ ID NO: 3.

Изобретение относится к гипоиммуногенным плюрипотентным клеткам, содержащим ген «самоубийства», который активируется триггером, который вызывает гибель гипоиммуногенной плюрипотентной или дифференцированной клетки потомства. В предпочтительном варианте осуществления ген «самоубийства»

представляет собой ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk), а триггером является ганцикловир. В более предпочтительном варианте осуществления ген HSV-tk кодирует белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. В более предпочтительном варианте осуществления ген HSV-tk кодирует белок, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4.

В другом предпочтительном варианте осуществления ген «самоубийства» представляет собой ген цитозин-дезаминазы *Escherichia coli* (EC-CD), а триггером является 5-фторцитозин (5-FC). В более предпочтительном варианте осуществления ген EC-CD кодирует белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. В более предпочтительном варианте осуществления ген EC-CD кодирует белок, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5.

В другом предпочтительном варианте осуществления ген «самоубийства» кодирует индуцируемый белок каспазы, а триггер представляет собой химический индуктор димеризации (CID). В более предпочтительном варианте осуществления индуцируемый ген кодирует белок каспазы, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. В более предпочтительном варианте осуществления ген кодирует белок каспазы, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6. В более предпочтительном варианте осуществления CID представляет собой AP1903.

Изобретение относится к способу получения гипоиммуногенной плюрипотентной клетки, включающему снижение эндогенной функции антигена главного комплекса гистосовместимости класса I (HLA-I) в плюрипотентной клетке; снижение эндогенной функции антигена главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-II) в плюрипотентной клетке; и увеличение экспрессии белка, который снижает восприимчивость плюрипотентной клетки к макрофагальному фагоцитозу или к NK-клеточному уничтожению.

В одном варианте осуществления способа функция HLA-I снижается за счет снижения экспрессии белка β -2-микроглобулина. В предпочтительном варианте экспрессия белка β -2-микроглобулина

снижается путем нокаута гена, кодирующего белок β -2-микроглобулина. В более предпочтительном варианте осуществления белок β -2-микроглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. В более предпочтительном варианте осуществления белок β -2-микроглобулина имеет последовательность SEQ ID NO: 1.

В другом варианте осуществления способа функция HLA-I снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-A. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия белка HLA-A снижается путем нокаута гена, кодирующего белок HLA-A. В другом варианте осуществления способа функция HLA-I снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-B. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия белка HLA-B снижается путем нокаута гена, кодирующего белок HLA-B. В другом варианте осуществления способа функция HLA-I снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-C. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия белка HLA-C снижается путем нокаута гена, кодирующего белок HLA-C.

В другом варианте осуществления способа типоммуногенная плюрипотентная клетка не обладает функцией HLA-I.

В другом варианте осуществления способа функция HLA-II снижается за счет снижения экспрессии белка CIITA. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия белка CIITA снижается путем нокаута гена, кодирующего белок CIITA. В более предпочтительном варианте осуществления белок CIITA имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2. В более предпочтительном варианте осуществления белок CIITA имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

В другом варианте осуществления способа функция HLA-II снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-DP. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия белка HLA-DP снижается путем нокаута гена, кодирующего белок HLA-DP. В другом варианте осуществления способа функция HLA-II снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-DR. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия белка HLA-DR снижается путем нокаута

гена, кодирующего белок HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления способа функция HLA-II снижается за счет снижения экспрессии белка HLA-DQ. В предпочтительном варианте осуществления экспрессия белка HLA-DQ снижается путем нокаута гена, кодирующего белок HLA-DQ.

В другом варианте осуществления способа типиммуногенная плюрипотентная клетка не обладает функцией HLA-II.

В другом варианте осуществления способа повышенная экспрессия белка, который снижает восприимчивость плюрипотентной клетки к макрофагальному фагоцитозу, является результатом модификации эндогенного генного локуса. В предпочтительном варианте осуществления эндогенный генный локус кодирует белок CD47. В другом варианте осуществления повышенная экспрессия белка является результатом экспрессии трансгена. В предпочтительном варианте осуществления трансген кодирует белок CD47. В более предпочтительном варианте осуществления белок CD47 имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3. В более предпочтительном варианте осуществления белок CD47 имеет последовательность SEQ ID NO: 3.

Другой вариант осуществления способа дополнительно включает экспрессию гена «самоубийства», который активируется триггером, который вызывает гибель типиммуногенной плюрипотентной или дифференцированной клетки потомства. В предпочтительном варианте осуществления ген «самоубийства» представляет собой ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk), а триггером является ганцикловир. В более предпочтительном варианте осуществления ген HSV-tk кодирует белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4. В более предпочтительном варианте осуществления ген HSV-tk кодирует белок, имеющий последовательность SEQ ID NO: 4.

В другом варианте осуществления способа ген «самоубийства» представляет собой ген цитозин-дезаминазы *Escherichia coli* (EC-CD), а триггером является 5-фторцитозин (5-FC). В предпочтительном варианте осуществления ген EC-CD кодирует белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5. В более предпочтительном

варианте ген EC-CD кодирует белок, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5.

В другом варианте осуществления способа ген «самоубийства» кодирует индуцируемый белок каспазы, а триггер представляет собой специфический химический индуктор димеризации (CID). В предпочтительном варианте осуществления способа ген кодирует индуцируемый белок каспазы, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. В более предпочтительном варианте осуществления ген кодирует индуцируемый белок каспазы, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6. В более предпочтительном варианте осуществления CID представляет собой AP1903.

V. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1А демонстрирует обоснование для новых гипоиммунных плюрипотентных клеток, описанных в настоящем документе. Плод защищен от «отторжения» во время беременности с помощью толерантности системы мать-плод. Клетки имеют пониженный уровень экспрессии МНС класса I. Они также имеют пониженную экспрессию МНС класса II. В них также активировался CD47. На Фигуре 1В показано, что толерантность в системе мать-плод опосредуется синцитиотрофобластными клетками. На Фигуре 1С показано, что в клетках синцитиотрофобластов отсутствуют МНС I и II и присутствует высокий уровень CD47.

На Фигуре 2 показаны мышинные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (miPSC), полученные из фибробластов C57BL/6. Плюрипотентность была продемонстрирована с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (отПЦР). Множество мРНК, связанных с плюрипотентностью, были обнаружены в клеточных экстрактах miPSC, но не в неиндуцированных клетках (родительских мышинных фибробластах).

Фигура 3 подтверждает плюрипотентность клеток miPSC. Клетки C57BL/6 miPSC образовывали тератомы у сингенных мышей, а также у голых мышей BALB/c и у мышей scid beige. У иммунокомпетентных аллогенных мышей BALB/c тератомы не образовывались.

На Фигуре 4 показано, что когда экспрессия β -2-

микроглобулина нарушается в клетках *miPSC*, экспрессия МНС-I не может быть индуцирована стимулированием IFN- γ (правая панель). В качестве контроля родительские клетки *miPSC* стимулировали IFN- γ (левая панель) и увеличивали их экспрессию МНС-I.

На Фигуре 5 показано, что нокаут *miPSC*/ β -2-микроглобулина, дополнительно включающий нокаут экспрессии *Ciita* (двойной нокаут), не демонстрирует какой-либо исходной экспрессии МНС-II и не может быть индуцирован TNF- α для экспрессии МНС-II.

На Фигуре 6А показано увеличение экспрессии Cd47 из трансгена, добавленного к дважды нокаутированным клеткам по β -2-микроглобулину/*Ciita* (клетки *iPSC^{hypo}*). На Фигуре 6В показано, что клетки C57BL/6 *iPSC^{hypo}* выживают в аллогенной среде BALB/c, а родительские клетки *iPSC* - нет.

На Фигуре 7 показан один из вариантов осуществления изобретения. Он показывает принципиальную схему конструирования *iPSC*, которая приводит к получению гипоиммунных плюрипотентных клеток по изобретению. Для создания гипоиммунных стволовых клеток была использована, во-первых, технология CRISPR-Cas 9, чтобы нокаутировать оба аллеля *B2m*. Во-вторых, технология CRISPR-Cas 9 была использована для нокаутирования обоих аллелей гена *Ciita*. В третьих, для нокаутирования гена *Cd47* был использован лентивирус.

Фигуре 8 А схематически изображена роль *B2m* в комплексе МНС I. Нокаут *B2m* истощает МНС I у мышей или HLA-I у людей. На Фигуре 8В схематически показано, что *Ciita* представляет собой транскрипционный фактор, который вызывает экспрессию МНС II у мышей или экспрессию HLA-II у людей. Нокаут *Ciita* истощает экспрессию МНС II или HLA-II.

На Фигурах 9А, 9В и 9С показано, что в *B2m* -/- *iPSC* отсутствует экспрессия МНС-I, в *B2m* -/- *Ciita* -/- *iPSC* отсутствует МНС-I и МНС-II, а в *B2m* -/- *Ciita* -/- *Cd47* tg *iPSC* отсутствует МНС -I и МНС-II, и сверхэкспрессируется Cd47.

На Фигурах 10 А, 10В, 10С, 10D и 10Е представлены мышинные модели трансплантированных «*iPSC* дикого типа» по сравнению с гипоиммунными *iPSC* в аллогенных или сингенных мышах-хозяевах.

Здесь iPSC были получены из мышей C57BL/6, а аллогенные мыши представляют собой BALB/c. Фигура 10А, «iPSC дикого типа» образовывали тератомы только в бедрах сингенных мышей C57BL/6. Напротив, у аллогенных мышей-хозяев (BALB/c) вырабатывался иммунный ответ, и тератомы не росли. На фигуре 10В «iPSC дикого типа» образовали тератомы у сингенных мышей C57BL/6. Фигура 10С, иммунный ответ предотвращал образование тератомы у аллогенных BALB/c. На Фигуре 10D сравнивается ответ Т-клеток (IFN- γ и IL-4) с iPSC у сингенных и аллогенных хозяев с использованием анализа частоты пятен (частота клеток, высвобождающих IFN- γ и IL-4). Высвобождение IFN- γ и IL-4 было очень низким у хозяев C57BL/6, но резко увеличилось у хозяев BALB/c. Фигура 10Е изображает ответы В-клеток у сингенных и аллогенных хозяев. iPSC инкубировали с сывороткой животных-хозяев, которые ранее получали iPSC. Связанные иммуноглобулины измеряли с помощью проточной цитометрии. Средняя интенсивность флуоресценции (MFI) была значительно выше по сравнению с сывороткой, взятой у аллогенных реципиентов-хозяев BALB/c.

На Фигурах 11 А, 11В, 11С, 11D и 1 показан частичный эффект нокаутирования гена B2M в iPSC, описанный выше. Фигура 11А, B2m -/- iPSC росли в бедрах сингенных мышей C57BL/6, образуя тератомы из-за отсутствия иммунного ответа, в то время как частичный иммунный ответ вырабатывался у аллогенных мышей-хозяев (BALB/c); например, некоторые из трансплантированных клеток выживают. Фигура 11В, B2m -/- iPSC образовали тератомы у сингенных мышей. Фигура 11С, частичная выживаемость (60%) была достигнута у аллогенных хозяев. Фигура 11D, различия в ответе Т-клеток (IFN- γ и IL-4) между двумя хозяевами показали слабый, но обнаруживаемый ответ Т-клеток против B2m -/- iPSC. На Фигуре 11Е показаны ответы В-клеток у разных мышей-хозяев, демонстрирующие более слабый иммунный ответ по сравнению с iPSC дикого типа. После аллогенной трансплантации B2m -/- iPSC в BALB/c наблюдался значительно более сильный иммуноглобулиновый ответ по сравнению с сингенной трансплантацией в C57BL/6. Таким образом, выживаемость B2m -/- iPSC у аллогенных реципиентов была

ограниченной.

На фигурах 12A, 12B, 12C, 12D и 12E показано повышенный частичный эффект нокаутирования гена *B2m* и гена *Ciita* в iPSC в отношении выживаемости клеток у сингенных и аллогенных мышей-хозяев. Фигура 12A, *B2m* -/- *Ciita* -/- iPSC образовывали тератомы в сингенных мышцах C57BL/6 из-за отсутствия иммунного ответа, тогда как частичный (но сниженный по сравнению с *B2m* -/- iPSC) иммунный ответ вырабатывался у аллогенных мышей-хозяев (BALB/c). Фигура 12B, *B2m* -/- *Ciita* -/- iPSC образовывали тератомы у сингенных мышей. На Фигуре 12C показано, что некоторые клеточные трансплантаты (91,7%) выживают у аллогенных хозяев. Фигура 12D, различия Т-клеточного ответа (IFN- γ и IL-4) между двумя хозяевами показали умеренно более высокий ответ IFN- γ у аллогенных реципиентов по сравнению с сингенными. На Фигуре 12E изображен ответ В-клеток у разных мышей-хозяев. Более слабый иммунный ответ сравнивали с wt iPSC и *B2m* -/- iPSC. Существенной разницы между аллогенными и сингенными реципиентами не наблюдалось. В целом, выживаемость *B2m* -/- *Ciita* -/- iPSC у аллогенных реципиентов была ограниченной, что может быть связано с измеряемым иммунным ответом.

На Фигурах 13A, 13B, 13C, 13D и 13E показан полный эффект нокаута гена *B2m* и гена *Ciita* и нокина трансгена *Cd47* в iPSC в отношении выживаемости клеток у сингенных и аллогенных мышей-хозяев. Фигура 13A, *B2m* -/- *Ciita* -/- *Cd47*tg iPSC тератомы росли как в бедрах сингенных C57BL/6, так и у аллогенных хозяев. Все трансплантированные клеточные трансплантаты выжили. Фигура 13B. *B2m* -/- *Ciita* -/- *Cd47*tg iPSC образовывали тератомы в C57BL/6. Фигура 13C, 100% клеточных трансплантатов выжили в аллогенных хозяевах. На Фигуре 13D показано отсутствие ответа Т-клеток (IFN- γ и IL-4) у аллогенных реципиентов. Разницы между двумя хозяевами не наблюдалось. На Фигуре 13E изображено отсутствие В-клеточных ответов у аллогенных реципиентов. Разницы между двумя хозяевами не наблюдалось. Таким образом, у аллогенных реципиентов была полная выживаемость *B2m* -/- *Ciita* -/- *Cd47*tg iPSC. Они не были иммуногенными, поскольку не вызывали ответа Т-

клеток или В-клеток.

На Фигурах 14А, 14В и 14С показано, что B2m -/- Ciita -/- Cd47tg iPSC (называемые неиммуногенными плюрипотентными клетками (НІР)) уклонялись от иммунной системы хозяина. Фигура 14А, экспрессия лиганда, стимулирующего NK-клетки, не повышалась в клетках НІР. Слитый белок, который распознает различные лиганды трансмембранного белка NK-клеток NKG2D, использовали для оценки уровня активирующих лигандов, которые могут активировать цитолитическую активность NK-клеток. Таким образом, связывание слитого белка с iPSC является общим параметром для экспрессии ими активирующих лигандов NKG2D. Фигура 14В, клетки НІР не заставляют NK-клетки увеличивать экспрессию CD107a, маркера функциональной активности NK-клеток. Напротив, B2m -/- Ciita -/- iPSC индуцировали экспрессию CD107a на NK-клетках и, таким образом, запускали их цитолитическую функцию. Фигура 14С, анализы IFN- γ Elispot с очищенными сингенными NK-клетками из селезенки мыши C57BL/6 не показали ответа NK-клеток, вызванного НІР-клетками. Таким образом, NK-клетки не были активированы для высвобождения IFN- γ . Частота пятен для клеток НІР не отличалась от частоты для нестимулированных NK-клеток (отрицательный контроль). Только B2m -/- Ciita -/- iPSC приводили к значительному увеличению частоты пятен IFN- γ .

На Фигуре 15А и 15В показаны дополнительные данные, показывающие, что клетки НІР уклонялись от отторжения или уничтожения врожденной иммунной системой благодаря трансгену Cd47. Анализ NK-клеток *in vivo* содержал смесь 50% iPSC и 50% НІР, которые инъецировали в богатую NK-клетками брюшину сингенных мышей C57BL/6 (сингенные). Здесь цитотоксичность была вызвана NK-клетками. Через 24 и 48 часов перитонеальные клетки извлекали и сортировали. На Фигуре 15А сравниваются iPSC с B2m-/- Ciita-/- iPSC (без трансгена Cd47). B2m-/- Ciita-/- iPSC селективно уничтожались NK-клетками. На Фигуре 15В сравниваются iPSC с B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg iPSC (клетки НІР). Клетки НІР не были избирательно уничтожены NK-клетками. Соотношение 50% НІР-клеток среди перитонеальных iPSC сохранялось, что указывало

на отсутствие стимулирования NK-клеток. Таким образом, в то время как нокауты MHC-I и MHC-II делают клетки очень чувствительными к уничтожению NK-клетками, избыточная экспрессия Cd47 удаляет стимулирующее взаимодействие NK-клеток.

На Фигуре 16 показано, что мышинные клетки HIP по изобретению демонстрировали нормальный мышинный кариотип.

На Фигурах 17A, 17B и 17C показано, что мышинные клетки HIP по изобретению сохраняли плюрипотентность во время процесса конструирования. Представлен ОТ-ПЦР анализ маркеров, общепринятых для выявления плюрипотентности, (Nanog, Oct 4, Sox2, Esrrb, Tbx3, Tc11 и актин в качестве контроля нагрузки). Маркеры плюрипотентности экспрессировались в течение всего трехстадийного процесса конструирования. На Фигуре 17A сравниваются iPSC, B2m -/- iPSC и мышинные фибробласты (отрицательный контроль). Клетки B2m -/- iPSC сохраняли гены плюрипотентности. На Фигуре 17B показан тот же анализ, но для B2m -/- Ciita -/- iPSC. Они сохраняли те же гены плюрипотентности. На Фигуре 17C показан тот же анализ, но с B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg iPSC (клетки HIP). Эти клетки сохраняли одинаковые гены плюрипотентности. Кроме того, гистологические изображения тератом, которые развились после трансплантации клеток HIP мышам SCID beige, показывают, что были идентифицированы типы клеток, связанные с эктодермой, мезодермой и энтодермой. Были обнаружены маркеры иммунофлуоресценции для всех трех зародышевых слоев (данные не показаны). Морфология клеток была правильной для нейроэктодермы, мезодермы и энтодермы. Иммунофлуоресцентное окрашивание на DAPI, GFAP, цитокератин 8 и брахиурию подтвердило плюрипотентность клеток HIP.

На фигурах 18A, 18B и 18C показаны клетки HIP, дифференцированные в клетки мезодермальной линии и потерявшие маркеры плюрипотентности. На Фигуре 18A показаны плюрипотентные маркеры в клетках HIP (помеченные «mHIP»), которые были потеряны в дифференцированных мышинных эндотелиальных клетках (помеченных «miEC»). На Фигуре 18B показано, что плюрипотентные маркеры сохранялись в клетках HIP, но не в дифференцированных мышинных

гладкомышечных клетках (помеченных «miSMC»). На Фигуре 18С показано, что плюрипотентные маркеры сохранялись в клетках НІР, но не в дифференцированных клетках мышинных кардиомиоцитов (помеченных «miCM»). Эти результаты были подтверждены иммуногистохимией (данные не показаны). Эндотелиальные клетки определяли с использованием антитела против CD31 и антитела против VE-кадгерина, гладкомышечные клетки определяли с использованием антител против SMA и против SM22, а кардиомиоциты определяли с использованием антител против тропонина I и антител против саркомера альфа-актина.

На Фигурах 19А и 19В показано, что клетки НІР дифференцировались в островковые клетки (IIC) линии эндодермы, которые продуцировали С-пептид и инсулин. Фигура 19А, маркеры дифференцировки не были обнаружены в клетках НІР, но присутствовали в индуцированных островковых клетках. Фигура 19В, индуцированные островковые клетки продуцировали инсулин. Иммуногистохимическое окрашивание на С-пептид подтвердило эти результаты (данные не показаны).

На Фигурах 20А и 20В показаны клетки НІР, дифференцированные в линию эктодермы. На Фигуре 20А показаны клетки НІР *in vitro*, а на Фигуре 20В показаны дифференцированные нейронные клетки. Иммуногистохимическое окрашивание маркером нейроэктодермальных стволовых клеток Nestin и Tuj-1 подтвердило эти результаты (данные не показаны).

На Фигурах 21А, 21В и 21С показано, что клетки, дифференцированные из клеток НІР, сохраняли фенотип, истощенный по МНС I и II, и сверхэкспрессию Cd47. На Фигуре 21А сравнивается экспрессия МНС-I, МНС-II и Cd47 между индуцированными мышинными эндотелиальными клетками («miEC») и клетками B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg miEC. На Фигуре 21В сравнивается экспрессия МНС-I, МНС-II и Cd47 между индуцированными мышинными гладкомышечными клетками («miSMC») и клетками B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg miSMC. На Фигуре 21С сравнивается экспрессия МНС-I, МНС-II и Cd47 между индуцированными мышинными кардиомиоцитами («miCM») и клетками B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg miCM.

На Фигурах 22А, 22В и 22С показано, что эндотелиальные клетки, дифференцированные из клеток НІР, не являются иммуногенными. Фигура 22А, трансплантация сингенных и аллогенных мышей С56ВL/6 mіЕСs. mіЕС у аллогенных мышей-реципиентов ВАLВ/с вызывали выраженный иммунный ответ, но не у сингенных мышей. Об этом свидетельствуют сильные ответы ІFN-γ Elіspot и иммуноглобулина (анализ FACS) у реципиентов ВАLВ/с (Фигура 22В). Фигура 22С, ни НІР, ни клетки mіЕС не генерировали иммунный ответ у сингенных или аллогенных реципиентов.

На фигурах 23А, 23В и 23С показано, что индуцированные мышечные гладкомышечные клетки, дифференцированные из клеток НІР, не являются иммуногенными. На Фигуре 23А показана трансплантация сингенных и аллогенных мышей С56ВL/6 mіSMC. mіSMC у аллогенных мышей-реципиентов ВАLВ/с вызывали выраженный иммунный ответ, но не у сингенных мышей. Об этом свидетельствуют сильные ответы ІFN-γ Elіspot и иммуноглобулина (анализ FACS) у реципиентов ВАLВ/с. Фигура 23С, ни НІР, ни клетки mіSMC не генерировали иммунный ответ у сингенных или аллогенных реципиентов.

На Фигурах 24А, В и С показано, что индуцированные мышечные клетки кардиомиоцитов, дифференцированные из клеток НІР, не являются иммуногенными. Фигура 25А, трансплантация сингенных и аллогенных мышей С56ВL/6 mіCMC. mіCMC у аллогенных мышей-реципиентов ВАLВ/с вызывали выраженный иммунный ответ, но не у сингенных мышей. Об этом свидетельствуют сильные ответы ІFN-γ Elіspot и иммуноглобулина (анализ FACS) у реципиентов ВАLВ/с (Фигура 24В). Фигура 24С, ни НІР, ни клетки mіCMC не генерировали иммунный ответ у сингенных или аллогенных реципиентов.

На Фигуре 25 показано, что дифференцированные клетки (mіЕСs, mіSMC, mіCM), полученные из клеток НІР, избегали отторжения через врожденную иммунную систему. Анализ слитого белка NK показал, что ни один из трех типов дифференцированных клеток не имел повышенной экспрессии стимулирующих лигандов NK-клеток по сравнению с дифференцированными клетками, полученными из mіPSC.

На Фигурах 26А и 26В показано, что *miEC*, полученные из *hiP*-клеток по изобретению, избегали иммунной реакции и достигали долгосрочной выживаемости у аллогенного хозяина. На Фигуре 26А трансплантаты *miEC*, полученные из *hiPSC*, показали долгосрочную выживаемость у сингенных реципиентов (C57BL/6), но отторгались у аллогенных реципиентов (BALB/c). Фигура 26В, *miEC*, полученные из *hiP*, достигали долгосрочной выживаемости после трансплантации как у сингенных, так и у аллогенных реципиентов.

Фигура 27, *miECS*, происходящие из клеток *hiP*, организовывались с образованием сосудистых структур у аллогенных хозяев. После трансплантации в матрице Matrigel, в течение шести недель, *miEC* организуются трехмерным образом с образованием сосудистых структур. Эти результаты были подтверждены иммунофлуоресцентным окрашиванием на люциферазу и VE-кадгерин; *miEC* были трансдуцированы для экспрессии люциферазы перед трансплантацией. Выживание контролировали с помощью биолюминесцентной визуализации, и трансплантированные клетки идентифицировали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания против люциферазы (данные не показаны).

На Фигуре 28 показано, что человеческие клетки *hiP* демонстрировали нормальный человеческий кариотип.

На Фигуре 29 показано, что человеческие клетки *hiP* сохраняли плюрипотентность во время процесса конструирования. *hiPSC* (например, исходные клетки, до изменений по изобретению) и клетки *hiP* по изобретению имеют экспрессию генов плюрипотентности (NANOG, OCT4, SOX2, DPPA4, hTERT, ZFP42 и DDMT3B; G3PDH служил в качестве контроля загрузки), что показано с использованием анализов ПЦР. Иммунофлуоресцентное окрашивание подтвердило эти данные, поскольку клетки экспрессируют маркеры TRA-1-60, TRA-1-81, Sox2, Oct4, SSEA-4 и щелочную фосфатазу (данные не показаны).

На Фигурах 30А и 30В показано, что трансплантированные человеческие клетки *hiP* у гуманизированных аллогенных мышей не вызывали иммунного ответа. На Фигуре 30А показано, что Т-клетки не отвечают на трансплантированные клетки *hiP*, как измерено с

помощью продуцирования IFN- γ или IL-5 в анализах Elispot. Напротив, трансплантированные iPSC отвечали. На Фигуре 30B показано, что только iPSC вызывали сильный ответ антител согласно проточной цитометрии. Клетки H1P не вызывали.

На Фигурах 31A, 31B, 31C и 31D показано, что человеческие клетки H1P дифференцировались в мезодермальную линию. На Фигуре 31A показана морфология человеческой клетки H1P. На Фигуре 31B показаны эндотелиальные клетки, полученные из H1P, окрашенные CD31, VE-кадгерином и DAPI в качестве контроля. На Фигуре 31C показаны полученные из H1P кардиомиоциты, окрашенные антителами против сакромера α -актинина, тропонина I и DAPI в качестве контроля. На Фигуре 31D показано образование незрелых сосудов из эндотелиальных клеток, происходящих из H1P. В H1P-производных кардиомиоцитах наблюдалась пульсация (данные не показаны).

На Фигурах 32A и 32B показано, что трансплантированные человеческие эндотелиальные клетки, полученные из человеческих клеток H1P, не вызывали иммунного ответа у аллогенных гуманизированных мышей. Фигура 32A, hiEC продемонстрировали значительный Т-клеточный ответ в анализах Elispot IFN- γ и IL-5, тогда как hiEC, полученные из человеческих клеток H1P, нет. На Фигуре 32B показан ответ В-клеток с помощью проточной цитометрии. Только hiEC генерировали значительное связывание иммуноглобулина, измеренное по средней интенсивности флуоресценции (MFI).

На Фигурах 33A и 33B показано, что трансплантация кардиомиоцитов человека, полученных из человеческих клеток H1P, не вызывала иммунного ответа у аллогенных гуманизированных мышей. На Фигуре 33A показаны различия в ответах Т-клеток для hiCM «дикого типа» по сравнению с клетками B2M $-/-$ CIITA $-/-$ CD47tg H1P в Elispot IFN- γ и IL-5. На Фигуре 33B показан ответ В-клеток с помощью проточной цитометрии. Только «hiCM дикого типа» генерировали значительную нагрузку иммуноглобулина hiEC, измеренную по средней интенсивности флуоресценции (MFI).

На Фигурах 34A, 34B, 34C и 34D показано, что человеческие клетки H1P по изобретению избегали отторжения врожденной

иммунной системой. NK-клетки выделяли из мышей BALB/c с использованием магнитно-активированной сортировки клеток (MACS). 5×10^6 клеток-стимуляторов (полученные из C57BL/6 iPSC, либо iEC, iSMC, либо iCM и либо B2M -/- CIITA -/- либо B2M -/- CIITA -/- CD47 tg) инкубировали с 5×10^6 MACS-отсортированными NK-клетками в планшете IFN- γ Elispot. Через 24 часа частоту пятен определяли с помощью ридера Elispot. Все три B2M -/- CIITA -/- производных вызывали сильный ответ NK. Однако все три производных B2M -/- CIITA -/- CD47 tg не вызывали какого-либо ответа NK-клеток, и их частота пятен статистически не отличалась от отрицательного контроля (выделенные NK-клетки, не инкубированные со стимулирующей клеткой). На Фигуре 34А показаны эндотелиальные клетки. На Фигуре 34В показаны гладкомышечные клетки. На Фигуре 34С показаны кардиомиоциты. На Фигуре 34D показан положительный контроль мышинной лимфомы YAC-1.

На Фигуре 35 А, 35В и 35С показан врожденный иммунный ответ (или его отсутствие). Готовили смесь 50% производных дикого типа (5×10^6 клеток) и 50% производных либо C57BL/6 B2m -/- Ciita -/- либо B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg (5×10^6 клеток). Клетки окрашивали 10 мкМ CFSE в течение 10 минут и ресуспендировали в 500 мкл физиологического раствора. Затем смесь клеток инъецировали в богатую NK-клетками брюшину мышей C57BL/6 (сингенных). В этой сингенной модели вся цитотоксичность вызвана NK-клетками. Через 48 часов перитонеальные клетки полости извлекают и сортируют и рассчитывают их соотношение. Клетки дикого типа и сконструированные клетки идентифицировали окрашиванием MNCI в FACS. На Фигуре 35А показаны эндотелиальные клетки. На Фигуре 35В показаны гладкомышечные клетки. На Фигуре 35С показаны кардиомиоциты.

На Фигуре 36А, 36В и 36С показано генетическое конструирование человеческих iPSC, подтвержденных FACS. Отсутствие HLA I и HLA II было подтверждено в B2M -/- CIITA -/- hiPSC. Кроме того, B2M -/- CIITA -/- CD47 tg показал высокую экспрессию CD47. На Фигуре 36А показаны результаты HLA I. На Фигуре 36В показаны результаты HLA II. На Фигуре 36С показаны

результаты CD47.

На Фигурах 37 А и В показано, что иммунный фенотип сохранялся после дифференцировки iPSC B2M -/- CIITA -/- CD47 tg. По сравнению с немодифицированными производными wt анализ FACS показал, что производные B2M -/- CIITA -/- CD47 tg лишены HLA I и HLA II и сверхэкспрессируют CD47. На Фигуре 37А показаны эндотелиальные клетки, а на Фигуре 37В показаны кардиомиоциты.

VI. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

А. Введение

Изобретение относится к гипоиммуногенным плюрипотентным («НІР») клеткам, которые избегают иммунных ответов хозяина вследствие нескольких генетических манипуляций, описанных в настоящем изобретении. В клетках отсутствуют основные иммунные антигены, которые запускают иммунные ответы, и они сконструированы для предотвращения фагоцитоза. Это позволяет получить «готовые» клеточные продукты для генерации определенных тканей и органов. Преимущество возможности использования производных человеческих аллогенных клеток НІР у пациентов-людей приводит к значительным преимуществам, включая возможность избежать продолжительной дополнительной иммуносупрессивной терапии и использования лекарственных средств, обычно применяемых при аллогенных трансплантациях. Это также обеспечивает значительную экономию средств, поскольку можно использовать клеточную терапию, не требующую индивидуального лечения для каждого пациента. Недавно было показано, что клеточные продукты, полученные из аутологичных клеточных источников, могут стать объектом иммунного отторжения с несколькими или даже с одной единственной антигенной мутацией. Таким образом, продукты аутологичных клеток по своей природе не являются неиммуногенными. Кроме того, клеточная инженерия и контроль качества являются очень трудоемкими и дорогостоящими, а аутологичные клетки недоступны для неотложных вариантов лечения. Только продукты аллогенных клеток могут быть использованы для большей популяции пациентов, если можно будет преодолеть иммунный барьер. Клетки НІР будут служить универсальным источником клеток для генерации универсально приемлемых

производных.

Настоящее изобретение направлено на эксплуатацию толерантности мать-плод, которая существует у беременных женщин. Хотя половина человеческих лейкоцитарных антигенов плода (HLA) наследуется по отцовской линии, и плод экспрессирует основные несовпадающие антигены HLA, материнская иммунная система не распознает плод как аллогенную сущность и не инициирует иммунный ответ, например, как видно в иммунной реакции типа «хозяин против трансплантата». Толерантность мать-плод в основном опосредуется синцитиотрофобластными клетками в области контакта плода и матери. Как показано на Фигуре 7, в клетках синцитиотрофобластов мало или нет белков главного комплекса гистосовместимости I и II (MHC-I и MHC-II), а также повышенная экспрессия CD47, известного как белок «не ешь меня», который подавляет врожденный фагоцитарный иммунный надзор и устранение HLA-лишенных клеток. Удивительно, но те же толерогенные механизмы, которые предотвращают отторжение плода во время беременности, также позволяют клеткам HIR по изобретению избегать отторжения и способствуют долгосрочному выживанию и приживлению этих клеток после аллогенной трансплантации.

Эти результаты также удивительны тем, что эта толерантность мать-плод может быть введена с помощью всего лишь трех генетических модификаций (по сравнению с исходными iPSC, например, HiPSC), двух снижений активности («нокауты», как описано далее в настоящем изобретении) и одного увеличения активности («нокина», как описано в настоящем изобретении). Как правило, другие специалисты в данной области пытались подавить иммуногенность iPSC, но добились лишь частичного успеха; см. Rong et al., *Cell Stem Cell* 14: 121-130 (2014) и Gornalusse et al., *Nature Biotech* doi: 10.1038/nbt.3860).

Таким образом, изобретение относится к получению клеток HIR из плюрипотентных стволовых клеток, а затем к их поддержанию, дифференцировке и, в конечном итоге, к трансплантации их производных пациентам, нуждающимся в этом.

В. Определения

Термин «плюрипотентные клетки» относится к клеткам, которые

могут самообновляться и пролиферировать, оставаясь в недифференцированном состоянии, и которые при надлежащих условиях могут индуцироваться для дифференцировки в специализированные типы клеток. Используемый в настоящем описании термин «плюрипотентные клетки» охватывает эмбриональные стволовые клетки и другие типы стволовых клеток, включая эмбриональные, амниональные или соматические стволовые клетки. Типичные линии стволовых клеток человека включают линию эмбриональных стволовых клеток человека H9. Дополнительные иллюстративные линии стволовых клеток включают те, которые доступны через Реестр человеческих эмбриональных стволовых клеток Национального института здравоохранения и коллекцию HUES Медицинского института Говарда Хьюза (как описано в Cowan, CA *et al.*, *New England J. Med.* 350: 13. (2004), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.)

Используемые в настоящем описании «плюрипотентные стволовые клетки» могут дифференцироваться в любой из трех зародышевых слоев: энтодерму (например, желудочно-кишечный тракт, легкие и т. д.), мезодерму (например, мышцы, кости, кровь, урогенитальная ткань и т. д.) или эктодерму (например, эпидермальные ткани и ткани нервной системы). Используемый в настоящем описании термин «плюрипотентные стволовые клетки» также охватывает «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» или «iPSC», тип плюрипотентных стволовых клеток, полученных из не плюрипотентных клеток. Примеры родительских клеток включают соматические клетки, которые были перепрограммированы для индукции плюрипотентного, недифференцированного фенотипа различными способами. Такие клетки «iPS» или «iPSC» могут быть созданы путем индукции экспрессии определенных регуляторных генов или путем экзогенного применения определенных белков. Способы индукции клеток iPS известны в данной области и дополнительно описаны ниже. (См., например, Zhou *et al.*, *Stem Cells* 27 (11): 2667-74 (2009); Huangfu *et al.*, *Nature Biotechnol.* 26 (7): 795 (2008); Woltjen *et al.*, *Nature* 458 (7239): 766-770 (2009); и Zhou *et al.*, *Cell Stem Cell* 8: 381-384 (2009); каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном

объеме.) Генерация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) описана ниже. Используемые в настоящем описании «hiPSC» представляют собой человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, а «miPSC» представляют собой мышинные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

«Характеристики плюрипотентных стволовых клеток» относятся к характеристикам клетки, которые отличают плюрипотентные стволовые клетки от других клеток. Способность давать потомство, которое может подвергаться дифференцировке в соответствующих условиях в типы клеток, которые в совокупности демонстрируют характеристики, связанные с клеточными линиями из всех трех зародышевых слоев (энтодермы, мезодермы и эктодермы), является характеристикой плюрипотентных стволовых клеток. Экспрессия или неэкспрессия определенных комбинаций молекулярных маркеров также являются характеристиками плюрипотентных стволовых клеток. например, человеческие плюрипотентные стволовые клетки экспрессируют по меньшей мере несколько, а в некоторых вариантах осуществления все маркеры из следующего неограничивающего списка: SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, TRA -2-49/6E, ALP, Sox2, E-кадгерин, UTF-1, Oct4, Rex1 и Nanog. Морфология клеток, связанная с плюрипотентными стволовыми клетками, также является характеристикой плюрипотентных стволовых клеток. Как описано в настоящем изобретении, клетки не должны проходить через плюрипотентность, чтобы перепрограммироваться в энтодермальные клетки-предшественники и/или гепатоциты.

Используемый в настоящем описании термин «мультипотентная» или «мультипотентная клетка» относится к типу клетки, которая может привести к ограниченному числу других конкретных типов клеток. например, индуцированные мультипотентные клетки способны к образованию энтодермальных клеток. Кроме того, мультипотентные стволовые клетки крови могут дифференцироваться в несколько типов клеток крови, включая лимфоциты, моноциты, нейтрофилы и т. д.

Используемый в настоящем описании термин «олигопотентная» относится к способности взрослой стволовой клетки дифференцироваться только в несколько различных типов клеток.

например, лимфоидные или миелоидные стволовые клетки способны образовывать либо лимфоидные, либо миелоидные линии, соответственно.

Используемый в настоящем описании термин «унипотентный» означает способность клетки образовывать единственный тип клеток. например, сперматогониальные стволовые клетки способны образовывать только сперматозоиды.

Используемый в настоящем описании термин «тотипотентная» означает способность клетки образовывать цельный организм. например, у млекопитающих только зигота и бластомеры первой стадии расщепления являются тотипотентными.

Используемый в настоящем описании термин «не плюрипотентные клетки» относится к клеткам млекопитающих, которые не являются плюрипотентными клетками. Примеры таких клеток включают дифференцированные клетки, а также клетки-предшественники. Примеры дифференцированных клеток включают, но не ограничиваются ими, клетки ткани, выбранной из костного мозга, кожи, скелетных мышц, жировой ткани и периферической крови. Типичные типы клеток включают, но не ограничиваются ими, фибробласты, гепатоциты, миоциты, нейроны, остеобласты, остеокласты и Т-клетки. Исходные клетки, используемые для генерации индуцированных мультипотентных клеток, эндодермальных клеток-предшественников и гепатоцитов, могут быть не плюрипотентными клетками.

Дифференцированные клетки включают, но не ограничиваются ими, мультипотентные клетки, олигопотентные клетки, унипотентные клетки, клетки-предшественники и терминально дифференцированные клетки. В конкретных вариантах осуществления клетка, обладающая меньшей потентностью, считается «дифференцированной» по отношению к клетке, обладающей большей потентностью.

«Соматическая клетка» представляет собой клетку, образующую тело организма. Соматические клетки включают клетки, составляющие органы, кожу, кровь, кости и соединительную ткань в организме, но не половые клетки.

Клетки могут иметь, например, человеческое происхождение или могут быть из млекопитающих, не являющихся человеком. Типичные млекопитающие, не являющиеся человеком, включают, но не

ограничиваются ими, мышей, крыс, кошек, собак, кроликов, морских свинок, хомяков, овец, свиней, лошадей, крупный рогатый скот и приматов, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления клетка имеет происхождение из взрослого человека или млекопитающего, не являющегося человеком. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка имеет происхождение из новорожденного человека, взрослого человека или млекопитающего, не являющегося человеком.

Используемый в настоящем описании термин «субъект» или «пациент» относится к любому животному, такому как домашнее животное, животное в зоопарке или человек. «Субъект» или «пациент» может быть млекопитающим, таким как собака, кошка, птица, домашний скот или человек. Конкретные примеры «субъектов» и «пациентов» включают, но не ограничиваются ими, индивидуумов (особенно людей) с заболеванием или расстройством, связанными с печенью, сердцем, легкими, почками, поджелудочной железой, мозгом, нервной тканью, кровью, костью, костным мозгом и тому подобное.

Клетки млекопитающих могут иметь человеческое происхождение или из млекопитающих, не являющихся человеком. Типичные млекопитающие, не являющиеся человеком, включают, но не ограничиваются ими, мышей, крыс, кошек, собак, кроликов, морских свинок, хомяков, овец, свиней, лошадей, крупный рогатый скот и приматов, не являющихся человеком (например, шимпанзе, макаки и обезьяны).

Под «гипоиммуногенной плюрипотентной клеткой» или «клеткой НІР» в настоящем описании подразумевается плюрипотентная клетка, которая сохраняет свои плюрипотентные характеристики и, тем не менее, вызывает ответ в виде пониженного иммунного отторжения при переносе аллогенному хозяину. В предпочтительных вариантах осуществления клетки НІР не вызывают иммунный ответ. Таким образом, «гипоиммуногенный» относится к значительно пониженному или устраненному иммунному ответу по сравнению с иммунным ответом родительской (то есть «дикого типа») клетки до иммуноконструирования, как описано в настоящем изобретении. Во многих случаях клетки НІР являются иммунологически молчащими и

все же сохраняют плюрипотентные способности. Анализы для характеристик НІР описаны ниже.

Под «HLA» или «человеческим лейкоцитарным антигеном» понимают комплекс генов, кодирующих белки главного комплекса гистосовместимости (МНС) у людей. Эти белки клеточной поверхности, которые составляют комплекс HLA, отвечают за регуляцию иммунного ответа на антигены. У людей есть два МНС, класса I и класса II, «HLA-I» и «HLA-II». HLA-I включает три белка, HLA-A, HLA-B и HLA-C, которые презентируют пептиды внутри клетки, и антигены, презентированные комплексом HLA-I, привлекают Т-клетки-киллеры (также известные как CD8+ Т-клетки или цитотоксические Т-клетки). Белки HLA-I связаны с β -2-микроглобулином (B2M). HLA-II включает пять белков, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR, которые презентируют антигены снаружи клетки Т-лимфоцитам. Это стимулирует CD4+ клетки (также известные как Т-хелперные клетки). Следует понимать, что использование «МНС» или «HLA» не должно быть ограничивающим, поскольку оно зависит от того, являются ли гены человеческими (HLA) или мышиными (МНС). Таким образом, поскольку это относится к клеткам млекопитающих, эти термины могут использоваться здесь взаимозаменяемо.

Под «нокаутированием гена» в настоящем описании подразумевается процесс, который делает конкретный ген неактивным в клетке-хозяине, в которой он находится, что приводит к тому, что интересующий белок либо не продуцируется, либо присутствует неактивной форме. Как будет понятно специалистам в данной области и дополнительно описано ниже, это может быть выполнено рядом различных способов, включая удаление последовательностей нуклеиновых кислот из гена или прерывание последовательности другими последовательностями, изменение рамки считывания или изменение регуляторных компонентов нуклеиновой кислоты. Например, вся или часть кодирующей области интересующего гена может быть удалена или заменена «не смысловыми» последовательностями, вся или часть регуляторной последовательности, такой как промотор, может быть удалена или

заменена, последовательности инициации трансляции могут быть удалены или заменены и т. д.

В настоящем изобретении под термином «нокин гена» подразумевается процесс, который добавляет генетическую функцию клетке-хозяину. Это вызывает повышение уровня кодируемого белка. Как будет понятно специалистам в данной области, это может быть выполнено несколькими способами, включая добавление одной или более дополнительных копий гена в клетку-хозяин или изменение регуляторного компонента эндогенного гена, что повышает экспрессию белка. Это может быть достигнуто путем модификации промотора, добавления другого промотора, добавления энхансера или модификации других последовательностей экспрессии генов.

«β-2-микроглобулин» или «β2М» или «B2M» белок относится к человеческому β2М-белку, который имеет последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот, представленные ниже; ген человека имеет номер доступа NC_000015.10: 44711487-44718159.

Белок «CD47 белок» относится к человеческому белку CD47, который имеет последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот, представленные ниже; ген человека имеет номер доступа NC_000016.10: 10866208-10941562.

Белок «СІІТа белок» относится к человеческому белку СІІТа, который имеет последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот, представленные ниже; ген человека имеет номер доступа NC_000003.12: 108043094-108094200.

Под «диким типом» в контексте клетки понимается клетка, встречающаяся в природе. Однако в контексте используемой в настоящем описании плюрипотентной стволовой клетки это также означает iPSC, которая может содержать изменения нуклеиновой кислоты, приводящие к плюрипотентности, но не подвергаться процедурам редактирования генов по изобретению для достижения гипоиммуногенности.

Термин «сингенный» в настоящем описании относится к генетическому сходству или идентичности организма-хозяина и клеточного трансплантата, где имеется иммунологическая совместимость; например, иммунный ответ не генерируется.

Термин «аллогенный» в настоящем описании относится к генетическому различию организма-хозяина и клеточного трансплантата, где генерируется иммунный ответ.

«B2M -/-» в настоящем описании означает, что диплоидная клетка имеет инактивированный ген B2M в обеих хромосомах. Как описано в настоящем изобретении, это может быть сделано различными способами.

Термин «CIITA -/-» в настоящем описании означает, что диплоидная клетка имеет инактивированный ген CIITA в обеих хромосомах. Как описано в настоящем изобретении, это может быть сделано различными способами.

Термин «CD47 tg» (расшифровывается как «трансген») или «CD47+» в настоящем описании означает, что клетка-хозяин экспрессирует CD47, в некоторых случаях, имея по меньшей мере одну дополнительную копию гена CD47.

«Полипептид Oct» относится к любому из встречающихся в природе членов семейства транскрипционных факторов Octamer или их вариантов, которые поддерживают активность фактора транскрипции, сходную (в пределах активности по меньшей мере 50%, 80% или 90%) по сравнению с ближайшим родственным встречающимся в природе членом семейства, или полипептиды, содержащие по меньшей мере ДНК-связывающий домен встречающегося в природе члена семейства, и могут дополнительно содержать домен активации транскрипции. Типичные полипептиды Oct включают в себя Oct-1, Oct-2, Oct-3/4, Oct-6, Oct-7, Oct-8, Oct-9 и Oct-11. Oct3/4 (обозначенный в настоящем описании как «Oct4») содержит домен POU, последовательность из 150 аминокислот, консервативную среди Pit-1, Oct-1, Oct-2 и uric-86. (См. Ryan, AK & Rosenfeld, MG, Genes Dev. 11: 1207-1225 (1997), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления варианты имеют по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичности аминокислотной последовательности по всей их последовательности по сравнению с встречающимся в природе членом семейства полипептидов Oct, такими как приведенные выше или такие, которые приведены в Genbank с номерами доступа NP-002692.2 (Oct4 человека) или NP-038661.1

(Ost4 мыши). Полипептиды Ost (например, Ost3/4 или Ost 4) могут иметь человеческое происхождение, мышинное, крысиное, из крупного рогатого скота, свиньи или из других животных. Как правило, один и тот же вид белка будет использоваться с видами клеток, с которыми проводились манипуляции. Полипептид(ы) Ost может быть фактором плюрипотентности, который может помогать индуцировать мультипотентность в не плюрипотентных клетках.

«Полипептид Klf» относится к любому из встречающихся в природе членов семейства Krüppel-подобных факторов (Klfs), белков цинкового пальца, которые содержат аминокислотные последовательности, сходные с последовательностями регулятора Krüppel эмбрионального паттерна *Drosophila*, или к вариантам встречающихся в природе членов, которые поддерживают активность фактора транскрипции, сходную (в пределах активности по меньшей мере 50%, 80% или 90%) по сравнению с наиболее близкородственным встречающимся в природе членом семейства, или к полипептидам, содержащим по меньшей мере ДНК-связывающий домен встречающегося в природе члена семейства, и может дополнительно содержать домен активации транскрипции. (См. Dang, DT, Pevsner, J. & Yang, VW, Cell Biol. 32: 1103-1121 (2000), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Типичные члены семейства Klf включают Klf1, Klf2, Klf3, Klf-4, Klf5, Klf6, Klf7, Klf8, Klf9, Klf10, Klf11, Klf12, Klf13, Klf14, Klf15, Klf16 и Klf17. Было обнаружено, что Klf2 и Klf-4 являются факторами, способными генерировать iPS-клетки у мышей, и родственные гены Klf1 и Klf5 действовали также, хотя и со сниженной эффективностью. (См. Nakagawa et al., Nature Biotechnology 26: 101-106 (2007), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления варианты имеют по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичности аминокислотной последовательности по всей их последовательности по сравнению с встречающимся в природе членом семейства полипептидов Klf, таким как перечисленные выше или такие, которые приведены в Genbank с номером доступа CAH16088 (мышинный Klf4) или CAH14962 (человеческий Klf4). Полипептиды Klf (например, Klf1, Klf4 и Klf5) могут быть

человеческими, мышинными, крысиными, крупного рогатого скота, свиньи или из других животных. Как правило, один и тот же вид белка будет использоваться с видами клеток, с которыми проводились манипуляции. Полипептид(ы) Klf может быть фактором плюрипотентности. Экспрессия гена или полипептида Klf4 может помогать индуцировать мультипотентность в исходной клетке или в популяции исходных клеток.

«Полипептид Мус» относится к любому из встречающихся в природе членов семейства Мус. (См., например, Adhikary, S. & Eilers, M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 635-645 (2005), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.) Он также включает варианты, которые поддерживают сходную активность транскрипционного фактора по сравнению с ближайшим родственным встречающимся в природе членом семейства (т.е. в пределах активности по меньшей мере 50%, 80% или 90%). Он дополнительно включает полипептиды, содержащие по меньшей мере ДНК-связывающий домен встречающегося в природе члена семейства, и может дополнительно содержать домен активации транскрипции. Типичные полипептиды Мус включают, например, с-Мус, N-Мус и L-Мус. В некоторых вариантах осуществления варианты имеют по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичности аминокислотной последовательности по всей их последовательности по сравнению с встречающимся в природе членом семейства полипептидов Мус, таким как приведенные выше или такими, которые приведены в Genbank с номером доступа CAA25015 (человеческий Мус). Полипептиды Мус (например, с-Мус) могут быть человеческими, мышинными, крысиными, крупного рогатого скота, свиньи или из других животных. Как правило, один и тот же вид белка будет использоваться с видами клеток, с которыми проводились манипуляции. Полипептид(ы) Мус может быть фактором плюрипотентности.

«Полипептид Sox» относится к любому из встречающихся в природе членов факторов транскрипции HMG-box (Sox), связанных с SRY, характеризующихся наличием домена группы высокой подвижности (HMG), или к его вариантам, которые поддерживают сходную активность транскрипционных факторов по сравнению с

ближайшим родственным, встречающимся в природе (т. е. в пределах активности по меньшей мере 50%, 80% или 90%). Он также включает полипептиды, содержащие по меньшей мере ДНК-связывающий домен встречающегося в природе члена семейства, и может дополнительно содержать домен активации транскрипции. (См., например, Dang, DT et al., *Int. J. Biochem.Cell Biol.* 32:1103-1121 (2000), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.) Типичные полипептиды Sox включают, например, Sox1, Sox2, Sox3, Sox4, Sox5, Sox6, Sox7, Sox8, Sox9, Sox10, Sox11, Sox12, Sox13, Sox14, Sox15, Sox17, Sox18, Sox-21 и Sox30. Было показано, что Sox1 способствует получению клеток iPS с такой же эффективностью, что и Sox2, а также показано, что гены Sox3, Sox15 и Sox18 генерируют клетки iPS, хотя и с несколько меньшей эффективностью, чем Sox2. (См. Nakagawa et al., *Nature Biotechnology* 26: 101-106 (2007), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления варианты имеют по меньшей мере 85%, 90% или 95% идентичности аминокислотной последовательности по всей их последовательности по сравнению с встречающимся в природе членом семейства полипептидов Sox, таким как приведенные выше или такие, которые приведены в Genbank с номером доступа CAA83435 (человеческий Sox2). Полипептиды Sox (например, Sox1, Sox2, Sox3, Sox15, или Sox18) могут быть человеческими, мышинными, крысиными, крупного рогатого скота, свиньи или из других животных. Как правило, один и тот же вид белка будет использоваться с видами клеток, с которыми проводились манипуляции. Полипептид(ы) Sox может быть фактором плюрипотентности. Как обсуждалось в настоящем описании, белки SOX2 находят конкретное применение в генерации iPSC.

Под «дифференцированными гипоиммуногенными плюрипотентными клетками» или «дифференцированными клетками HiP» или «клетками dHiP» в настоящем описании подразумеваются клетки iPS, которые были сконструированы таким образом, чтобы обладать гипоиммуногенностью (например, посредством нокаута B2M и CIITA и нокина CD47) и затем дифференцируются в тип клеток для окончательной трансплантации пациентам. Так, например, клетки

НІР могут дифференцироваться в гепатоциты («гепатоциты dНІР»), в бета-подобные клетки поджелудочной железы или островковые органонды («бета-клетки dНІР»), в эндотелиальные клетки («эндотелиальные клетки dНІР») и т. д.

Термин процент «идентичность» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновой кислоты или полипептида относится к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, измеренный с использованием одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (например, BLASTP и BLASTN или других алгоритмов, доступных специалистам) или путем визуального контроля. В зависимости от применения процент «идентичности» может существовать в области сравниваемой последовательности, например, в функциональном домене, или, альтернативно, может существовать во всей длине двух сравниваемых последовательностей. Для сравнения последовательностей обычно одна последовательность действует как референсная последовательность, с которой сравниваются тестовые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестовые и референсные последовательности вводятся в компьютер, при необходимости обозначаются координаты субпоследовательности и программные параметры алгоритма последовательности. Затем алгоритм сравнения последовательностей вычисляет процент идентичности последовательности для тестовой последовательности (последовательностей) относительно референсной последовательности на основе назначенных программных параметров.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания гомологии Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), путем поиска по методу подобия Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP,

BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) Или путем визуального контроля (см. в целом Ausubel et al., ниже).

Одним из примеров алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательности и сходства последовательности, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

«Ингибиторы», «активаторы» и «модуляторы» влияют на функцию или экспрессию биологически релевантной молекулы. Термин «модулятор» включает как ингибиторы, так и активаторы. Их можно идентифицировать с использованием анализов *in vitro* и *in vivo* на предмет экспрессии или активности молекулы-мишени.

«Ингибиторы» представляют собой агенты, которые, например, ингибируют экспрессию или связываются с молекулами-мишенями или белками. Они могут частично или полностью блокировать стимулирование или обладают активностью ингибитора протеазы. Они могут уменьшать, снижать, предотвращать или задерживать активацию, включая инактивацию, десенсибилизацию или подавление активности описанного целевого белка. Модуляторы могут быть антагонистами молекулы-мишени или белка.

«Активаторы» представляют собой агенты, которые, например, индуцируют или активируют функцию или экспрессию целевой молекулы или белка. Они могут связываться, стимулировать, увеличивать, открывать, активировать или облегчать активность молекулы-мишени. Активаторы могут быть агонистами молекулы-мишени или белка.

«Гомологи» представляют собой биоактивные молекулы, которые аналогичны эталонной молекуле по нуклеотидной последовательности, пептидной последовательности, на функциональном или структурном уровне. Гомологи могут включать производные последовательности, которые имеют определенный процент идентичности с эталонной последовательностью. Таким образом, в одном варианте осуществления гомологичные или

производные последовательности имеют, по меньшей мере, 70 процентов идентичности последовательности. В конкретном варианте осуществления гомологичные или производные последовательности имеют идентичность последовательности по меньшей мере 80 или 85 процентов. В конкретном варианте осуществления гомологичные или производные последовательности имеют, по меньшей мере, 90 процентов идентичности последовательности. В конкретном варианте осуществления гомологичные или производные последовательности имеют, по меньшей мере, 95 процентов идентичности последовательности. В более конкретном варианте осуществления гомологичные или производные последовательности имеют по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 процентов идентичности последовательности. Гомологичные или производные последовательности нуклеиновой кислоты также могут быть определены по их способности оставаться связанным с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты в условиях гибридизации высокой жесткости. Гомологи, имеющие структурное или функциональное сходство с эталонной молекулой, могут быть химическими производными эталонной молекулы. Способы детектирования, генерирования и скрининга структурных и функциональных гомологов, а также производных известны в данной области.

«Гибридизация», как правило, зависит от способности денатурированной ДНК к повторному отжигу, когда комплементарные цепи присутствуют в среде ниже их температуры плавления. Чем выше степень желаемой гомологии между зондом и гибридизуемой последовательностью, тем выше относительная температура, которую можно использовать. В результате из этого следует, что более высокие относительные температуры будут иметь тенденцию делать условия реакции более жесткими, в то время как более низкие температуры – менее жесткими. Дополнительные подробности и объяснение жесткости реакций гибридизации см. в Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers (1995), которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

«Жесткость» реакций гибридизации легко определяется специалистом в данной области, и, как правило, представляет собой эмпирический расчет, зависящий от длины зонда, температуры промывки и концентрации соли. Как правило, более длинные зонды требуют более высоких температур для надлежащего отжига, в то время как более короткие зонды требуют более низких температур.

«Жесткие условия» или «условия высокой жесткости», как определено в настоящем описании, могут быть идентифицированы как такие, при которых: (1) используют низкую ионную силу и высокую температуру для промывки, например, 0,015 М хлорид натрия/0,0015 М цитрат натрия/0,1% натрия додецилсульфат при 50 °С; (2) используют во время гибридизации денатурирующий агент, такой как формамид, например, 50% (об./об.) Формамида с 0,1% бычьего сывороточного альбумина/0,1% фиколла/0,1% поливинилпирролидона/50 Мм буфером фосфата натрия при pH 6,5 с 750 мМ Хлорида натрия, 75 Мм цитрата натрия при 42 °С; или (3) гибридизация в течение ночи в растворе, в котором используется 50% формамида, 5xSSC (0,75 М NaCl, 0,075 М цитрата натрия), 50 мМ фосфата натрия (pH 6,8), 0,1% пирогосфата натрия, 5храствора Денхардта, обработанного ультразвуком лосося ДНК спермы (50 мкл/мл), 0,1% SDS и 10% сульфата декстрана при 42 °С, с 10-минутной промывкой при 42 °С в 0,2xSSC (хлорид натрия/цитрат натрия) с последующей 10-минутной жесткой промывка, состоящей из 0,1xSSC, содержащего ЭДТА, при 55 °С.

Подразумевается, что каждое максимальное числовое ограничение, приведенное в настоящем описании, включает каждое более низкое числовое ограничение, как если бы такие более низкие числовые ограничения были прямо указаны в настоящем описании. Каждое минимальное числовое ограничение, приведенное в настоящем описании, будет включать каждое более высокое числовое ограничение, как если бы такие более высокие числовые ограничения были прямо указаны в настоящем описании. Каждый числовой диапазон, приведенный в настоящем описании, будет включать в себя каждый более узкий числовой диапазон, попадающий в такой более широкий числовой диапазон, как если бы такие более

узкие числовые диапазоны были все прямо указаны в настоящем описании.

Используемый в настоящем описании термин «модификация» относится к изменению, которое физически отличает модифицированную молекулу от исходной молекулы. В одном варианте осуществления аминокислотное изменение в вариантном полипептиде CD47, HSVtk, EC-CD или iCasp9, полученном в соответствии с описанными в настоящем изобретении способами, отличает его от соответствующего родителя, который не был модифицирован в соответствии с описанными в настоящем изобретении способами, такой как белок дикого типа, встречающийся в природе мутантный белок или другой сконструированный белок, который не включает модификации такого вариантного полипептида. В другом варианте осуществления вариантный полипептид включает одну или более модификаций, которые отличают функцию вариантного полипептида от немодифицированного полипептида. Например, изменение аминокислоты в вариантном полипептиде влияет на его профиль связывания с рецептором. В других вариантах осуществления вариантный полипептид включает модификации замены, делеции или вставки или их комбинации. В другом варианте осуществления вариантный полипептид включает одну или более модификаций, которые увеличивают его аффинность к рецептору по сравнению с аффинностью немодифицированного полипептида.

В одном варианте осуществления вариантный полипептид включает одну или более замен, вставок или делеций относительно соответствующей нативной или родительской последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариантный полипептид включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31-40, 41-50 или 51 или более модификаций.

Под «эписомным вектором» в настоящем описании подразумевается генетический вектор, который может существовать и автономно реплицироваться в цитоплазме клетки; например, он не интегрирован в геномную ДНК клетки-хозяина. Ряд эписомных векторов известен в данной области и описан ниже.

«Нокаут» в контексте гена означает, что клетка-хозяин,

несущая нокаут, не продуцирует функциональный белковый продукт гена. Как указано в настоящем описании, нокаут может привести к множеству путей развития, от удаления всей или части кодирующей последовательности, введения мутаций сдвига рамки, так что функциональный белок не продуцируется (укороченная или бессмысловая последовательность), удаления или изменения регуляторного компонента (например, промотора), так что ген не транскрибируется, предотвращая трансляцию посредством связывания с мРНК и т. д. Как правило, нокаут осуществляется на уровне геномной ДНК, так что потомство клеток также несет нокаут постоянно.

Под «нокин» в контексте гена подразумевается, что клетка-хозяин, несущая нокин, содержит более функциональный белок, активный в клетке. Как указано в настоящем описании, нокин может быть осуществлен различными способами, обычно путем введения по меньшей мере одной копии трансгена (tg), кодирующего белок, в клетку, хотя это также можно сделать путем замены регуляторных компонентов, например, путем добавления конститутивного промотора к эндогенному гену. Как правило, использование технологий нокин приводит к интеграции дополнительной копии трансгена в клетку-хозяин.

VII. Клетки по изобретению

Изобретение относится к композициям и методологиям для генерирования клеток НІР, начиная с клеток дикого типа, делая их плюрипотентными (например, создавая индуцированные плюрипотентные стволовые клетки или іPSC), затем генерируя клетки НІР из популяции іPSC.

А. Методологии для генетических изменений

Изобретение включает в себя способы модификации последовательностей нуклеиновых кислот внутри клеток или в бесклеточных условиях для получения как плюрипотентных клеток, так и клеток НІР. Типичные технологии включают гомологичную рекомбинацию, нокин, ZFN (нуклеазы цинковых пальцев), TALEN (эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции), CRISPR (короткие полиндромные повторы, регулярно расположенные группами)/Cas9 и другие сайт-специфические технологии нуклеаз.

Эти методы допускают возможность разрывов двухцепочечной ДНК в целевых сайтах локуса. Эти контролируемые двухцепочечные разрывы способствуют гомологичной рекомбинации в определенных сайтах локуса. Этот процесс направлен на нацеливание на конкретные последовательности молекул нуклеиновых кислот, таких как хромосомы, с помощью эндонуклеаз, которые распознают и связываются с последовательностями и индуцируют двухцепочечный разрыв в молекуле нуклеиновой кислоты. Двухцепочечный разрыв восстанавливается либо с помощью нехомологичного концевоего присоединения низкой точности (NHEJ), либо с помощью гомологичной рекомбинации (HR).

Специалистам в данной области будет понятно, что для конструирования плюрипотентных клеток по настоящему изобретению можно использовать ряд различных методик, а также конструирование iPSC, чтобы стать гипоиммуногенными, как описано в настоящем изобретении.

В целом, эти методы могут использоваться по отдельности или в комбинации. Например, при создании клеток HiP CRISPR можно использовать для снижения экспрессии активного белка B2M и/или CIITA в сконструированных клетках, для нокина функциональности CD47 с помощью вирусных методов (например, с использованием лентивируса). Кроме того, как будет понятно специалистам в данной области, хотя в одном варианте осуществления последовательно используется стадия CRISPR для нокаута B2M, за которой следует стадия CRISPR для нокаута CIITA с конечной стадией использования лентивируса для нокина функциональности CD47, этими генами можно манипулировать в разном порядке, используя разные технологии.

Как более подробно обсуждается ниже, транзиторная экспрессия перепрограммирующих генов обычно осуществляется для генерации/индукции плюрипотентных стволовых клеток.

а. Технологии CRISPR

В одном варианте осуществления изобретения с клетками производят манипуляции, используя технологии коротких полиндромных повторов, регулярно расположенных группами/Cas («CRISPR»), известные в данной области. CRISPR может

использоваться для генерации исходных iPSC или для генерации клеток HiP из iPSC. Существует большое количество методик на основе CRISPR, см., например, Doudna and Charpentier, Science doi: 10.1126/science.1258096, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Методики и наборы CRISPR продаются на коммерческой основе.

b. Технологии TALEN

В некоторых вариантах осуществления HiP клетки по изобретению получены с использованием технологии эффекторной нуклеазы подобной активатору транскрипции (TALEN). TALEN – это ферменты рестрикции, объединенные с нуклеазой, которые могут быть сконструированы так, чтобы связываться и разрезать практически любую желаемую последовательность ДНК. Наборы TALEN продаются на коммерческой основе.

c. Технологии Цинковых Пальцев

В одном варианте осуществления с клетками проводят манипуляции с использованием технологий нуклеаз цинковых пальцев. Нуклеазы Zn-пальца представляют собой искусственные ферменты рестрикции, полученные путем слияния ДНК-связывающего домена цинкового пальца с доменом расщепления ДНК. Домены цинкового пальца могут быть сконструированы для нацеливания на конкретные желаемые последовательности ДНК, и это позволяет нуклеазам цинкового пальца нацеливаться на уникальные последовательности в сложных геномах. Используя преимущества эндогенного механизма репарации ДНК, эти реагенты могут быть использованы для точного изменения геномов высших организмов, подобно CRISPR и TALEN.

d. Технологии на основе вирусов

Существует широкое разнообразие вирусных методов, которые можно использовать для создания клеток HiP по изобретению (а также для исходной генерации iPSC), включая, но не ограничиваясь этим, использование ретровирусных векторов, лентивирусных векторов, аденовирусных векторов и векторов на основе вируса Сендая. Эписомные векторы, используемые при генерации iPSC, описаны ниже.

e. Отрицательная регуляция генов с использованием

интерферирующей РНК

В других вариантах осуществления гены, которые кодируют белки, используемые в молекулах НЛА, подавляются с помощью технологий РНКи. РНК-интерференция (РНКи) – это процесс, при котором молекулы РНК ингибируют экспрессию генов, часто вызывая деградацию определенных молекул мРНК. Два типа молекул РНК – микроРНК (миРНК) и короткая интерферирующая РНК (киРНК) – являются центральными для интерференции РНК. Они связываются с молекулами-мишенями мРНК и увеличивают или уменьшают их активность. РНКи помогает клеткам защищаться от паразитических нуклеиновых кислот, таких как вирусы и транспозоны. РНКи также влияет на развитие.

Молекулы sdРНК представляют собой класс асимметричных киРНК, содержащих направляющую (антисмысловую) цепь из 19–21 оснований. Они содержат 5'фосфат, 2'Оме или 2'F модифицированные пиримидины и шесть фосфоротиоатов в 3'-положениях. Они также содержат смысловую цепь, содержащую 3'-конъюгированные стерольные фрагменты, 2 фосфоротиоата в 3'-положении и 2'Оме-модифицированные пиримидины. Обе цепи содержат 2'-Оме пурины с непрерывными отрезками немодифицированных пуринов, не превышающими по длине 3. sdРНК раскрыта в патенте США № 8 796 443, включенном в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Для всех этих технологий используются хорошо известные рекомбинантные методики для получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, как описано в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты (либо которые кодируют желаемый полипептид, например, CD47, либо последовательности разрушения) могут быть функционально связаны с одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессирующей конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности обычно подходят для клетки-хозяина и пациента, подлежащего лечению. В данной области известно множество типов подходящих экспрессирующих векторов и подходящих регуляторных последовательностей для множества клеток-хозяев. Как правило, одна или более регуляторных

нуклеотидных последовательностей могут включать, но не ограничиваются ими, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания рибосом, последовательности начала и окончания транскрипции, последовательности начала и окончания трансляции, а также последовательности энхансера или активатора. Конститутивные или индуцируемые промоторы, известные в данной области, также рассматриваются. Промоторы могут быть либо встречающимися в природе промоторами, либо гибридными промоторами, которые объединяют элементы более чем одного промотора. Экспрессирующая конструкция может присутствовать в клетке в эписоме, такой как плаزمид, или экспрессирующая конструкция может быть вставлена в хромосому. В конкретном варианте осуществления экспрессирующий вектор включает ген маркера селекции, чтобы обеспечить возможность селекции трансформированных клеток-хозяев. Некоторые варианты осуществления включают экспрессирующий вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида, функционально связанный по меньшей мере с одной регуляторной последовательностью. Регуляторная последовательность для использования в настоящем описании включает промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующий вектор конструируют для выбора клетки-хозяина, подлежащей трансформации, конкретного варианта полипептида, который требуется экспрессировать, числа копий вектора, способности контролировать это число копий или для экспрессии любого другого белка, кодируемого вектором, такого как маркеры антибиотика.

Примеры подходящих промоторов млекопитающих включают, например, промоторы следующих генов: убиквитин/S27a-промотор хомяка (WO 97/15664), ранний промотор вакуолизирующего обезьяньего вируса 40 (SV40), главный поздний промотор аденовируса, промотор металлотioneина-I мыши, область длинного концевой повтора вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), область длинного концевой повтора вируса лейкоза мыши Молони и ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV). Примерами других гетерологичных

промоторов млекопитающих являются промоторы актина, иммуноглобулина или промотор(ы) белков теплового шока.

В дополнительных вариантах осуществления промоторы для использования в клетках-хозяевах млекопитающих могут быть получены из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы птиц (UK 2211504, опубликован 5 июля 1989 г.), вирус папилломы быка, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и обезьяний вирус 40 (SV40). В других вариантах осуществления используются гетерологичные промоторы млекопитающих. Примеры включают промотор актина, промотор иммуноглобулина и промоторы белков теплового шока. Ранние и поздние промоторы SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит вирусный источник репликации SV40. Fiers et al., *Nature* 273: 113-120 (1978). Непосредственный ранний промотор человеческого цитомегаловируса удобно получать в виде рестрикционного фрагмента HindIII E. Greenaway, PJ et al., *Gene* 18: 355-360 (1982). Вышеприведенные ссылки включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

В. Генерация плюрипотентных клеток

Изобретение относится к способам получения неиммуногенных плюрипотентных клеток из плюрипотентных клеток. Таким образом, первым шагом является получение плюрипотентных стволовых клеток.

Генерация мышинных и человеческих плюрипотентных стволовых клеток (обычно называемых iPSC; miPSC для мышинных клеток или hiPSC для человеческих клеток) в целом известна в данной области. Как будет понятно специалистам в данной области техники, существует множество различных способов генерации iPSC. Первоначальную индукцию делали из эмбриональных или взрослых фибробластов мыши с использованием вирусного введения четырех факторов транскрипции, Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4; см. Takahashi and Yamanaka *Cell* 126: 663-676 (2006), которая настоящим включена в качестве ссылки в полном объеме и конкретно для методов, изложенных там. С тех пор был разработан ряд методов; см. Seki et al., *World J. Stem Cells* 7 (1): 116-125 (2015) для обзора, и Lakshmipathy and Vermuri, editors, *Methods in*

Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols, Springer 2013, каждая из которых настоящим включена в качестве ссылки в полном объеме, и, в частности, для способов генерации hiPSC (см., например, главу 3 последней ссылки).

Как правило, iPSC генерируются путем транзитной экспрессии одного или более «факторов перепрограммирования» в клетке-хозяине, обычно вводимых с использованием эписомных векторов. В этих условиях небольшое количество клеток превращается в iPSC (как правило, эффективность этой стадии низкая, так как маркеры селекции не используются). Как только клетки «перепрограммируются» и становятся плюрипотентными, они теряют эписомный вектор(ы) и продуцируют факторы, используя эндогенные гены. Эта потеря эписомного (эписомных) вектора (векторов) приводит к получению клеток, которые называются клетками «нулевого узнавания». Это желательно, поскольку чем меньше генетических модификаций (особенно в геноме клетки-хозяина), тем лучше. Таким образом, предпочтительно, чтобы полученные hiPSC не имели постоянных генетических модификаций.

Специалистам в данной области также понятно, что число факторов перепрограммирования, которые могут использоваться или используются, может варьироваться. Обычно, когда используется меньше факторов перепрограммирования, эффективность трансформации клеток в плюрипотентное состояние снижается, а также «плюрипотентность», например, меньшее количество факторов перепрограммирования может привести к тому, что клетки не являются полностью плюрипотентными, но могут только дифференцироваться в меньшее количество типов клеток.

В некоторых вариантах осуществления используется единственный фактор перепрограммирования, OCT4. В других вариантах осуществления используются два фактора перепрограммирования, OCT4 и KLF4. В других вариантах осуществления используются три фактора перепрограммирования, OCT4, KLF4 и SOX2. В других вариантах осуществления используются четыре фактора перепрограммирования, OCT4, KLF4, SOX2 и c-Myc. В других вариантах осуществления можно использовать 5, 6 или 7

факторов перепрограммирования, выбранных из SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28 и SV40L T-антигена.

В общем, эти гены факторов перепрограммирования представлены в эписомных векторах, таких как известные в данной области техники и коммерчески доступные. Например, ThermoFisher/Invitrogen продают набор для перепрограммирования с использованием вируса Sendai для генерации hiPSC с нулевым узнаванием, см. номер в каталоге A34546. ThermoFisher также продает системы на основе EBNA, см. номер в каталоге A14703.

Кроме того, есть ряд коммерчески доступных линий hiPSC; см., например, линию Gibco® Episomal hiPSC, K18945, которая представляет собой клеточную линию iPSC человека с нулевым узнаванием без вирусной интеграции, не содержащую вирусов (см. также Burridge et al, 2011, выше).

В общем, как известно в данной области техники, iPSC получают из не плюрипотентных клеток, таких как клетки пуповинной крови CD34+, фибробласты и т. д. путем транзитной экспрессии факторов перепрограммирования, как описано в настоящем изобретении.

Например, успешные iPSC также генерировались с использованием только Oct3/4, Sox2 и Klf4, но без C-Мус, хотя с пониженной эффективностью перепрограммирования.

В целом, iPSC характеризуются экспрессией определенных факторов, которые включают KLF4, Nanog, OCT4, SOX2, ESRRB, TBX3, c-Мус и TCL1. Новая или повышенная экспрессия этих факторов для целей изобретения может быть вызвана индукцией или модуляцией эндогенного локуса или экспрессией транстена.

Например, мышинные iPSC могут быть получены с использованием методов Diecke et al., *Sci Rep.* 2015, Jan. 28; 5: 8081 (doi: 10.1038/srep08081), которая настоящим включена в качестве ссылки в полном объеме и конкретно для способов и реагентов для получения miPSC. Смотрите также, например, Burridge et al., *PLoS One*, 2011 6 (4): 18293, настоящим включена в качестве ссылки в полном объеме и конкретно для способов, изложенных в нем.

В некоторых случаях плюрипотентность клеток измеряется или

подтверждается, как указано в настоящем описании, например, путем анализа факторов перепрограммирования, как в целом показано на Фигуре 17, или путем проведения реакций дифференцировки, как указано в настоящем описании и в Примерах.

С. Генерация гипоиммуногенных плюрипотентных клеток

Настоящее изобретение относится к генерации, манипуляции, росту и трансплантации гипоиммуногенных клеток пациенту, как определено в настоящем описании. Генерацию НІР-клеток из плюрипотентных клеток осуществляют с помощью всего лишь трех генетических изменений, что приводит к минимальному нарушению клеточной активности, но придает клеткам иммуносайленсінг.

Как обсуждалось в настоящем описании, один вариант осуществления использует снижение или устранение белковой активности МНС I и II (HLA I и II, когда клетки человеческие). Это может быть сделано путем изменения генов, кодирующих их компонент. В одном варианте осуществления кодирующая область или регуляторные последовательности гена разрушаются с использованием CRISPR. В другом варианте осуществления трансляция гена снижается с использованием технологий интерферирующей РНК. Третье изменение – это изменение в гене, который регулирует восприимчивость к макрофагальному фагоцитозу, таком гене, как CD47, и это, как правило, «нокин» гена с использованием вирусных технологий.

В некоторых случаях, когда CRISPR используется для генетических модификаций, могут использоваться клетки hiPSC, которые содержат конструкцию Cas9, которая обеспечивает высокую эффективность редактирования клеточной линии; см., например, человеческую эписомную клеточную линию Cas9 iPSC, A33124, от Life Technologies.

1. Снижение функции HLA-I

Клетки НІР по изобретению включают снижение функции МНС I (HLA I, когда клетки получены из человеческих клеток).

Как будет понятно специалистам в данной области, снижение функции может быть выполнено рядом различных способов, включая удаление последовательностей нуклеиновых кислот из гена или прерывание последовательности другими последовательностями, или

изменение регуляторных компонентов нуклеиновой кислоты. Например, вся или часть кодирующей области интересующего гена может быть удалена или заменена «несмысловыми» последовательностями, могут быть осуществлены мутации со сдвигом рамки, может быть удалена или заменена вся или часть регуляторной последовательности, такой как промотор, могут быть удалены или заменены последовательности инициации трансляции и т. д.

Как будет понятно специалистам в данной области, успешное снижение функции МНС I (HLA I, когда клетки получены из человеческих клеток) в плюрипотентных клетках может быть измерено с использованием методов, известных в данной области техники и описанных ниже; например, методики FACS с использованием меченых антител, которые связывают комплекс HLA; например, с использованием коммерчески доступных антител против HLA-A, B, C, которые связываются с альфа-цепью антигенов HLA класса I главного комплекса гистосовместимости человека.

а. Изменение B2m

В одном варианте осуществления снижение активности HLA-I осуществляется путем нарушения экспрессии гена β -2-микроглобулина в плюрипотентной стволовой клетке, человеческая последовательность которой раскрыта в настоящем описании. Это изменение обычно упоминается в настоящем описании как «нокаут» гена, и в клетках HIP по изобретению оно осуществляется на обоих аллелях в клетке-хозяине. Как правило, методы для обоих нарушений одинаковы.

Особенно полезный вариант осуществления использует технологию CRISPR для нарушения гена. В некоторых случаях технология CRISPR используется для введения небольших делеций/вставок в кодирующую область гена, так что не образуется функциональный белок, часто в результате мутаций со сдвигом рамки, которые приводят к генерации стоп-кодона, так что получают укороченные, не функциональные белки.

Соответственно, полезным способом является использование последовательностей CRISPR, предназначенных для нацеливания на

кодирующую последовательность гена B2M у мыши или гена B2M у человека. После редактирования генов трансфицированные культуры iPSC диссоциируют на отдельные клетки. Отдельные клетки размножаются до полноразмерных колоний и тестируются на редактирование CRISPR путем скрининга на наличие aberrантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. Отбирают клоны с делециями в обоих аллелях. Такие клоны не экспрессировали B2M/B2M, как продемонстрировано с помощью ПЦР, и не экспрессировали HLA-I, как продемонстрировано анализом FACS (см., например, примеры 1 и 6).

Анализы для проверки инактивации гена B2M известны и описаны в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления анализ представляет собой вестерн-блоттинг клеточных лизатов, которые гибридизовали с антителами к белку B2M. В другом варианте осуществления полимеразные цепные реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) подтверждают наличие инактивирующего изменения.

Кроме того, клетки могут быть проверены, чтобы подтвердить, что комплекс HLA I не экспрессируется на клеточной поверхности. Это может быть проанализировано с помощью анализа FACS с использованием антител к одному или более компонентам клеточной поверхности HLA, как обсуждалось выше.

Примечательно, что у других были плохие результаты при попытке сайленсинга генов B2M в обоих аллелях. См., например, *Gornklusse et al., Nature Biotech.* Doi/10.1038/nbt.3860).

2. Снижение функции HLA-II

В дополнение к снижению HLA I, клетки HiP по изобретению также лишены функции MHC II (HLA II, когда клетки получены из человеческих клеток).

Как будет понятно специалистам в данной области техники, снижение функции может быть достигнуто несколькими способами, включая удаление последовательностей нуклеиновых кислот из гена, добавление последовательностей нуклеиновых кислот к гену, нарушение рамки считывания, прерывание последовательности другими последовательностями или изменение регуляторных компонентов нуклеиновой кислоты. В одном варианте осуществления

вся или часть кодирующей области интересующего гена может быть удалена или заменена «несмысловыми» последовательностями. В другом варианте осуществления регуляторные последовательности, такие как промотор, могут быть удалены или заменены, последовательности инициации трансляции могут быть удалены или заменены и т. д.

Успешное снижение функции МНС II (HLA II, когда клетки получены из человеческих клеток) в плюрипотентных клетках или их производных может быть измерено с использованием методик, известных в данной области, таких как вестерн-блоттинг с использованием антител к белку, методики FACS, методы ОТ-ПЦР и т. д.

а. Изменение СИТА

В одном варианте осуществления снижение активности HLA-II осуществляется путем нарушения экспрессии гена СИТА в плюрипотентной стволовой клетке, человеческая последовательность которого приведена в настоящем описании. Это изменение обычно упоминается в настоящем описании как «нокаут» гена, и в клетках НР по изобретению оно осуществляется на обоих аллелях в клетке-хозяине.

Анализы для проверки инактивации гена СИТА известны и описаны в настоящем изобретении. В одном варианте осуществления анализ представляет собой вестерн-блоттинг клеточных лизатов, гибридных с антителами к белку СИТА. В другом варианте осуществления полимеразные цепные реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) подтверждают наличие инактивирующего изменения.

Кроме того, клетки могут быть проверены, чтобы подтвердить, что комплекс HLA II не экспрессируется на клеточной поверхности. Опять же, этот анализ проводится, как известно в данной области (см., например, Фигуру 21), и, как правило, проводится с использованием либо вестерн-блоттинга, либо анализа FACS на основе коммерческих антител, которые связываются с HLA класса II HLA-DR, DP и большей частью DQ антигенов, как указано ниже.

Особенно полезный вариант осуществления использует технологию CRISPR для нарушения гена СИТА. Технология CRISPR

была разработана для нацеливания на кодирующую последовательность гена *Ciita* у мыши или гена *CIITA* у человека, существенного фактора транскрипции для всех молекул MHC II. После редактирования генов трансфицированные культуры iPSC диссоциировали на отдельные клетки. Их наращивали до полноразмерных колоний и тестировали на успешное редактирование CRISPR путем скрининга на наличие aberrантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. Клоны с делециями не экспрессировали *Ciita*/*CIITA*, как определено с помощью ПЦР, и не экспрессировали MHC II/HLA-II, как определено анализом FACS.

3. Снижение функции фагоцитоза

В дополнение к снижению функции HLA I и II (или MHC I и II), обычно с использованием нокаутов *B2M* и *CIITA*, клетки НРР по изобретению обладают пониженной восприимчивостью к макрофагальному фагоцитозу и NK-клеточному уничтожению. Получающиеся в результате клетки НРР «избегают» макрофагального и врожденного путей иммунитета благодаря одному или более CD47-трангенам.

а. Увеличение функции CD47

В некоторых вариантах осуществления уменьшенный макрофагальный фагоцитоз и восприимчивость к NK-клеточному уничтожению являются результатом повышенного уровня CD47 на поверхности НРР-клеток. Это делается несколькими способами, что будет понятно специалистам в данной области техники, использующим технологию «нокин» или трансгенные технологии. В некоторых случаях повышенная экспрессия CD47 является результатом присутствия одного или более трансгенов CD47.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления одну или более копий гена CD47 добавляют к клеткам НРР под контролем индуцируемого или конститутивного промотора, причем последний является предпочтительным. В некоторых вариантах осуществления используют лентивирусную конструкцию, как описано в настоящем изобретении или, как известно в данной области. Гены CD47 могут интегрироваться в геном клетки-хозяина под контролем подходящего промотора, как известно в данной области.

Клеточные линии НРР были получены из *B2M* -/- *CIITA* -/-

iPSC. Клетки, содержащие лентивирусные векторы, экспрессирующие CD47, отбирали с использованием маркера Бластицидина. Синтезировали последовательность гена CD47 и ДНК клонировали в плазмиду Lentivirus pLenti6/V5 с устойчивостью к бластидину (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)

В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена CD47 может быть увеличена путем изменения регуляторных последовательностей эндогенного гена CD47, например, путем замены эндогенного промотора на конститутивный промотор или другой индуцируемый промотор. Обычно это можно сделать, используя известные методы, такие как CRISPR.

После изменения присутствие достаточной экспрессии CD47 можно анализировать с использованием известных методик, таких как методы, описанные в примерах, такие как вестерн-блоттинг, анализы ИФА или анализы FACS с использованием антител против CD47. В общем, «достаточность» в этом контексте означает увеличение экспрессии CD47 на поверхности HIP-клеток, что вызывает сайленсинг NK-клеточного уничтожения. Уровень естественной экспрессии на клетках слишком низок, чтобы защитить их от NK-клеточного лизиса после удаления их MHC I.

4. Гены «самоубийства»

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к гипоиммуногенным плюрипотентным клеткам, которые содержат «ген самоубийства» или «переключатель самоубийства». Они включены, чтобы функционировать как «защитный переключатель», который может вызвать смерть гипоиммуногенных плюрипотентных клеток, если они растут и делятся нежелательным образом. Подход с использованием «гена самоубийства» включает в себя ген «самоубийства» в векторе переноса гена, кодирующего белок, который приводит к уничтожению клеток только при активации конкретным соединением. Ген «самоубийства» может кодировать фермент, который избирательно превращает нетоксичное соединение в высокотоксичные метаболиты. Результатом является специфическое устранение клеток, экспрессирующих фермент. В некоторых вариантах осуществления ген «самоубийства» является геном герпесвирусной тимидинкиназы (HSV-tk), а триггером является

ганцикловир. В других вариантах осуществления ген «самоубийства» представляет собой ген цитозин-дезаминазы (EC-CD) *Escherichia coli*, а триггером является 5-фторцитозин (5-FC) (Barese et al., *Mol. Therap.* 20 (10): 1932-1943 (2012), Xu et al., *Cell Res.* 8: 73-8 (1998), которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.)

В других вариантах осуществления ген «самоубийства» представляет собой индуцируемый белок каспазы. Индуцируемый белок каспазы содержит, по меньшей мере, часть белка каспазы, способного индуцировать апоптоз. В одном варианте осуществления часть белка каспазы приведена в SEQ ID NO: 6. В предпочтительных вариантах осуществления индуцируемый белок каспазы представляет собой iCasp9. Он содержит последовательность человеческого FK506-связывающего белка FKBP12 с мутацией F36V, соединенного через ряд аминокислот с геном, кодирующим каспазу 9 человека. FKBP12-F36V с высокой аффинностью связывается с низкомолекулярным димеризующим агентом AP1903. Таким образом, суицидальная функция iCasp9 в настоящем изобретении запускается введением химического индуктора димеризации (CID). В некоторых вариантах осуществления CID представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство AP1903. Димеризация вызывает быструю индукцию апоптоза. (См. WO2011146862; Stasi et al., *N. Engl. J. Med* 365; 18 (2011); Tey et al., *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13:913-924 (2007), каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.)

5. Анализы на фенотип НІР и сохранение плюрипотентности

После того, как клетки НІР были получены, их можно анализировать на предмет их гипои́ммуногенности и/или сохранения плюрипотентности, как в целом описано в настоящем изобретении и в примерах.

Например, гипои́ммуногенность анализируют с использованием ряда методик, как показано на Фигуре 13 и Фигуре 15. Эти методы включают трансплантацию аллогенным хозяевам и мониторинг роста клеток НІР (например, тератом), которые избегают иммунной системы хозяина. Производные НІР трансдуцируются для экспрессии люциферазы и могут затем отслеживаться с использованием

биолюминесцентного изображения. Аналогично, реакция Т-клеток и/или В-клеток животного-хозяина на клетки НІР тестируется для подтверждения того, что клетки НІР не вызывают иммунную реакцию у животного-хозяина. Функцию Т-клеток оценивают с помощью Elispot, ИФА, FACS, ПЦР или масс-цитометрии (CYTOF). В-клеточный ответ или ответ антител оценивают с использованием FACS или люминескса. Дополнительно или альтернативно, клетки могут быть проанализированы на их способность избегать врожденных иммунных реакций, например, NK-клеточного уничтожения, как в целом показано на Фигуре 14. Литолическую активность NK-клеток оценивают *in vitro* или *in vivo* (как показано на Фигуре 15).

Точно так же сохранение плюрипотентности проверяют несколькими способами. В одном варианте осуществления плюрипотентность оценивают по экспрессии определенных специфических для плюрипотентности факторов, как в целом описано в настоящем изобретении и показано на Фигуре 29. Дополнительно или альтернативно, клетки НІР дифференцируются в один или более типов клеток в качестве показателя плюрипотентности.

D. Предпочтительные варианты осуществления изобретения

В настоящем описании предложены типоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки («клетки НІР»), которые проявляют плюрипотентность, но не приводят к иммунному ответу хозяина при трансплантации аллогенному хозяину, такому как пациент-человек, либо в виде клеток НІР, либо в виде дифференцированных продуктов клеток НІР.

В одном варианте осуществления плюрипотентные стволовые клетки человека (hiPSC) становятся типоиммуногенными вследствие а) разрушения гена B2M на каждом аллеле (например, B2M -/-), б) разрушения гена CIITA на каждом аллеле (например, CIITA -/-) и с) избыточной экспрессией гена CD47 (CD47 +, например, путем введения одной или более дополнительных копий гена CD47 или активации геномного гена). Это создает hiPSC-популяцию B2M -/- CIITA -/- CD47tg. В предпочтительном варианте осуществления клетки не являются иммуногенными. В другом варианте осуществления клетки НІР становятся неиммуногенными B2MCIITA, как описано выше, но дополнительно модифицируются путем

включения индуцируемого гена «самоубийства», который индуцируется для уничтожения клеток *in vivo*, когда это необходимо.

Е. Поддержание клеток НІР

После генерации клетки НІР могут поддерживать недифференцированное состояние, как это известно для поддержания іPSC. Например, клетки НІР культивируют на матрикеле с использованием культуральной среды, которая предотвращает дифференцировку и поддерживает плюрипотентность.

Г. Дифференцировка клеток НІР

В изобретении предложены клетки НІР, которые дифференцируются в различные типы клеток для последующей трансплантации пациентам. Как будет понятно специалистам в данной области, способы дифференцировки зависят от целевого типа клеток с использованием известных методик. Клетки дифференцируются в суспензии и затем их помещают в гелевую матричную форму, такую как матригель, желатин или фибрин/тромбин для облегчения выживания клеток. Дифференцировку оценивают, как известно в данной области, обычно путем оценки наличия клеточно-специфических маркеров.

В некоторых вариантах осуществления клетки НІР дифференцируются в гепатоциты для устранения потери функционирования гепатоцитов или цирроза печени. Существует ряд методов, которые можно использовать для дифференцировки клеток НІР в гепатоциты; см., например, Pettinato *et al.*, doi: 10.1038/spre32888, Snykers *et al.*, *Methods Mol Biol* 698: 305-314 (2011), Si-Tayeb *et al.*, *Hepatology* 51: 297-305 (2010) и Asgari *et al.*, *Stem Cell Rev* (: 493-504 (2013), каждая из которых настоящим прямо включена в качестве ссылки в полном объеме и конкретно для методологий и реагентов для дифференцировки. Дифференцировку анализируют, как известно в данной области, обычно путем оценки наличия маркеров, связанных с гепатоцитами, и/или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь этим, альбумин, альфа-фетопротейн и фибриноген. Дифференцировка также может быть измерена функционально, как например, путем измерения метаболизма аммиака, накопления и поглощения LDL, поглощения и

выделения ICG и накопления гликогена.

В некоторых вариантах осуществления клетки hIP дифференцируются в бета-подобные клетки или островковые органоиды для трансплантации для лечения сахарного диабета I типа (T1DM). Клеточные системы являются многообещающим способом решения проблемы T1DM, см., например, Ellis et al., Doi/10.1038/nrgastro.2017.93, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, Pagliuca et al. сообщили об успешной дифференцировке β -клеток из hiPSC (см. doi/10.106/j.cell.2014.09.040, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме и, в частности, об описанных там способах и реагентах для крупномасштабного производства функциональных человеческих β -клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека). Кроме того, Vegas et al. продемонстрировали продуцирование человеческих β -клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека с последующей инкапсуляцией, чтобы избежать отторжения иммунитета хозяином; (doi: 10.1038/nm.4030, которая включена настоящим в качестве ссылки в полном объеме и, в частности, для описанных там способов и реагентов для крупномасштабного продуцирования функциональных человеческих β -клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека).

Дифференцировку оценивают, как известно в данной области, обычно путем оценки наличия маркеров, ассоциированных с β -клетками или специфических маркеров, включая, но не ограничиваясь этим, инсулин. Дифференцировку также можно измерить функционально, например, путем измерения метаболизма глюкозы, см., в целом, Muraro et al., Doi: 10.1016/j.cels.2016.09.002, которая настоящим включена в качестве ссылки в полном объеме, и конкретно для описанных там биомаркеров.

Как только бета-клетки dHIP генерируются, их можно трансплантировать (либо в виде клеточной суспензии, либо в гелевой матрице, как описано в настоящем изобретении) в воротную вену/печень, сальник, слизистую оболочку желудочно-кишечного

тракта, костный мозг, мышцу или в подкожные мешки.

В некоторых вариантах осуществления клетки hiP дифференцируются в пигментный эпителий сетчатки (RPE) для лечения угрожающих зрению заболеваний глаза. Человеческие плюрипотентные стволовые клетки были дифференцированы в клетки RPE с использованием методов, описанных в Kamao *et al.*, *Stem Cell Reports* 2014: 2: 205-18, которая настоящим включена в качестве ссылки в полном объеме и, в частности, для методов и реагентов, описанных там для способов дифференцировки и реагентов; см. также Mandai *et al.*, doi: 10.1056/NEJMoal608368, которая также включена настоящим в качестве ссылки в полном объеме, для методик создания листов клеток RPE и трансплантации пациентам.

Дифференцировку можно анализировать, как известно в данной области, обычно путем оценки наличия маркеров, связанных с RPE и/или специфических маркеров, или путем функциональных измерений. См., например, Kamao *et al.*, Doi: 10.1016/j.stemcr.2013.12.007, которая включена настоящим в качестве ссылки в полном объеме, и конкретно для маркеров, обозначенных в первом абзаце раздела результатов.

В некоторых вариантах осуществления клетки hiP дифференцируются в кардиомиоциты для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. В данной области техники известны способы дифференцировки hiPSC в кардиомиоциты, которые обсуждаются в Примерах. Дифференцировку можно анализировать, как известно в данной области, обычно путем оценки наличия маркеров, ассоциированных с кардиомиоцитами или специфических маркеров, или путем измерения функциональности; см., например, Loh *et al.*, doi: 10.1016/j.cell.2016.06.001, которая настоящим включена в качестве ссылки и конкретно для способов дифференцировки стволовых клеток, включая кардиомиоциты.

В некоторых вариантах осуществления клетки hiP дифференцируются в эндотелиальные колониеобразующие клетки (ECFC) для образования новых кровеносных сосудов для лечения заболевания периферических артерий. Методы дифференцировки эндотелиальных клеток известны. См., например, Prasain *et al.*,

doi: 10.1038/nbt.3048, которая включена настоящим в качестве ссылки в полном объеме и конкретно для способов и реагентов для генерации эндотелиальных клеток из плюрипотентных стволовых клеток человека, а также для методов трансплантации. Дифференцировку можно анализировать, как известно в данной области техники, обычно путем оценки наличия ассоциированных или специфических маркеров эндотелиальных клеток, или путем измерения функциональности.

В некоторых вариантах осуществления клетки НІР дифференцируются в клетки-предшественники щитовидной железы и фолликулярные органоиды щитовидной железы, которые могут секретировать гормоны щитовидной железы для устранения аутоиммунного тиреоидита. Методы дифференцировки клеток щитовидной железы известны в данной области. См., например, Kurmann *et al.*, doi: 10.106/j.stem.2015.09.004, настоящим специально включена в качестве ссылки в полном объеме и конкретно для способов и реагентов для получения клеток щитовидной железы из плюрипотентных стволовых клеток человека, а также для методов трансплантации. Дифференцировку можно анализировать, как известно в данной области техники, обычно путем оценки наличия ассоциированных или специфических маркеров клеток щитовидной железы, или путем функциональных измерений.

G. Трансплантация дифференцированных клеток НІР

Как будет понятно специалистам в данной области, дифференцированные производные НІР трансплантируются с использованием методов, известных в данной области, которые зависят как от типа клеток, так и от конечного использования этих клеток. Как правило, клетки dНІР по изобретению трансплантируют либо внутривенно, либо путем инъекции пациенту в определенные места. При трансплантации в определенных местах клетки могут быть суспендированы в гелевой матрице, чтобы предотвратить дисперсию, пока они приживутся.

Для того чтобы изобретение, описанное в настоящем изобретении, могло быть более вполне понятно, изложены следующие примеры. Следует понимать, что эти примеры предназначены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как

ограничивающие данное изобретение каким-либо образом.

VIII. ПРИМЕРЫ

A. Общие методы

1. Генерация мышинных iPSC

Эти клетки были получены с использованием методов Diecke *et al.*, *Sci Rep.* 2015, Jan. 28; 5: 8081 (doi: 10.1038/srep08081), которая настоящим включена в качестве ссылки в полном объеме и специально для методов и реагентов для генерации miPSC.

Фибробласты мышинного кончика хвоста мышей диссоциировали и выделяли с коллагеназой типа IV (Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США) и поддерживали с помощью модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), L-глутамин, 4,5 г/л глюкозы, 100 Е/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °C, 20% O₂ и 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе. Затем 1×10⁶ мышинных фибробластов перепрограммировали с использованием новой оптимизированной по кодам мини-интронной плазмиды (co-MIP) (10–12 мкм ДНК), экспрессирующей четыре фактора перепрограммирования Oct4, KLF4, Sox2 и c-Myc, с использованием системы трансфекции Neon. После трансфекции фибробласты высевали на фидерный слой MEF и хранили в средах для фибробластов с добавлением бутирата натрия (0,2 мМ) и 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты. Когда появились ESC-подобные колонии, среду заменяли на мышиную среду iPSC, содержащую DMEM, 20% FBS, L-глутамин, неосновные аминокислоты (NEAA), β-меркаптоэтанол и фактор ингибирования лейкоза (LIF) 10 нг/мл. После 2 пассажей мышинные iPSC переносили в планшеты с покрытием в виде 0,2% желатина и дополнительно наращивали. При каждом пассаже iPSC сортировали по маркеру плюрипотентности мыши SSEA-1 с использованием магнитно-активированной сортировки клеток (MACS).

2. Генерация человеческих iPSC

Генерацию hiPSC выполняли, как в общих чертах описано в Burridge *et al.*, *PLoS One*, 2011 6 (4): 18293, которая настоящим включена в качестве ссылки в полном объеме и конкретно для описанных там способов.

Линия Gibco® человеческих эписомных iPSC (№ по каталогу A33124, Thermo Fisher Scientific) была получена из CD34+ пуповинной крови с использованием эписомной системы EBNA на основе трех плазмид, семи факторов (SOKMNLТ; SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28, и SV40L Т антиген). Считается, что эта линия iPSC имеет нулевое узнавание, поскольку не было интеграции в геном после события перепрограммирования. Было показано, что она свободна от всех генов перепрограммирования.

Линия Gibco® человеческих эписомных iPSC имеет нормальный кариотип и эндогенную экспрессию плюрипотентных маркеров, таких как Oct4, Sox2 и Nanog (как показано с помощью ОТ-ПЦР) и Oct4, SSEA4, TRA-1-60 и TRA-1-81 (как показано ICC). Анализ экспрессии всего генома и анализ эпигенетического профилирования показали, что эта эписомная линия hiPSC молекулярно неотличима от линий эмбриональных стволовых клеток человека (Burridge et al., 2011). В анализе направленной дифференцировки и тератомы эти hiPSC сохранили свой потенциал дифференцировки для эктодермальных, энтодермальных и мезодермальных линий (Burridge et al., 2011). Кроме того, сосудистые, кроветворные, нервные и сердечные линии были получены с высокой эффективностью (Burridge et al., 2011).

3. FACS анализ поверхностных молекул

а. Детектирование человеческих поверхностных молекул HLA I

Человеческие iPSC, iCM и iEC высевали в 6-луночные планшеты и стимулировали 100 нг/мл человеческого IFN γ (Peprotech, Rocket Hill, NJ). Клетки собирали и метили APC-конъюгированным антителом HLA-A, B, C (клон G46_2.6, кат. No.562006, BD BioSciences, Сан-Хосе, Калифорния) или APC-конъюгированным контрольным антителом к изотипу IgG1 (клон MOPC-21, кат. № 555751, BD BioSciences). Антитела к HLA-A, B, C специфически связываются с альфа-цепью антигенов HLA класса I главного комплекса гистосовместимости человека. Анализ данных проводили с помощью проточной цитометрии (BD Bioscience), и результаты выражали в виде кратного изменения для контроля изотипа.

4. Детектирование человеческих поверхностных молекул HLA II

Человеческие iPSC, iCM и iEC высевали в 6-луночные планшеты и стимулировали 100 нг/мл человеческого TNF α (Peprotech, Rocket Hill, NJ). Клетки собирали и метили Alexa-flour647-меченными антителами HLA-DR, DP, DQ (клон Tu3a, кат. 563591, BD BioSciences, Сан-Хосе, Калифорния) или меченным Alexa-flour647 контрольным антителом к изотипу IgG2a (клон G155-178, кат. № 557715, BD BioSciences). Антитела к HLA-DR, DP, DQ специфически связываются с HLA-DR, DP класса II человека и большинством антигенов DQ. Анализ данных проводили с помощью проточной цитометрии (BD Bioscience), и результаты выражали в виде кратного изменения для контроля изотипа.

5. Детекция человеческих поверхностных молекул CD47

Человеческие iPSC, iCM и iEC высевали в 6-луночные планшеты и стимулировали 100 нг/мл человеческого IFN γ (Peprotech, Rocket Hill, NJ). Клетки собирали и метили PerCP-Cy5-конъюгированным CD47 (клон B6H12, кат. № 561261, BD BioSciences, Сан-Хосе, Калифорния) или PerCP-Cy5-конъюгированным контрольным антителом к изотипу IgG1 (клон MOPC-21, кат. № 550795, BD BioSciences). Моноклональное антитело B6H12 CD47 специфически связывается с CD47, N-связанным гликановым белком 42-52 кДа. Анализ данных проводили с помощью проточной цитометрии (BD Bioscience), и результаты выражали в виде кратного изменения для контроля изотипа.

6. Детекция мышинных поверхностных молекул MHC I

Для детекции поверхностных молекул MHC I на miPSC, miEC, miSMC и miCM клетки высевали на 6-луночные планшеты, покрытые желатином, и стимулировали 100 нг/мл мышинного IFN γ (Peprotech, Rocket Hill, NJ). После сбора клетки метили PerCP-eFlour710-меченным антителом MHCI (клон AF6-88.5.5.3, кат. 46-5958-82, eBioscience, Santa Clara, CA) или PerCP-eFlour710-меченным контрольным антителом против изотипа IgG2b. (клон eB149/10H5, кат. № 46-4031-80, eBioscience). Антитело MHCI реагирует с аллоантигеном H-2Kb MHC класса I. Анализ данных проводили с помощью проточной цитометрии (BD Bioscience), и результаты выражали в виде кратного изменения для контроля изотипа.

7. Детекция мышинных поверхностных молекул MHC II

Для детекции поверхностных молекул МНС II на miPSC, miEC, miSMC и miCM клетки высевали на покрытые желатином 6-луночные планшеты и стимулировали 100 нг/мл мышинового TNF α (Peprotech, Rocket Hill, NJ). После сбора клетки метили PerCP-eFlour710-меченным антителом МНС II (клон M5/114.15.2, кат. 46-5321-82, eBioscience, Santa Clara, CA) или PerCP-eFlour710-меченным контрольным антителом против изотипа IgG2a/K. (клон eBM2a, кат.№ 46-4724-80, eBioscience). Антитело МНС II реагирует с главным комплексом гистосовместимости мыши класса II, как с гликопротеинами, кодируемыми субрегионами IA, так и с гликопротеинами, кодируемыми субрегионами IE. Анализ данных проводили с помощью проточной цитометрии (BD Bioscience), и результаты выражали в виде кратного изменения для контроля изотипа.

8. Детекция мышинных поверхностных молекул Cd47

Для детекции поверхностных молекул Cd47 на miPSC, miEC, miSMC и miCM клетки высевали на покрытые желатином 6-луночные планшеты и стимулировали 100 нг/мл мышинового IFN γ (Peprotech, Rocket Hill, NJ). После сбора клетки метили антителом против Cd47, меченным Alexa Fluor 647 (клон miap301, кат.563584, BD BioSciences, Сан-Хосе, Калифорния) или контрольным антителом против изотипа IgG2a/K, меченным Alexa Fluor 647. (клон R35-95, кат.№ 557690, BD BioSciences). Антитело против Cd47 специфически связывается с внеклеточным доменом CD47, также известным как интегрин-ассоциированный белок (IAP). Анализ данных проводили с помощью проточной цитометрии (BD Bioscience), и результаты выражали в виде кратного изменения для контроля изотипа.

9. Определение морфологии мышинных клеток in vivo после аллогенной трансплантации

Аллогенных мышей помещали в индукционную камеру и анестезию индуцировали 2% изофлураном (Isothesia, Butler Schein). 1 млн. клеток, или miPSC-производных кардиомиоцитов (miCM), miPSC-производных гладкомышечных клеток (miSMC) или miPSC-производных эндотелиальных клеток (miEC) в 250 мкл 0,9% физиологического раствора, смешивали с 250 мкл Матригеля BD высокой концентрации (1:1) BD Biosciences) и вводили подкожно в нижнюю часть спины

мышей с помощью шприца 23-G. Пробки с матригелем эксплантировали через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 и 12 недель после имплантации и фиксировали 4% параформальдегидом и 1% глутенальдегидом в течение 24 часов с последующей дегидратацией и погружением в парафин. Срез толщиной 5 мкм разрезали и окрашивали гематоксилином и эозином (HE).

10. Определение морфологии человеческих клеток *in vivo* после аллогенной трансплантации

Гуманизированных мышей NSG-SGM3 помещали в индукционную камеру и анестезию индуцировали 2% изофлураном (Isothesia, Butler Schein). 1 млн. клеток, либо hiPSC-производных кардиомиоцитов (hiCM), либо hiPSC-производных эндотелиальных клеток (hiEC) в 250 мкл 0,9% физиологического раствора, содержащего ZVAD (100 мМ, бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp (O-метил)-фторметилкетон, Calbiochem), Bcl-XL BH4 (проникающий в клетки пептид TAT, 50 нМ, Calbiochem), циклоспорин А (200 нМ, Sigma), IGF-1 (100 нг/мл, Reprotech) и пинацидил (50 мМ, Sigma) смешивали с 250 мкл Матригеля BD высокой концентрации (1: 1; BD Biosciences) и вводили подкожно в нижнюю часть спины мышей с помощью шприца 23-G. Пробки с матригелем эксплантировали через 2, 4, 6, 8, 10 и 12 недель после имплантации и фиксировали 4% параформальдегидом и 1% глутенальдегидом в течение 24 часов с последующей дегидратацией и погружением в парафин. Срез толщиной 5 мкм разрезали и окрашивали гематоксилином и эозином (HE).

В. Пример 1: Генерация плюрипотентных клеток, нокаутированных по β -2-микроглобулину в мышинной модели

Генерация индуцированных плюрипотентных клеток: Гипоиммунные плюрипотентные клетки были получены в варианте осуществления для мыши. Гипоиммунные плюрипотентные человеческие клетки представляют собой другой вариант осуществления, которые генерировали с использованием стратегий, описанных в настоящем изобретении.

Мышиные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (miPSC) были получены из фибробластов C57BL/6. Ингибированные митомицином CF1 мышинные эмбриональные фибробласты (MEF, Applied Stemcell, CA) оттаивали и хранили в DMEM+GlutaMax 31966 (Gibco,

Grand Island, NY) с 10% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (FCS hi), 1% MEM-NEAA и 1% Пенициллин, Стрептамин (Thermo Fisher Scientific-Gibco, Waltham, MA). После того как фидерные клетки MEF образовывали 100% конфлюентный монослой, miPSC выращивали на MEF в KO DMEM 10829 с 15% заменой сыворотки KO, 1% MEM-NEAA, 1% Pen Strep (Thermo Fisher-Gibco), 1x бета-меркаптоэтанолом и 100 единиц LIF (Millipore, Billerica, MA). Клетки содержали в 10 см чашках, среду меняли ежедневно, и клетки пассировали каждые 2-3 дня, используя 0,05% трипсин-ЭДТА (Thermo Fisher-Gibco). miPSC культивировали на желатине (Millipore) без фидеров с использованием стандартных сред. Культуры клеток регулярно проверяли на наличие микоплазменных инфекций с использованием набора MycoAlert (Lonza, Кельн, Германия).

Мыши: BALB/c (BALB/cAnNCr1, H2d), C57BL/6 (C57BL/6J, B6, H2b), BALB/c ню (BALB/c NU/NU, CAnN.CgFoxn1 <nu>/Cr1, H2d) и Scid beige (CBySmn.CB17-Prkdcscid/J) (все 6-12 недель) использовались в качестве реципиентов для различных анализов (возраст всех 6-12 недель). Мыши были приобретены в Charles River Laboratories (Зульцфельд, Германия) и получали гуманный уход в соответствии с Руководством по принципам работы с лабораторными животными. Эксперименты на животных были одобрены гамбургским соглашением «Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz» и проводились в соответствии с местными и европейскими правилами.

Подтверждение плюрипотентности: плюрипотентность была показана с помощью ОТ-ПЦР. РНК экстрагировали с использованием мини-набора PureLink RNA (Thermo Fisher Scientific). Стадию ДНКазы I включали для удаления загрязняющей геномной ДНК. кДНК генерировали с использованием набора для обратной транскрипции высокоэффективной кДНК Applied Biosystems®. Контрольные образцы без обратной транскриптазы (без ОТ) также генерировали из всех образцов РНК. Ген-специфические праймеры использовали для амплификации последовательностей-мишеней с использованием AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific-Applied

Biosystems, Waltham, MA). Реакции ПЦР визуализировали на 2% агарозных гелях. Был включен набор праймеров для положительного контроля, которые амплифицируют конститутивно экспрессируемый ген домашнего хозяйства (*Actb*), который кодирует белок клеточного цитоскелета. Результаты показаны на Фигуре 2. Маркеры плюрипотентности *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Esrrb*, *Tbx3*, *Tcl1* были обнаружены с помощью отПЦР клеток *miPSC*, но не родительских фибробластов.

Плюрипотентность также проверяли методом иммуофлюоресценции. *miPSC* высевали в 24-луночные планшеты и обрабатывали для ОТ-ПЦР и иммуоцитохимического (ICC) анализа через 48 ч после посева. Для ICC клетки фиксировали, пермеабелизовали и блокировали с использованием набора для фиксации/пермеабелизации Image-iT (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Клетки окрашивали в течение ночи при 4 °C первичными антителами к *Sox2* и *Oct4*. После нескольких промывок клетки инкубировали с вторичным антителом AlexaFluor 488 и реагентом NucBlue Fixed Cell ReadyProbes (Thermo Fisher Scientific). Окрашенные клетки визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа и были положительными для *Sox2* и *Oct4*. Данные не показаны.

На Фигуре 3 показано дальнейшее подтверждение плюрипотентности с помощью функционального анализа. 2×10^6 клеток *miPSC* инъецировали в мышцу бедра реципиента C57BL/6 (сингенные), BALB/c (аллогенные), BALB/c голые (аллогенные, но с дефицитом Т-клеток) и мышей *scid beige* (иммунодефицитные). Тератомы были сформированы у всех мышей, за исключением иммунокомпетентных аллогенных мышей BALB/c.

Нокаут микроглобулина β -2: для нокаута гена *B2m* использовали технологию CRISPR. Для нацеливания на кодирующую последовательность гена β -2-микроглобулина (*B2m*) мыши последовательность 5'-TTCGGCTTCCCATTCTCCGG (TGG) -3' CRISPR отжигали и лигировали в векторы All-In-One (AIO), содержащие экспрессирующую кассету Cas9 в соответствии с инструкциями набора (GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit, Thermo Fischer

Scientific, Waltham, MA). (Другие CRISPR, которые работали, но были менее эффективными, были 5'-GTATACTCAGGCCACCCAC (CGG)-3' и 5'-GGCGTATGTATCAGTCTCAG (TGG)-3'). miPSC трансфецировали векторами AIO с использованием электропорации Neon с двумя импульсами 1200В продолжительностью 20 мс. Трансфецированные культуры iPSC диссоциировали на отдельные клетки с использованием 0,05% трипсина (Gibco) и затем сортировали с помощью сортера клеток FACS Aria™ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) для удаления дублетов и дебриса путем селективного гейтинга при эмиссии прямого и бокового рассеяния. Отдельные клетки наращивали до полноразмерных колоний и тестировали на наличие редактирования CRISPR путем скрининга на наличие аберрантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. Вкратце, последовательность-мишень амплифицировали с помощью ПЦР с использованием AmpliTaq Gold Mastermix (Thermo Fisher-Applied Biosystems, Waltham, MA) и праймеров B2m gDNA:

F: 5'-CTGGATCAGACATATGTGTTGGGA-3',

R: 5'-GCAAAGCAGTTTTAAGTCCACACAG-3'

После очистки полученного продукта ПЦР (PureLink® Pro 96 PCR Purification Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) проводили секвенирование методом Сэнгера с использованием Ion Personal Genome Machine (PGM™, Thermo Fisher Scientific). Секвенирование для идентификации гомогенности области в 250 п.н. гена B2m, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров B2m gDNA PGM:

F: 5'-TTTTCAAAATGTGGGTAGACTTTGG-3'и

R: 5'- GGATTTCAATGTGAGGCGGGT-3'.

Продукт ПЦР очищали, как описано ранее, и получали с использованием набора Ion PGM Hi-Q Template (Thermo Fisher Scientific). Эксперименты проводили на системе Ion PGM™ с набором Ion 318™ Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific). Снова выполняли анализ на плюрипотентность.

Как видно из Фигуры 4, экспрессия β -2-микроглобулина была нокаутирована в клетках miPSC. Экспрессия MHC-I не индуцировалась стимуляцией IFN- γ (правая панель). В качестве контроля,

родительские клетки miPSC стимулировали IFN- γ (левая панель).

С. Пример 2: Генерация плюрипотентных клеток, дважды нокаутированных по β -2-микроглобулину/Ciita

Технологию CRISPR использовали для дополнительного нокаута гена Ciita. Для нацеливания на кодирующую последовательность мышинного гена Ciita последовательность CRISPR 5'-GGTCCATCTGGTCATAGAGG(CGG)-3' отжигали и лигировали в векторы All-In-One (AIO), содержащие экспрессирующую кассету Cas9, согласно инструкциям набора (GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit, Thermo Fischer, Waltham, MA). miPSC трансфецировали векторами AIO, используя то же условие для B2m-KO. Трансфецированные культуры iPSC диссоциировали на отдельные клетки с использованием 0,05% трипсина (Thermo Fisher-Gibco) и затем сортировали с помощью сортера клеток FACS Aria™ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) для удаления дублетов и дебриса путем селективного гейтинга при прямом и боковом рассеянии. Одиночные клетки наращивали до полноразмерных колоний и тестировали на редактирование CRISPR путем скрининга на наличие aberrантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. Вкратце, последовательность-мишень амплифицировали с помощью ПЦР с использованием AmpliTaq Gold Mastermix (Thermo Fisher Applied Biosystems, Дармштадт, Германия) и праймеров Ciita gDNA F: 5'-CCCCAGAACGATGAGCTT-3', R: 5'-TGCAGAAGTCCTGAGAAGGCC-3'. После очистки полученного продукта ПЦР (PureLink® Pro 96 PCR Purification Kit, Thermo Fisher, Waltham, MA) проводили секвенирование по методу Сэнгера. С использованием хроматограммы последовательности ДНК отредактированные клоны затем идентифицировали по наличию aberrантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. Размер вставки/делеции рассчитывали с помощью инструмента TIDE. ПЦР и ICC выполняли снова, чтобы проверить статус плюрипотентности клеток.

Фигура 5 подтверждает двойной нокаут miPSC/ β -2-микроглобулин/Ciita. МНС-II не может быть индуцирован TNF-альфа для экспрессии МНС-II.

D. Пример 3: Генерация Cd47+ плюрипотентных клеток, дважды

нокаутированных по β -2-микроглобулину/Ciita

Экспрессирующий вектор Cd47 вводили в созданные выше дважды нокаутированные miPSC B2m/Ciita. Вектор доставляли с использованием лентивируса, содержащего кассету устойчивости к антибиотику Бластицидину. Синтезировали последовательность гена Cd47, и ДНК клонировали в плазмиду Lentivirus pLenti6/V5 (ThermoFisher, Waltham, MA), содержащую маркер устойчивости к бластидину. Секвенирование по Сэнгеру выполняли, чтобы проверить, что никакие мутации не произошли. Генерацию лентивируса проводили с исходным титром 1×10^7 ТЕ/мл. Рекомбинантный вектор трансдуцировали в 2×10^5 miPSC с двойным нокаутом B2m-KO/Ciita, выращенных на устойчивых к бластидину клетках MEF в течение 72 часов с отношением MOI 1:10 с последующей селекцией на антибиотиках с 12,5 мкг/мл бластицидина в течение 7 дней. Отселектированные на антибиотике пулы тестировали путем ОТ-кПЦР-амплификации мРНК Cd47 и проточной цитометрии с детектированием Cd47. После подтверждения экспрессии Cd47 клетки наращивали и подвергали анализу плюрипотентности.

На Фигуре 6А показано повышение экспрессии Cd47 из трансгена, добавленного к дважды нокаутированным клеткам по β -2-микроглобулину/ Ciita (iPS^{hypo}-клетки). На Фигуре 6В показано, что iPS^{hypo}-клетки C57BL/6 iPS выживают в среде аллогенных BALB/c, а родительские клетки iPS - нет. Этот новый результат подтверждает, что гипоиммунные плюрипотентные клетки выживают при трансплантации тем, кто в противном случае был бы несовместимым хозяином.

Е. Дифференцировка мышинных клеток из клеток mHIP

Островковые клетки: клетки mHIP были дифференцированы в островковые клетки с использованием методик, адаптированных из Liu и др., *Exp. Diabetes Res* 2012: 201295 (doi: 10.1155/2012/201295), которая настоящим включена в настоящее описание в качестве ссылки и, в частности, для методов дифференцировки, изложенных там. Клетки iPS переносили во флаконы с желатиновым покрытием в течение 30 мин для удаления

фидерного слоя и высевали при 1×10^6 клеток на лунку в планшеты, покрытые коллагеном I, в среде DMEM/F-12 с добавлением 2 mM глутамина, 100 мкМ неосновных аминокислот, 10 нг/мл активина А, 10 mM никотинамида и 1 мкг/мл ламинина с 10% FBS в течение ночи. Затем клетки ES-D3 экспонировали со средой DMEM/F-12, дополненной 2 mM L-глутамином, 100 мкМ неосновных аминокислот, 10 нг/мл активина А, 10 mM никотинамида, 25 мкг/мл инсулина и 1 мкг/мл ламинина с 2% FBS в течение 6 дней.

Нейральные стволовые клетки: клетки mHIP были дифференцированы в нервные клетки с использованием методик, адаптированных из Abraches *et al.*, doi: 10.1371/journal.pone.0006286, которая настоящим включена в настоящее описание в качестве ссылки и, в частности, для методов дифференцировки, изложенных там. Для запуска протокола с монослоем ES-клетки высевали в бессывороточную среду ESGRO Complete Clonal Grade medium (Millipore) с высокой плотностью ($1,5 \times 10^5$ клеток/см²). Через 24 часа ES-клетки осторожно диссоциировали и высевали на 0,1% (об./об.) покрытый желатином культуральный планшет с концентрацией 1×10^4 клеток/см² в средах RHB-A или N2B27 (StemCell Science Inc.), меняя среду каждый следующий день. Для пересева на 4-й день клетки диссоциировали и высевали с концентрацией 2×10^4 клеток/см² на покрытый ламинином культуральный планшет в среде RHB-A с добавлением 5 нг/мл мышинового bFGF (Peprotech). С этого момента клетки пересевали в одних и тех же условиях каждый 4-й день, а среду меняли каждые 2 дня, в общей сложности 20 дней в культуре. Для количественного определения количества дифференцирующихся нейронов в каждый момент времени клетки высевали на покрытые ламинином стеклянные покровные стекла в 24-луночных планшетах Nunc и через 2 дня после посева среду меняли на смесь RHB-A:Neurobasal:B27 (1:1:0,02), чтобы обеспечить лучшее выживание дифференцированных нейронов.

Гладкомышечные клетки: Клетки mHIP дифференцировали в клетки SM с использованием методик, адаптированных из Huang *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* 2006: 351 (2) 321-7, которая

настоящим включена в настоящее описание в качестве ссылки и, в частности, для описанных там методов дифференцировки. Ресуспендированные iPSC культивировали на 6-луночных пластиковых чашках Петри с желатиновым покрытием (Falcon, Becton-Dickinson) с количеством 2 мил. клеток на лунку при 37 °C, 5% CO₂ в 2 мл среды для дифференцировки с присутствием 10 мкМ atRA, соответственно. Среда для дифференцировки состояла из DMEM, 15% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 1 мМ MTG (Sigma), 1% необязательных аминокислот, пенициллина и стрептомицина. Культуру вели в течение 10 дней с ежедневной заменой среды на свежую.

Начиная с 11-го дня, среду для дифференцировки заменяли на бессывороточную культуральную среду, которая состояла из нокаут-DMEM, 15% нокаут-сыворотки для замены, 2 мМ L-глутамин, 1 мМ MTG, 1% неосновных аминокислот, пенициллин и стрептомицин. Культуры вели в течение еще 10 дней с ежедневной заменой бессывороточной среды.

Кардиомиоциты: Клетки mNIP дифференцировали в клетки CM с использованием методик, адаптированных из Kattman *et al.*, *Cell Stem Cell* 8: 228-240 (2011), которая настоящим включена настоящим в качестве ссылки и, в частности, для методов дифференцировки, описанных там.

Эндотелиальные клетки: клетки mNIP были дифференцированы в эндотелиальные клетки, известным способом.

Ф. Пример 4. Аллогенная трансплантация производных клеток NIP демонстрирует долгосрочное выживание у полностью иммунокомпетентных реципиентов.

а. Мыши:

BALB/c (BALB/cAnNCr1, H2d), C57BL/6 (C57BL/6J, B6, H2b), BALB/c ню (BALB/c NU/NU, CAnN.CgFoxn1 <nu>/Cr1, H2d) и Scid beige (CBySmn.CB17-Prkdcscid/J) (все 6-12 недель) использовались в качестве реципиентов для различных анализов (возраст всех 6-12 недель). Количество животных на экспериментальную группу представлено на каждой фигуре. Мыши были приобретены в Charles River Laboratories (Зульцфельд, Германия) и получали гуманный

уход в соответствии с Руководством по принципам работы с лабораторными животными. Эксперименты на животных были одобрены гамбургским соглашением «Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz» и проводились в соответствии с местными и европейскими правилами.

b. Анализ плюрипотентности методом ОТ-ПЦР и IF:

miPSC высевали в 24-луночные планшеты и обрабатывали для ОТ-ПЦР и иммунофлуоресцентного (IF) анализа через 48 ч после посева. Для ICC клетки фиксировали, пермеабелизовали и блокировали с использованием набора для фиксации/пермеабелизации Image-iT™ (Thermo Fisher Cat. No., R37602). Клетки окрашивали в течение ночи при 4 °C первичными антителами к Sox2, SSEA-1, Oct4 и щелочной фосфатазе. После нескольких промывок клетки инкубировали с вторичным антителом AlexaFluor 488 и реагентом NucBlue Fixed Cell ReadyProbes (все Thermo Fisher Scientific). Окрашенные клетки визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Для ОТ-ПЦР РНК экстрагировали с использованием набора PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher кат. № 12183018A). Стадию ДНКазы I включали для удаления загрязняющей геномной ДНК. кДНК генерировали с использованием набора для обратной транскрипции высокоэффективной кДНК Applied Biosystems®. Контрольные образцы без обратной транскриптазы (без ОТ) также генерировали из всех образцов РНК. Ген-специфические праймеры использовали для амплификации последовательностей-мишеней с использованием AmpliTaq Go[®] 360 Master Mix (Thermo Fisher кат. № 4398876). Реакции ПЦР визуализировали на 2% агарозных гелях. Был включен набор праймеров для положительного контроля, которые амплифицируют конститутивно экспрессируемый ген домашнего хозяйства (Actb), который кодирует белок клеточного цитоскелета.

c. Редактирование генов мышинных iPSC:

miPSC подвергались 3 стадиям редактирования генов. Сначала CRISPR, нацеленные на кодирующую последовательность мышинного гена B2m, отжигали и лигировали в векторы, содержащие экспрессирующую кассету Cas9. Трансфецированные miPSC

диссоциировали на отдельные клетки, наращивали до колоний, секвенировали и тестировали на гомогенность. Во-вторых, эти B2m -/- miPSC были трансфецированы векторами, содержащими CRISPR, нацеленным на Ciita, главный регулятор молекул МНС II. Нарощенные колонии отдельных клеток секвенировали, и клоны B2m -/- Ciita -/- идентифицировали по наличию аберрантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. В-третьих, синтезировали последовательность гена Cd47, и ДНК клонировали в лентивирусную плазмиду с устойчивостью к бластидину. B2M -/- Ciita -/- miPSCs трансфецировали и наращивали в присутствии бластидина. Отселектированные на антибиотике пулы тестировали на сверхэкспрессию Cd47, и наращивали B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg miPSC. Анализы FACS продемонстрировали высокую экспрессию МНС I, умеренную, но детектируемую экспрессию МНС II и незначительную экспрессию Cd47 в wt miPSC. Отсутствие экспрессии МНС I, экспрессии МНС II и сверхэкспрессия Cd47 в ассоциированных созданных линиях miPSC были подтверждены. Все сконструированные линии miPSC тестировали на плюрипотентность. Это было подтверждено в B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg miPSC после 3 стадий конструирования и по их способности образовывать клетки из всех 3 зародышевых слоев.

d. Генерация B2m -/- miPSC:

Технология CRIPSR была использована для нокаута гена B2m. Для нацеливания на кодирующую последовательность гена β -2-микроглобулина (B2m) мыши последовательность 5'-TTCGGCTTCCCATTTCTCCGG (TGG)-3' CRISPR отжигают и лигируют в векторы All-In-One (AIO), содержащие экспрессирующую кассету Cas9 в соответствии с инструкциями набора (GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). miPSC трансфецировали векторами AIO с использованием электропорации Neon с двумя импульсами 1200В продолжительностью 20 мс. Трансфецированные культуры iPSC диссоциировали на отдельные клетки с использованием 0,05% трипсина (Gibco) и затем сортировали с помощью сортера клеток FACS Aria (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) для удаления дублетов и дебриса путем

селективного гейтинга при прямом и боковом рассеянии. Отдельные клетки наращивали до полноразмерных колоний и тестировали на редактирование CRISPR путем скрининга на наличие aberrантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. Вкратце, последовательность-мишень амплифицировали с помощью ПЦР с использованием AmpliTaq Gold Mastermix (Applied Biosystems, Дармштадт, Германия) и праймеров B2m гДНК F: 5'-CTGGATCAGACATATGTGTTGGGA-3', R: 5'-GCAAAGCAGTTTTAAGTCCACAG-3. После очистки полученного продукта ПЦР (PureLink® Pro 96 PCR Purification Kit, Thermo Fisher) проводили секвенирование методом Сэнгера. С помощью секвенирования Ion Personal Genome Machine (PGM) для идентификации гомогенности амплифицировали с помощью ПЦР область 250 п.о. гена B2m с использованием праймеров B2m gDNA PGM F: 5'-TTTTCAAAATGTGGGTAGACTTTGG-3' и R: 5'-GGATTTCAATGTGAGGG-3'. Продукт ПЦР очищали, как описано ранее, и получали, используя набор Ion PGM Hi-Q Template Kit (Thermo Fisher). Эксперименты проводили на системе Ion PGM™ с набором Ion 318™ Chip Kit v2 (Thermo Fisher). Снова выполняли анализ на плюрипотентность.

Не наблюдали пониженной скорости роста или способности дифференцировки B2m -/- iPSC, как сообщалось ранее в данной области.

е. Генерация B2m -/- и Ciita -/- miPSC:

Технологию CRIPSR использовали для дополнительного нокаута гена Ciita. Для нацеливания на кодирующую последовательность мышинного гена Ciita последовательность CRISPR 5'-GGTCCATCTGGTCATAGAGG(CGG)-3' отжигали и лигировали в векторы All-In-One (AIO), содержащие экспрессирующую кассету Cas9, согласно инструкциям набора (GeneArt). CRISPR Nuclease Vector Kit, Thermo Fischer, Waltham, MA). miPSC трансфецировали векторами AIO, используя то же условие для B2m-KO. Трансфецированные культуры iPSC диссоциировали на отдельные клетки с использованием 0,05% трипсина (Thermo Fisher-Gibco) и затем сортировали с помощью сортера клеток FACS Aria™ (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ) для удаления дублетов и дебриса

путем селективного гейтинга при прямом и боковом рассеянии. Отдельные клетки наращивали до полноразмерных колоний и тестировали на редактирование CRISPR путем скрининга на наличие aberrантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. Вкратце, последовательность-мишень амплифицировали с помощью ПЦР с использованием AmpliTaq Gold Mastermix (Thermo Fisher Applied Biosystems, Дармштадт, Германия) и праймеров Ciita gDNA F: 5'-CCCCAGAACGATGAGCTT-3', R: 5'-TGCAGAAGTCCTGAGAAGGCC-3'. После очистки полученного продукта ПЦР (PureLink® Pro 96 PCR Purification Kit, Thermo Fisher) проводили секвенирование методом Сэнгера. С использованием хроматограммы последовательности ДНК отредактированные клоны затем идентифицировали по наличию aberrантной последовательности из сайта расщепления CRISPR. Размер вставки/делеции рассчитывали с помощью инструмента TIDE. ПЦР и ICC выполняли снова, чтобы проверить статус плюрипотентности клеток.

f. Генерация B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg miPSC:

Клеточная линия B2m-KO, Ciita-KO и Cd47-tg iPSC была получена путем селекции по устойчивости к антибиотикам после опосредованной лентивирусом доставки экспрессирующего вектора Cd47, содержащего кассету устойчивости к антибиотик Бластицидин. Синтезировали последовательность гена Cd47, и ДНК клонировали в плазмиду Lentivirus pLenti6/V5 (ThermoFisher) с устойчивостью к бластицидину. Секвенирование по Сэнгеру выполняли, чтобы проверить, что никакой мутации не произошло. Генерацию лентивируса проводили с исходным титром 1×10^7 TE/мл. Трансдукцию осуществляли в 2×10^5 B2m -/- Ciita -/- miPSC, выращенных на устойчивых к бластицидину клетках MEF в течение 72 часов с отношением MOI 1:10 с последующей селекцией на антибиотиках с 12,5 мкг/мл бластицидина в течение 7 дней. Отселектированные на антибиотике пулы тестировали путем ОТ-кПЦР-амплификации мРНК Cd47 и проточной цитометрии с детектированием Cd47. После подтверждения экспрессии Cd47 клетки наращивали и подтверждали с помощью анализа плюрипотентности.

g. Модификация и характеристика эндотелиальных клеток,

полученных из iPSC:

iEC были получены с использованием трехмерного подхода. Вкратце, для инициации дифференцировки iPSC культивировали в ультранизких неадгезивных чашках с образованием агрегатов эмбриоидного тела (EB) в среде EBM2 (Lonza) в отсутствие фактора, ингибирующего лейкоз (LIF). Через 4 дня суспензионного культивирования EB повторно помещали на чашки с 0,2% желатином и культивировали в среде EBM2 с добавлением VEGF-A165 (50 нг/мл; ReproTech). Через 3 недели дифференцировки суспензии отдельных клеток получали с использованием буфера для диссоциации клеток (Life Technologies) и метили антителами к мышному CD31, конъюгированными с APC (eBiosciences) и антителами к мышному CD144, конъюгированному с PE (BD Biosciences). iEC были очищены с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) популяции CD31⁺ CD144⁺. iEC поддерживались в среде EBM2, дополненной рекомбинантным фактором роста эндотелия сосудов мыши (50 нг/мл).

Их фенотип подтверждали иммунофлуоресценцией на CD31 и VE кадгерин, а также с помощью ПЦР и анализов образования трубок для демонстрации эндотелиальной функции с образованием предшественников зрелых сосудистых структур. Примечание: протоколы дифференцировки с использованием конфлуентных монослоев iPSC на 0,1% желатине или матрикеле также были успешными. Примечание: другие среды эндотелиальных клеток также были успешно использованы.

h. Модификация и характеристика гладкомышечных клеток (iSMC), полученных из iPSC:

Ресуспендированные iPSC культивировали на 6-луночных пластиковых чашках Петри с 0,1% желатиновым покрытием (Falcon, Becton-Dickinson) с 2 млн. клеток на лунку при 37 °C, 5% CO₂ в 2 мл среды для дифференцировки в присутствии 10 мкМ. Среда для дифференцировки состояла из DMEM, 15% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ MTG (Sigma), 1% неосновных аминокислот, пенициллина и стрептомицина. Культуру вели в течение 10 дней с ежедневными сменами среды.

Начиная с 11-го дня, среду для дифференцировки заменяли на бессывороточную культуральную среду, которая состояла из нокаут-DMEM, 15% нокаут-сыворотки для замены, 2 mM L-глутамина, 1 mM MTG, 1% неосновных аминокислот, пенициллин и стрептомицин. Культуры вели в течение еще 10 дней с ежедневной заменой бессывороточной среды. Фенотип был подтвержден с помощью иммунофлюоресценции и ПЦР для SMA и SM22.

i. Получение и характеристика кардиомиоцитов (iCM), полученных из iPSC:

Перед дифференцировкой iPSC пассировали два раза на чашках, покрытых желатином, для удаления фидерных клеток. Вкратце, iPSC диссоциировали с TrypLE (Invitrogen) и культивировали в количестве 75000-100000 клеток/мл без каких-либо дополнительных факторов роста в течение 48 часов. 3-дневные EB были диссоциированы, а клетки дифференцированы в «сердечных условиях». Вкратце, 6×10^4 - 10×10^4 клеток высевали в отдельные лунки 96-луночного планшета с плоским дном (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), покрытого желатином, в среде StemPro-34 SF (Invitrogen), дополненной 2 mM L-глутамином, 1 mM аскорбиновой кислоты (Sigma), VEGF человека (5 нг/мл), DKK1 человека (150 нг/мл), bFGF человека (10 нг/мл) и FGF10 человека (12,5 нг/мл) (R & D Systems). Культуры собирали через 4 или 5 дней (всего 7 или 8 дней).

Их фенотип подтверждали IF для тропонина I и саркомерного альфа-актинина, а также ПЦР для Gata4 и Mhy6. Клетки начинали пульсировать через 8-10 дней. Это продемонстрировало их функциональную дифференцировку.

j. Получение и характеристика островковых клеток (iIC), полученных из iPSC

Клетки iPS переносили во флаконы с желатиновым покрытием в течение 30 мин для удаления фидерного слоя и высевали по 1×10^6 клеток на лунку в планшеты, покрытые коллагеном I, в среде DMEM/F-12 с добавлением 2 mM глутамина, 100 мкМ неосновных аминокислот, 10 нг/мл активина A, 10 mM никотинамида и 1 мкг/мл ламинина с 10% FBS в течение ночи. Затем клетки ES-D3

экспонировали со средой DMEM/F-12, дополненной 2 mM L-глутамином, 100 мкМ неосновных аминокислот, 10 нг/мл активина А, 10 mM никотинамида, 25 мкг/мл инсулина и 1 мкг/мл ламинин с 2% FBS в течение 6 дней. Их фенотип был подтвержден иммунофлюоресценцией для с-пептида, ПЦР для глюкагона, Ngn3, амилазы, инсулина 2, соматостатина и продуцированием инсулина.

к. Получение и характеристика нейронных клеток (iNC)

Для запуска монослойного протокола iPSC аккуратно диссоциировали и высевали на 0,1% покрытый желатином пластик для тканевых культур при 1×10^4 клеток/см² в средах RHB-A или N2B27 (StemCell Science Inc.), меняя среду через день. Для пересева на 4-й день клетки диссоциировали и высевали в концентрации 2×10^4 клеток/см² на покрытый ламинином пластик для тканевых культур в среде RHB-A с добавлением 5 нг/мл мышинного bFGF (Peprotech). С этого момента клетки пересевали в одних и тех же условиях каждый 4-й день, а среду меняли каждые 2 дня, в общей сложности 20 дней в культуре. Для количественного определения количества дифференцированных нейронов в каждый момент времени клетки высевали на покрытые ламинином стеклянные покровные стекла в 24-луночных планшетах Nunc и через 2 дня после посева среду меняли на смесь RHB-A:Neurobasal:B27 (1:1:0,02), чтобы обеспечить лучшее выживание дифференцированных нейронов. Их фенотип был подтвержден IF для TuJ-1 и нестина.

1. Анализы Elispot

Для однонаправленных анализов иммуноферментных пятен (Elispot) спленоциты-реципиенты выделяли из свежей селезенки через 5 дней после инъекции клеток (miPSC, miPSC B2m -/- или miPSC B2m -/- Ciita -/- или miPSC B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg) и использовали в качестве клеток-респондеров. Донорские клетки (miPSC, miPSC B2m -/- или miPSC B2m -/- Ciita -/- или miPSC B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg) ингибировали митомицином, и они служили клетками-стимуляторами. 10^6 клеток-стимуляторов инкубировали с 5×10^5 спленоцитов-реципиентов в течение 24 ч, и частоту пятен IFN γ и IL-4 автоматически подсчитывали с использованием ридера для планшетов Elispot. Четырехкратные повторы проводили во всех

анализах.

м. Анализ тератомы для изучения выживаемости iPSC *in vivo*

Шестинедельных сингенных или аллогенных мышей использовали для трансплантации wt iPSC или неиммуногенных iPSC. 1×10^6 клеток инъецировали в объеме в 100 мкл в правую мышцу бедра мышей. Животных, подвергнутых трансплантации, обычно наблюдали через день, а рост опухоли измеряли штангенциркулем. Их умерщвляли после развития опухолей размером более 1,5 см³ или после периода наблюдения 100 дней.

н. анализы NK-клеток *in vitro*

Экспрессию CD107 на NK-клетках после совместного культивирования с wt iPSC или HIP-клетками измеряли с помощью проточной цитометрии в виде маркера активации NK-клеток. Используя принцип Elispot, NK-клетки совместно культивировали с wt iPSC или HIP-клетками и измеряли высвобождение ими IFN- γ .

В соответствии с «отсутствием собственной теории» было показано, что стволовые клетки с дефицитом MHC I чувствительны к NK-клеточному уничтожению, поскольку PSC как мыши, так и человека экспрессируют лиганды для активации рецепторов NK. Хотя экспрессия активирующих рецепторов, как сообщается, уменьшается с дифференцировкой, наблюдается NK-уничтожение B2m -/- производных. Хотя выделенная экспрессия HLA-E или HLA-G в плюрипотентных стволовых клетках человека использовалась для смягчения ожидаемого врожденного иммунного ответа в HLA I -/- клетках, среди них есть очень эффективные дополнительные ингибирующие не-MHC лиганды. Изобретение предусматривает, что Cd47, как было обнаружено, оказался неожиданно мощным ингибитором врожденного иммунного клиренса.

о. Сводка данных для мыши

Все сконструированные линии miPSC трансплантировали сингенным C57BL/6 и аллогенным реципиентам BALB/c без какой-либо иммуносупрессии. Хотя все сконструированные клетки одинаково развивали тератомы у сингенных реципиентов, их выживаемость зависела от уровня их гипоиmuногенности у аллогенных реципиентов. Наблюдалось образование 60% тератом клетками B2m -

/- miPSC у BALB/c, слабый ответ Elispot и измеряемый ответ антител IgM. В B2m -/- Ciita -/- miPSC образование 91,7% тератомы у аллогенных BALB/c, незначительный ответ Elispot, и никакого ответа антител не наблюдали. Конечная линия miPSC B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg показала 100% образование тератомы и отсутствие ответов Elispot или антител. Вклад сверхэкспрессии Cd47 дополнительно оценивали в анализах врожденного иммунитета путем сравнения B2m -/- Ciita -/- miPSC с B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg miPSC. Сверхэкспрессия Cd47 значительно снижала экспрессию CD107 в NK-клетках и высвобождение IFN- γ в NK-клетках, снижая тем самым врожденный иммунный клиренс. Таким образом, каждая стадия конструирования делала miPSC более гипоиммуногенными.

B2m -/- Ciita -/- HIP клетки дифференцируются в гипоиммуногенные клетки, подобные эндотелиальным (miEC), гладкомышечные клетки (miSMC) и кардиомиоцитоподобные клетки (miCM). Производные miPSC «дикого типа» (т.е. из не сконструированных miPSC) служили в качестве контролей. Все производные показали типичный морфологический внешний вид, иммунофлуоресценцию маркеров клеток и экспрессию генов предполагаемых линий клеток зрелой ткани. Экспрессия молекул МНС I и II в производных дикого типа обычно в значительной степени была повышена по сравнению с их родительской линией miPSC, но заметно варьировалась в зависимости от типа клеток. Как и ожидалось, miEC обладали самой высокой экспрессией МНС I и МНС II, miSMC имели умеренную экспрессию МНС I и МНС II, тогда как miCM имели умеренную экспрессию МНС I, но очень низкую экспрессию МНС II. Все производные wt имели довольно низкую экспрессию Cd47, хотя и слегка повышенную по сравнению с miPSC. Все производные B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg, соответственно, показали полное отсутствие МНС I и МНС II и значительно более высокий уровень Cd47, чем их аналоги дикого типа.

Пробки Matrigel, содержащие 5×10^5 MiEC дикого типа, miSMC и miCM, трансплантировали в подкожные мешочки сингенных C57BL/6 или аллогенных мышей BALB/c. Через 5 дней у всех аллогенных реципиентов наблюдался сильный клеточный иммунный ответ, а также

сильный иммунный ответ IgM против этих дифференцированных трансплантатов клеток wt. В противоположность этому ни один из соответствующих производных B2m -/- Ciita -/- Cd47 tg (HIP) не обнаружил заметного увеличения частот IFN- γ Elispot или продуцирования антител IgM.

Морфология трансплантированных клеток также была подтверждена. Аллогенных мышей помещали в индукционную камеру и анестезию индуцировали 2% изофлураном (Isothesia, Butler Schein). 1 млн. клеток, или miPSC-производных кардиомиоцитов (miCM), miPSC-производных гладкомышечных клеток (miSMC) или miPSC-производных эндотелиальных клеток (miEC) в 250 мкл 0,9% физиологического раствора, смешивали с 250 мкл Матригеля BD высокой концентрации (1:1) BD Biosciences) и вводили подкожно в нижнюю часть спины мышей с помощью шприца 23-G. Пробки с матригелем эксплантировали через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 и 12 недель после имплантации и фиксировали 4% параформальдегидом и 1% глутенальдегидом в течение 24 часов с последующей дегидратацией и погружением в парафин. Срезы толщиной 5 мкм разрезали и окрашивали гематоксилином и эозином (ОН). Гистология подтвердила морфологически адекватные miCM, miSMC и miEC.

G. Пример 5: Генерация iPSC человека

Линия человеческих эписомных клеток iPSC (кат. № A33124, Thermo Fisher Scientific) была получена из пуповинной крови CD34+с использованием эписомной системы EBNA из ThermoFisher на основе трех плазмид, семи факторов (SOKMNLТ; SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28, и SV40L Т антиген). Считается, что эта линия iPSC обладает нулевым узнаванием, поскольку в событии перепрограммирования не было интеграции в геном. Было показано, что она свободна от всех генов перепрограммирования. iPSC имеют нормальный XX-кариотип и эндогенную экспрессию плюрипотентных маркеров, таких как Oct4, Sox2, Nanog (как показано с помощью RT-PCR), Oct4, SSEA4, TRA-1-60 и TRA-1-81 (как показано ICC). В анализе направленной дифференцировки и анализе тератомы эти hiPSC сохранили свой потенциал дифференцировки для эктодермальных, энтодермальных и

мезодермальных линий. Кроме того, сосудистые, эндотелиальные и сердечные линии были получены с высокой эффективностью.

Примечание: успешно использовались несколько средств доставки генов для генерации iPSC, включая ретровирусные векторы, аденовирусные векторы, на основе вируса Сендай, а также безвирусные методы перепрограммирования (с использованием эписомных векторов, транспозона piggyBac, синтетических мРНК, микроРНК, рекомбинантных белков и низкомолекулярных лекарственных средств и т. д.).

Примечание: Для перепрограммирования были успешно использованы различные факторы, такие как первая сообщенная комбинация OCT3/4, SOX2, KLF4 и C-MYC, известные как факторы Yamanaka. В одном варианте осуществления только три из этих факторов были успешно объединены и не использован C-MYC, хотя с пониженной эффективностью перепрограммирования.

В одном варианте осуществления L-MYC или GLIS1 вместо C-MYC показали улучшенную эффективность перепрограммирования. В другом варианте осуществления факторы перепрограммирования не ограничиваются генами, связанными с плюрипотентностью.

а. Статистика

Все данные выражены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение или в виде графиков box plot, показывающих медиану и диапазон от минимума до максимума. Межгрупповые различия были соответствующим образом оценены с помощью непарного t-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием postHoc-теста Бонферрони. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Н. Пример 6: Генерация клеток НР человека

Человеческие Cas9 iPSC подвергались 2 стадиям редактирования генов. На первой стадии технологию CRISPR осуществляли комбинированным нацеливанием на кодирующую последовательность гена бета-2-микроглобулина человека (B2M) последовательности CRISPR 5'-CGTGAGTAAACCTGAATCTT-3' и на кодирующую последовательность гена CIITA человека последовательности CRISPR 5'-GATATTGGCATAAGCCTCCC-3'. Линеаризованную последовательность CRISPR с промотором T7

использовали для синтеза gРНК в соответствии с инструкциями набора (MEGAscript T7 Transcription Kit, Thermo Fisher). Собранную *in vitro* транскрипционную (IVT) gРНК затем очищали с помощью набора для очистки транскрипции MEGAclear. Для доставки IVT gРНК выделенные клетки подвергали электропорации с 300 нг IVT gРНК с использованием системы электропорации Neon. После электропорации отредактированные Cas9 iPSC наращивали для посева отдельных клеток: культуры iPSC диссоциировали на отдельные клетки с использованием TrypLE (Gibco) и окрашивали Tra1-60 Alexa Fluor® 488 и йодидом пропидия (PI). Сортиер клеток FACS Aria (BD Biosciences) был использован для сортировки, а дублеты и дебрис были исключены из посева путем селективного гейтинга при прямом и боковом рассеивании. Жизнеспособные плюрипотентные клетки отбирали при отсутствии PI и наличии окрашивания Tra1-60 Alexa Fluor 488. Отдельные клетки затем наращивали в полноразмерные колонии, после чего колонии проверяли на редактирование CRISPR. Опосредованное CRISPR расщепление оценивали с использованием набора для определения геномного расщепления GeneArt (Thermo Fisher). Геномную ДНК выделяли из 1×10^6 hiPSC, а области геномной ДНК B2M и CIITA амплифицировали с помощью ПЦР с использованием мастер-смеси AmpliTaq Gold 360 и наборов праймеров F: 5'-TGGGGCCAAATCATGTAGACTC-3' и R: 5'-TCAGTGGGGGTGAATTCAAGTGT-3' а также F: 5'-CTTAACAGCGATGCTGACCCC-3' и R: 5'-TGGCCTCCATCTCCCCTCTCTT-3' для CIITA. Для анализа TIDE полученный продукт ПЦР очищали (PureLink PCR Purification Kit, Thermo Fisher), и выполняли секвенирование по Сэнгеру для прогнозирования частоты вставок/делеций. После подтверждения нокаута B2M/CIITA клетки были дополнительно охарактеризованы с помощью анализа кариотипа и панели показателей TaqMan hPSC (Thermo Fisher). Было обнаружено, что PSC являются плюрипотентными и поддерживают нормальный (46, XX) кариотип во время процесса редактирования генома.

На второй стадии синтезировали ген CD47, и ДНК клонировали в плазмиду лентивируса с промотором EF1a и устойчивостью к пурамицину. Клетки трансдуцировали лентивирусными концентратами

1×10^7 ТЕ/мл и 6 мкг/мл полибрена (Thermo Fisher). Среду меняли ежедневно после трансдукции. Через три дня после трансдукции клетки наращивали и селектировали с помощью 0,5 мкг/мл пуромицина. Через 5 дней селекции на антибиотиках появились устойчивые к антибиотикам колонии, которые дополнительно наращивали для создания стабильных пулов. Уровень CD47 подтверждали кПЦР. Анализ плюрипотентности (TaqMan hPSC Scorecard Panel, Thermo Fisher) и кариотипирование снова проводили, чтобы проверить плюрипотентный статус клеток.

1. Пример 7: Дифференцировка человеческих hIP-клеток

1. Дифференцировка клеток hIP в кардиомиоциты человека

Это было сделано с использованием протокола, адаптированного из Sharma et al., *J. Vis Exp.* 2015 doi: 10.3791/52628, которая настоящим включена в качестве ссылки и конкретно для методов дифференцировки клеток. hiPSC высевали на разбавленный Matrigel (356231, Corning) в 6-луночные планшеты и хранили в среде Essential 8 Flex (Thermo Fisher). После того, как клетки достигли 90% конfluентности, начиналась дифференцировка, и среду заменяли на 5 мл RPMI1640, содержащую 2% В-27 без инсулина (оба Gibco) и 6 мкМ CHIR-99021 (Selleck Chem). Через 2 дня среду заменяли на RPMI1640, содержащую 2% В-27 без инсулина, без CHIR. На третий день 5 мкл IWR1 добавляли в среду еще на два дня. На 5 день среду заменяли обратно на RPMI 1640, содержащую 2% В-27 без инсулиновой среды, и инкубировали в течение 48 часов. На 7 день среду заменяли на RPMI 1640, содержащую В27 плюс инсулин (Gibco), и меняли каждые 3 дня после этого на одну и ту же среду. Спонтанное пульсирование кардиомиоцитов было впервые видно приблизительно с 10 по 12 день. Очистку кардиомиоцитов проводили на 10-й день после дифференцировки. Вкратце, среду заменяли на среду с низким содержанием глюкозы и поддерживали в течение 3 дней. На 13-й день среду заменяли на RPMI 1640, содержащую В27 плюс инсулин. Эту процедуру повторяли на 14 день. Остальные клетки являются высокоочищенными кардиомиоцитами.

2. Дифференцировка hIP-клеток в эндотелиальные клетки

человека

hiPSC высевали на разбавленный Matrigel (356231, Corning) в 6-луночные планшеты и поддерживали в среде Essential 8 Flex (Thermo Fisher). После того как клетки достигли 60% конфлуентности, начиналась дифференцировка, и среду заменяли на RPMI1640, содержащую 2% B-27 без инсулина (оба Gibco) и 5 мкМ CHIR-99021 (Selleck Chem). На 2-й день среду заменяли на обедненную среду: RPMI1640, содержащую 2% B-27 без инсулина (оба Gibco) и 2 мкМ CHIR-99021 (Selleck Chem). С 4 по 7 день клетки подвергали воздействию среды RPMI EC, RPMI1640, содержащей 2% B-27 минус инсулин плюс 50 нг/мл эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF; R & D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США), 10 нг/мл основного фактора роста фибробластов (FGFb; R & D Systems), 10 мкМ Y-27632 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и 1 мкМ SB 431542 (Sigma-Aldrich). Кластеры эндотелиальных клеток были видны с 7-го дня, и клетки содержались в среде EGM-2 SingleQuots (Lonza, Базель, Швейцария) плюс 10% FCS hi (Gibco), фактор роста эндотелия сосудов 25 нг/мл (VEGF; R & D Systems, Minneapolis, MN, США), 2 нг/мл основного фактора роста фибробластов (FGFb; R & D Systems), 10 мкМ Y-27632 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и 1 мкМ SB 431542 (Sigma-Aldrich). Процесс дифференцировки завершается через 14 дней, и недифференцированные клетки откреплялись во время процесса дифференцировки. Для очистки клетки прошли процесс MACS в соответствии с протоколом изготовителя с использованием микрогранул CD31 (Miltenyi, Auburn, CA). Высокоочищенные EC-клетки культивировали в среде EGM-2 SingleQuots (Lonza, Basel, Швейцария) плюс добавки и 10% FCS hi (Gibco). TrypLE использовали для пассирования клеток 1:3 каждые 3-4 дня.

Ж. Трансплантация у гуманизированных мышей

Гуманизированных мышей NSG-SGM3 помещали в индукционную камеру и анестезию индуцировали 2% изофлураном (Isothesia, Butler Schein). 1 млн. клеток, либо hiPSC-производных кардиомиоцитов (hiCM), либо hiPSC-производных эндотелиальных клеток (hiEC) в 250 мкл 0,9% физиологического раствора, содержащего ZVAD (100 мМ, бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp (O-

метил)-фторметилкетон, Calbiochem), Bcl-XL BH4 (проникающий в клетки пептид TAT, 50 нМ, Calbiochem), циклоспорин А (200 нМ, Sigma), IGF-1 (100 нг/мл, Reprotech) и пинацидил (50 мМ, Sigma) смешивали с 250 мкл Матригеля BD высокой концентрации (1: 1; BD Biosciences) и вводили подкожно в нижнюю часть спины мышей с помощью шприца 23-G. Пробки с матригелем эксплантировали через 2, 4, 6, 8, 10 и 12 недель после имплантации и фиксировали 4% параформальдегидом и 1% глутенальдегидом в течение 24 часов с последующей дегидратацией и погружением в парафин. Срез толщиной 5 мкм разрезали и окрашивали гематоксилином и эозином (HE) и морфологию подтверждали.

IX. Иллюстративные последовательности:

SEQ ID NO: 1 - β -2-микроглобулин человека

MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDL
LKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDI

SEQ ID NO: 2 - белок CIITA человека, 160-аминокислотный N-конец

MRCLAPRPAGSYLSEPQGSSQCATMELGPLEGGYLELLNSDADPLCLYHFYDQMDLAGE
EEIELYSEPDTDTINCDQFSRLLCDMEGDEETREAYANIAELDQYVFQDSQLEGLSKDIFKHIG
PDEVIGESMEMPAEVLGQKSQKRPFPPEELPADLKHWP

SEQ ID NO: 3 - CD47 человека

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKWK
FKGRDIYTFDGA LNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTREG
ETIIE LKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALLVAGLVIT
VIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYVVFSTAIGLTSFVIAILVIQVIAIYL
AVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVE

SEQ ID NO: 4 - тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSV-tk)

MASYPCHQHASAFDQAARSRGHSNRRTALRPRRQGEATEVRLEQKMPTLLRVYIDGPHG
MGKTTTTQLLVALGSRDDIVYVPEPMTYWQVLGASETIANIYTTQHRLDQGEISAGDAVMTS
AQITMGMPYAVTDAVLAPHVGGEAGSSHAPPPALTIFDRHPAALLCYPARYLMGSMTPQAV
LAFVALIPPTLPGTNIVLGALPEDRHIDRLAKRQRPGERLDLAMLAAIRRVYGLLANTVRYLQG
GGSWWEDWGQLSGTAVPPQGAEPQSNAGPRPHIGDTLFTLFRAPPELLAPNGDLYNVFAWALDVL
AKRLRPMHVFILDYDQSPAGCRDALLQLTSGMVQTHVTTTPGSIPTICDLARTFAREMGEAN

SEQ ID NO: 5 - Цитозин-дезаминаза *Escherichia coli* (EC-CD)

MSNNALQTIINARLPGEGLWQIHLQDGKISIDAQSGVMPITENSLDAEQGLVIPPFV

EPHIHLDTTQTAGQPNWNQSGTLFEGIERWAERKALLTHDDVKQRAWQTLKWQIANGIQHVRTH
 VDVSDATLTALKAMLEVKQEVAPWIDLQIVAFPQEGILSYPNGEALLEEALRLGADVVGAI PHF
 EFTREYGVESLHKT FALAQKYDRLIDVHCDEIDDEQSRFVETVAALAHHEGMGARVTASHTTAM
 HSYNGAYTSRLFRLLKMSGINFVANPLVNIHLQGRFDITYPKRRGITRVKEMLESGINVCFGHDD
 VFDPWYPLGTANMLQVLHMGLHVCQLMGYGQINDGLNLITHHSARTLNLQDYGIAAGNSANLII
 LPAENGFDALRRQVPVRYSVRGGKVIASQTQPAQTTVYLEQPEAIDYKR

SEQ ID NO: 6 – Укороченная каспаза 9 человека

GFGDVGALESLRGNADLAYILSMEPCGHCLIINNWNFCRESGLRTRTGSNIDCEKLRRR
 FSSLHFMVEVKGDLTAKKMVLALLELAQQDHGALDCCVVVILSHGCQASHLQFPGAVYGTGCP
 VSVEKIVNIFNGTSCPSLGGKPKLFFIQACGGEQKDHGFEVASTSPEDESPGSNPEPDATPFQE
 GLRTFDQLDAISSLPTPSDIFVSYSTFPGFVSWRDPKSGSWYVETLDDIFEQWAHSEDLQSLLL
 RVANAVSVKGIYKQMPGCFNFLRKKLFFKTS

Все публикации и патентные документы, раскрытые или упомянутые в настоящем описании, включены в качестве ссылки в полном объеме. Вышеприведенное описание было представлено только в целях иллюстрации и описания. Это описание не предназначено для ограничения изобретения точной раскрытой формой. Подразумевается, что объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> ИММУНОСКОНСТРУИРОВАННЫЕ ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ

<130> RUC005W

<140> PCT/US2018/013688

<141> 2018-01-14

<150> 62/445,969

<151> 2017-01-13

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Ser	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser
1				5					10					15	

Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Gln	Arg	Thr	Pro	Lys	Ile	Gln	Val	Tyr	Ser	Arg
			20					25					30		

His	Pro	Ala	Glu	Asn	Gly	Lys	Ser	Asn	Phe	Leu	Asn	Cys	Tyr	Val	Ser
		35					40					45			

Gly	Phe	His	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Val	Asp	Leu	Leu	Lys	Asn	Gly	Glu
	50					55					60				

Arg	Ile	Glu	Lys	Val	Glu	His	Ser	Asp	Leu	Ser	Phe	Ser	Lys	Asp	Trp
65					70					75					80

Ser	Phe	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Tyr	Thr	Glu	Phe	Thr	Pro	Thr	Glu	Lys	Asp
			85						90					95	

Glu	Tyr	Ala	Cys	Arg	Val	Asn	His	Val	Thr	Leu	Ser	Gln	Pro	Lys	Ile
			100					105						110	

Val	Lys	Trp	Asp	Arg	Asp	Ile
						115

<210> 2

<211> 160

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Arg	Cys	Leu	Ala	Pro	Arg	Pro	Ala	Gly	Ser	Tyr	Leu	Ser	Glu	Pro
1				5					10					15	

Gln Gly Ser Ser Gln Cys Ala Thr Met Glu Leu Gly Pro Leu Glu Gly
20 25 30

Gly Tyr Leu Glu Leu Leu Asn Ser Asp Ala Asp Pro Leu Cys Leu Tyr
35 40 45

His Phe Tyr Asp Gln Met Asp Leu Ala Gly Glu Glu Glu Ile Glu Leu
50 55 60

Tyr Ser Glu Pro Asp Thr Asp Thr Ile Asn Cys Asp Gln Phe Ser Arg
65 70 75 80

Leu Leu Cys Asp Met Glu Gly Asp Glu Glu Thr Arg Glu Ala Tyr Ala
85 90 95

Asn Ile Ala Glu Leu Asp Gln Tyr Val Phe Gln Asp Ser Gln Leu Glu
100 105 110

Gly Leu Ser Lys Asp Ile Phe Lys His Ile Gly Pro Asp Glu Val Ile
115 120 125

Gly Glu Ser Met Glu Met Pro Ala Glu Val Gly Gln Lys Ser Gln Lys
130 135 140

Arg Pro Phe Pro Glu Glu Leu Pro Ala Asp Leu Lys His Trp Lys Pro
145 150 155 160

<210> 3

<211> 293

<212> БЕЖОК

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
130 135 140

Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
145 150 155 160

Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
165 170 175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
180 185 190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
195 200 205

Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
210 215 220

Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
225 230 235 240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
275 280 285

Met Lys Phe Val Glu
290

<210> 4

<211> 376

<212> БЕЛОК

<213> Вирус простого герпеса

<400> 4

Met Ala Ser Tyr Pro Cys His Gln His Ala Ser Ala Phe Asp Gln Ala
1 5 10 15

Ala	Arg	Ser	Arg	Gly	His	Ser	Asn	Arg	Arg	Thr	Ala	Leu	Arg	Pro	Arg	20	25	30	
Arg	Gln	Gln	Glu	Ala	Thr	Glu	Val	Arg	Leu	Glu	Gln	Lys	Met	Pro	Thr	35	40	45	
Leu	Leu	Arg	Val	Tyr	Ile	Asp	Gly	Pro	His	Gly	Met	Gly	Lys	Thr	Thr	50	55	60	
Thr	Thr	Gln	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Arg	Asp	Asp	Ile	Val	Tyr	65	70	75	80
Val	Pro	Glu	Pro	Met	Thr	Tyr	Trp	Gln	Val	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Thr	85	90	95	
Ile	Ala	Asn	Ile	Tyr	Thr	Thr	Gln	His	Arg	Leu	Asp	Gln	Gly	Glu	Ile	100	105	110	
Ser	Ala	Gly	Asp	Ala	Ala	Val	Val	Met	Thr	Ser	Ala	Gln	Ile	Thr	Met	115	120	125	
Gly	Met	Pro	Tyr	Ala	Val	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Ala	Pro	His	Val	Gly	130	135	140	
Gly	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	His	Ala	Pro	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	145	150	155	160
Phe	Asp	Arg	His	Pro	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Pro	Ala	Ala	Arg	165	170	175	
Tyr	Leu	Met	Gly	Ser	Met	Thr	Pro	Gln	Ala	Val	Leu	Ala	Phe	Val	Ala	180	185	190	
Leu	Ile	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Gly	Thr	Asn	Ile	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	195	200	205	
Pro	Glu	Asp	Arg	His	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Lys	Arg	Gln	Arg	Pro	Gly	210	215	220	
Glu	Arg	Leu	Asp	Leu	Ala	Met	Leu	Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	Val	Tyr	Gly	225	230	235	240
Leu	Leu	Ala	Asn	Thr	Val	Arg	Tyr	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	Ser	Trp	Trp	245	250	255	
Glu	Asp	Trp	Gly	Gln	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Val	Pro	Pro	Gln	Gly	Ala	260	265	270	

Glu Pro Gln Ser Asn Ala Gly Pro Arg Pro His Ile Gly Asp Thr Leu
275 280 285

Phe Thr Leu Phe Arg Ala Pro Glu Leu Leu Ala Pro Asn Gly Asp Leu
290 295 300

Tyr Asn Val Phe Ala Trp Ala Leu Asp Val Leu Ala Lys Arg Leu Arg
305 310 315 320

Pro Met His Val Phe Ile Leu Asp Tyr Asp Gln Ser Pro Ala Gly Cys
325 330 335

Arg Asp Ala Leu Leu Gln Leu Thr Ser Gly Met Val Gln Thr His Val
340 345 350

Thr Thr Pro Gly Ser Ile Pro Thr Ile Cys Asp Leu Ala Arg Thr Phe
355 360 365

Ala Arg Glu Met Gly Glu Ala Asn
370 375

<210> 5

<211> 427

<212> БЕЖОК

<213> Escherichia coli

<400> 5

Met Ser Asn Asn Ala Leu Gln Thr Ile Ile Asn Ala Arg Leu Pro Gly
1 5 10 15

Glu Glu Gly Leu Trp Gln Ile His Leu Gln Asp Gly Lys Ile Ser Ala
20 25 30

Ile Asp Ala Gln Ser Gly Val Met Pro Ile Thr Glu Asn Ser Leu Asp
35 40 45

Ala Glu Gln Gly Leu Val Ile Pro Pro Phe Val Glu Pro His Ile His
50 55 60

Leu Asp Thr Thr Gln Thr Ala Gly Gln Pro Asn Trp Asn Gln Ser Gly
65 70 75 80

Thr Leu Phe Glu Gly Ile Glu Arg Trp Ala Glu Arg Lys Ala Leu Leu
85 90 95

Thr His Asp Asp Val Lys Gln Arg Ala Trp Gln Thr Leu Lys Trp Gln
100 105 110

Ile	Ala	Asn	Gly	Ile	Gln	His	Val	Arg	Thr	His	Val	Asp	Val	Ser	Asp	115	120	125
Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Leu	Lys	Ala	Met	Leu	Glu	Val	Lys	Gln	Glu	Val	130	135	140
Ala	Pro	Trp	Ile	Asp	Leu	Gln	Ile	Val	Ala	Phe	Pro	Gln	Glu	Gly	Ile	145	150	155
Leu	Ser	Tyr	Pro	Asn	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	165	170	175
Gly	Ala	Asp	Val	Val	Gly	Ala	Ile	Pro	His	Phe	Glu	Phe	Thr	Arg	Glu	180	185	190
Tyr	Gly	Val	Glu	Ser	Leu	His	Lys	Thr	Phe	Ala	Leu	Ala	Gln	Lys	Tyr	195	200	205
Asp	Arg	Leu	Ile	Asp	Val	His	Cys	Asp	Glu	Ile	Asp	Asp	Glu	Gln	Ser	210	215	220
Arg	Phe	Val	Glu	Thr	Val	Ala	Ala	Leu	Ala	His	His	Glu	Gly	Met	Gly	225	230	235
Ala	Arg	Val	Thr	Ala	Ser	His	Thr	Thr	Ala	Met	His	Ser	Tyr	Asn	Gly	245	250	255
Ala	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	Phe	Arg	Leu	Leu	Lys	Met	Ser	Gly	Ile	Asn	260	265	270
Phe	Val	Ala	Asn	Pro	Leu	Val	Asn	Ile	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Phe	Asp	275	280	285
Thr	Tyr	Pro	Lys	Arg	Arg	Gly	Ile	Thr	Arg	Val	Lys	Glu	Met	Leu	Glu	290	295	300
Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Cys	Phe	Gly	His	Asp	Asp	Val	Phe	Asp	Pro	Trp	305	310	315
Tyr	Pro	Leu	Gly	Thr	Ala	Asn	Met	Leu	Gln	Val	Leu	His	Met	Gly	Leu	325	330	335
His	Val	Cys	Gln	Leu	Met	Gly	Tyr	Gly	Gln	Ile	Asn	Asp	Gly	Leu	Asn	340	345	350
Leu	Ile	Thr	His	His	Ser	Ala	Arg	Thr	Leu	Asn	Leu	Gln	Asp	Tyr	Gly	355	360	365

Ile Ala Ala Gly Asn Ser Ala Asn Leu Ile Ile Leu Pro Ala Glu Asn
 370 375 380

Gly Phe Asp Ala Leu Arg Arg Gln Val Pro Val Arg Tyr Ser Val Arg
 385 390 395 400

Gly Gly Lys Val Ile Ala Ser Thr Gln Pro Ala Gln Thr Thr Val Tyr
 405 410 415

Leu Glu Gln Pro Glu Ala Ile Asp Tyr Lys Arg
 420 425

<210> 6
 <211> 282
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Gly Phe Gly Asp Val Gly Ala Leu Glu Ser Leu Arg Gly Asn Ala Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Tyr Ile Leu Ser Met Glu Pro Cys Gly His Cys Leu Ile Ile
 20 25 30

Asn Asn Val Asn Phe Cys Arg Glu Ser Gly Leu Arg Thr Arg Thr Gly
 35 40 45

Ser Asn Ile Asp Cys Glu Lys Leu Arg Arg Arg Phe Ser Ser Leu His
 50 55 60

Phe Met Val Glu Val Lys Gly Asp Leu Thr Ala Lys Lys Met Val Leu
 65 70 75 80

Ala Leu Leu Glu Leu Ala Gln Gln Asp His Gly Ala Leu Asp Cys Cys
 85 90 95

Val Val Val Ile Leu Ser His Gly Cys Gln Ala Ser His Leu Gln Phe
 100 105 110

Pro Gly Ala Val Tyr Gly Thr Asp Gly Cys Pro Val Ser Val Glu Lys
 115 120 125

Ile Val Asn Ile Phe Asn Gly Thr Ser Cys Pro Ser Leu Gly Gly Lys
 130 135 140

Pro Lys Leu Phe Phe Ile Gln Ala Cys Gly Gly Glu Gln Lys Asp His
 145 150 155 160

Gly Phe Glu Val Ala Ser Thr Ser Pro Glu Asp Glu Ser Pro Gly Ser
 165 170 175

Asn Pro Glu Pro Asp Ala Thr Pro Phe Gln Glu Gly Leu Arg Thr Phe
180 185 190

Asp Gln Leu Asp Ala Ile Ser Ser Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ile Phe
195 200 205

Val Ser Tyr Ser Thr Phe Pro Gly Phe Val Ser Trp Arg Asp Pro Lys
210 215 220

Ser Gly Ser Trp Tyr Val Glu Thr Leu Asp Asp Ile Phe Glu Gln Trp
225 230 235 240

Ala His Ser Glu Asp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Asn Ala
245 250 255

Val Ser Val Lys Gly Ile Tyr Lys Gln Met Pro Gly Cys Phe Asn Phe
260 265 270

Leu Arg Lys Lys Leu Phe Phe Lys Thr Ser
275 280

<210> 7

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 7

ttcggcttcc cattctccgg tgg

23

<210> 8

<211> 22

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 8

gtatactcac gccacccacc gg

22

<210> 9

<211> 23

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 9
ggcgtatgta tcagtctcag tgg 23

<210> 10
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

<400> 10
ctggatcaga catatgtggt ggga 24

<210> 11
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

<400> 11
gcaaagcagt tttaagtcca cacag 25

<210> 12
<211> 25
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

<400> 12
ttttcaaaat gtgggtagac tttgg 25

<210> 13
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

<400> 13
ggatttcaat gtgaggcggg t 21

<210> 14
 <211> 23
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

 <400> 14
 ggtccatctg gtcatagagg cgg 23

 <210> 15
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

 <400> 15
 cccccagaac gatgagctt 19

 <210> 16
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

 <400> 16
 tgcagaagtc ctgagaaggc c 21

 <210> 17
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

 <400> 17
 cgtgagtaaa cctgaatctt 20

 <210> 18
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический

олигонуклеотид"

<400> 18
gatattggca taagcctccc 20

<210> 19
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

<400> 19
tggggcsaaa tcatgtagac tc 22

<210> 20
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

<400> 20
tcagtggggg tgaattcagt gt 22

<210> 21
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

<400> 21
cttaacagcg atgctgaccc c 21

<210> 22
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер"

<400> 22
tggcctccat ctcccctctc tt 22

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ генерирования гипоиммуногенной плюрипотентной стволовой клетки, включающий:

а. устранение активности обоих аллелей гена B2M в индуцированной плюрипотентной стволовой клетке (iPSC);

б. устранение активности обоих аллелей гена CIITA в указанной iPSC; и

с. повышение экспрессии CD47 в указанной iPSC.

2. Способ по п.1, в котором указанная iPSC является человеческой, указанный ген B2M является человеческим, указанный ген CIITA является человеческим, и указанная повышенная экспрессия CD47 является результатом введения по меньшей мере одной копии гена человеческого CD47 под контролем промотора в указанную iPSC-клетку.

3. Способ по п.1, в котором указанная iPSC является мышиной, указанный ген B2m является мышинным, указанный ген Ciita является мышинным и указанная повышенная экспрессия Cd47 является результатом введения по меньшей мере одной копии гена мышинового Cd47 под контролем промотора в указанную iPSC-клетку.

4. Способ по любому из пп. 2-3, в котором указанный промотор является конститутивным промотором.

5. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанное нарушение в обоих аллелях указанного гена B2M является результатом реакции коротких полиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)/Cas9, которая разрушает оба указанных аллеля гена B2M.

6. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанное нарушение в обоих аллелях указанного гена CIITA является результатом реакции CRISPR, которая разрушает оба указанных аллеля гена CIITA.

7. Человеческая гипоиммуногенная плюрипотентная (hNIP) стволовая клетка, содержащая:

а. одно или более изменений, которые инактивируют оба аллеля эндогенного гена B2M;

б. одно или более изменений, которые инактивируют оба аллеля эндогенного гена CIITA; и

с. изменение, вызывающее повышенную экспрессию гена CD47 в указанной стволовой клетке hNIP;

где указанная стволовая клетка hNIP вызывает первый ответ клетки-натурального киллера (NK), который слабее, чем второй ответ NK-клетки, вызванный индуцированной плюрипотентной стволовой клеткой (iPSC), которая включает указанные изменения B2M и CIITA, но не включает указанную повышенную экспрессию гена CD47, и где указанные первый и второй ответы NK-клеток измеряют путем определения уровней IFN- γ из NK-клеток, инкубированных с указанными hNIP или iPSC *in vitro*.

8. Человеческая гипоиммуногенная плюрипотентная (hNIP) стволовая клетка человека, содержащая:

а. одно или более изменений, которые инактивируют оба аллеля эндогенного гена B2M;

б. одно или более изменений, которые инактивируют оба аллеля эндогенного гена CIITA; и

с. одно или более изменений, вызывающих повышенную экспрессию гена CD47 в указанной стволовой клетке hNIP;

где указанная стволовая клетка hNIP вызывает первый Т-клеточный ответ в гуманизированной мышинной линии, который слабее, чем второй Т-клеточный ответ в указанной гуманизированной мышинной линии, вызванный iPSC, и где указанные первый и второй Т-клеточные ответы измеряют путем определения уровня IFN- γ из указанных гуманизированных мышей в анализе ELISPOT.

9. Способ, включающий трансплантацию пациенту-человеку стволовых клеток hNIP по любому из пп. 7 или 8.

10. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка, содержащая:

а. эндогенную функцию антигена главного комплекса гистосовместимости класса I (HLA-I), которая снижена по сравнению с родительской плюрипотентной клеткой;

б. эндогенную функцию антигена главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-II), которая снижена по сравнению с указанной родительской плюрипотентной клеткой; и

с. пониженную восприимчивость к NK-клеточному уничтожению

по сравнению с указанной родительской плюрипотентной клеткой;

где указанная гипоиммуногенная плюрипотентная клетка менее восприимчива к отторжению при трансплантации пациенту в результате указанной пониженной функции HLA-I, указанной пониженной функции HLA-II и пониженной восприимчивости к NK-клеточному уничтожению.

11. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.10, в которой указанная функция HLA-I снижена за счет снижения экспрессии белка β -2-микроглобулина.

12. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.11, в которой ген, кодирующий указанный белок β -2-микроглобулина, нокаутирован.

13. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.12, в которой указанный белок β -2-микроглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

14. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.13, в которой указанный белок β -2-микроглобулина имеет последовательность SEQ ID NO: 1.

15. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.10, в которой указанная функция HLA-I снижена за счет снижения экспрессии белка HLA-A.

16. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.15, в которой ген, кодирующий указанный белок HLA-A, нокаутирован.

17. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.10, в которой указанная функция HLA-I снижена за счет снижения экспрессии белка HLA-B.

18. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.17, в которой белок HLA-B нокаутирован.

19. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.10, в которой указанная функция HLA-I снижена за счет снижения экспрессии белка HLA-C.

20. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.19, в которой ген, кодирующий указанный белок HLA-C, нокаутирован.

21. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 10-20, причем указанная гипоиммуногенная плюрипотентная клетка

не обладает функцией HLA-1.

22. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 10-21, в которой указанная функция HLA-II снижена за счет снижения экспрессии белка CIITA.

23. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.22, в которой ген, кодирующий указанный белок CIITA, нокаутирован.

24. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.23, в которой указанный белок CIITA имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

25. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.24, в которой указанный белок CIITA имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

26. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 10-21, в которой указанная функция HLA-II снижена за счет снижения экспрессии белка HLA-DP.

27. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.26, в которой ген, кодирующий указанный белок HLA-DP, нокаутирован.

28. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 10-21, в которой указанная функция HLA-II снижена за счет снижения экспрессии белка HLA-DR.

29. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.28, в которой ген, кодирующий указанный белок HLA-DR, нокаутирован.

30. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 10-21, в которой указанная функция HLA-II снижена за счет снижения экспрессии белка HLA-DQ.

31. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.30, в которой ген, кодирующий указанный белок HLA-DQ, нокаутирован.

32. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 10-31, причем указанная гипоиммуногенная плюрипотентная клетка не обладает функцией HLA-II.

33. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 10-32, в которой указанная пониженная восприимчивость к NK-клеточному уничтожению вызвана повышенной экспрессией белка CD47.

34. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.33, в которой указанная повышенная экспрессия белка CD47 является

результатом модификации эндогенного генного локуса CD47.

35. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.33, в которой повышенная экспрессия белка CD47 является результатом наличия трансгена CD47.

36. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 33-35, в которой указанный белок CD47 имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3.

37. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.27, в которой указанный белок CD47 имеет последовательность SEQ ID NO: 3.

38. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 10-37, дополнительно содержащая ген «самоубийства», который активируется триггером, который вызывает гибель указанной гипоиммуногенной плюрипотентной клетки.

39. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.38, в которой указанный ген «самоубийства» представляет собой ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk), а указанный триггер представляет собой ганцикловир.

40. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.39, в которой указанный ген HSV-tk кодирует белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4.

41. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.40, в которой указанный ген HSV-tk кодирует белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

42. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.38, в которой указанный ген «самоубийства» представляет собой ген цитозин-дезаминазы *Escherichia coli* (EC-CD), а указанный триггер представляет собой 5-фторцитозин (5-FC).

43. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.42, в которой указанный ген EC-CD кодирует белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5.

44. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.43, в которой указанный ген EC-CD кодирует белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5.

45. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.38, в которой указанный ген «самоубийства» кодирует индуцируемый белок

Каспазы, а указанный триггер представляет собой химический индуктор димеризации (CID).

46. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.45, в которой указанный ген кодирует индуцируемый белок Каспазы, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6.

47. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по п.46, в которой указанный ген кодирует индуцируемый белок Каспазы, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6.

48. Гипоиммуногенная плюрипотентная клетка по любому из пп. 45-47, в которой указанный CID представляет собой AP1903.

49. Способ получения гипоиммуногенной плюрипотентной клетки, включающий

а. снижение эндогенной функции антигена главного комплекса гистосовместимости класса I (HLA-I) в плюрипотентной клетке;

б. снижение эндогенной функции антигена главного комплекса гистосовместимости класса II (HLA-II) в плюрипотентной клетке; и

с. повышение экспрессии белка, который уменьшает восприимчивость указанной плюрипотентной клетки к NK-клеточному уничтожению.

50. Способ по п.49, в котором указанную функцию HLA-I снижают путем снижения экспрессии белка β -2-микроглобулина.

51. Способ по п.50, в котором указанную экспрессию белка β -2-микроглобулина снижают путем нокаутирования гена, кодирующего указанный белок β -2-микроглобулина.

52. Способ по п.50, в котором указанный белок β -2-микроглобулина имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1.

53. Способ по п.51, в котором указанный белок β -2-микроглобулина имеет последовательность SEQ ID NO: 1.

54. Способ по п.49, в котором указанную функцию HLA-I снижают путем снижения экспрессии белка HLA-A.

55. Способ по п.54, в котором указанную экспрессию белка HLA-A снижают путем нокаутирования гена, кодирующего указанный белок HLA-A.

56. Способ по п.49, в котором указанную функцию HLA-I снижают путем снижения экспрессии белка HLA-B.

57. Способ по п.56, в котором указанную экспрессию белка HLA-B снижают путем нокаутирования гена, кодирующего указанный белок HLA-B.

58. Способ по п.49, в котором указанную функцию HLA-I снижают путем снижения экспрессии белка HLA-C.

59. Способ по п.58, в котором указанную экспрессию белка HLA-C снижают путем нокаутирования гена, кодирующего указанный белок HLA-C.4.

60. Способ по любому из пп. 49-59, в котором указанная гипоиммуногенная плюрипотентная клетка не обладает функцией HLA-I.

61. Способ по любому из пп. 49-60, в котором указанную функцию HLA-II снижают путем снижения экспрессии белка CIITA.

62. Способ по п.60, в котором указанную экспрессию белка CIITA снижают путем нокаутирования гена, кодирующего указанный белок CIITA.

63. Способ по п.61, в котором указанный белок CIITA имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2.

64. Способ по п.63, в котором указанный белок CIITA имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

65. Способ по любому из пп. 49-60, в котором указанную функцию HLA-II снижают путем снижения экспрессии белка HLA-DP.

66. Способ по п.65, в котором указанную экспрессию белка HLA-DP снижают путем нокаутирования гена, кодирующего указанный белок HLA-DP.

67. Способ по любому из пп. 49-60, в котором указанную функцию HLA-II снижают путем снижения экспрессии белка HLA-DR.

68. Способ по п.67, в котором указанную экспрессию белка HLA-DR снижают путем нокаутирования гена, кодирующего указанный белок HLA-DR.

69. Способ по любому из пп. 49-60, в котором указанную функцию HLA-II снижают путем снижения экспрессии белка HLA-DQ.

70. Способ по п. 69, в котором указанную экспрессию белка

HLA-DQ снижают путем нокаутирования гена, кодирующего указанный белок HLA-DQ.

71. Способ по любому из пп. 49-70, в котором указанная гипоиммуногенная плюрипотентная клетка не обладает функцией HLA-II.

72. Способ по любому из пп. 49-71, в котором указанная повышенная экспрессия белка, который уменьшает восприимчивость указанной плюрипотентной клетки к макрофагальному фагоцитозу, является результатом модификации эндогенного генного локуса.

73. Способ по п.72, в котором указанный эндогенный генный локус кодирует белок CD47.

74. Способ по любому из пп. 49-71, в котором указанная повышенная экспрессия белка является результатом экспрессии трансгена.

75. Способ по п.74, в котором указанный трансген кодирует белок CD47.

76. Способ по любому из пп. 73 или 74, в котором указанный белок CD47 имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 3.

77. Способ по п.76, в котором указанный белок CD47 имеет последовательность SEQ ID NO: 3.

78. Способ по любому из пп. 49-77, дополнительно включающий экспрессию гена «самоубийства», который активируется триггером, который вызывает гибель указанной гипоиммуногенной плюрипотентной клетки.

79. Способ по п.78, в котором указанный ген «самоубийства» представляет собой ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk), а указанный триггер представляет собой ганцикловир.

80. Способ по п.79, в котором указанный ген HSV-tk кодирует белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4.

81. Способ по п.80, в котором указанный ген HSV-tk кодирует белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4.

82. Способ по п.78, в котором указанный ген «самоубийства» представляет собой ген цитозин-дезаминазы *Escherichia coli* (EC-CD), а указанный триггер представляет собой 5-фторцитозин (5-

ЕС) .

83. Способ по п.82, в котором указанный ген ЕС-CD кодирует белок, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5.

84. Способ по п.83, в котором указанный ген ЕС-CD кодирует белок, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5.

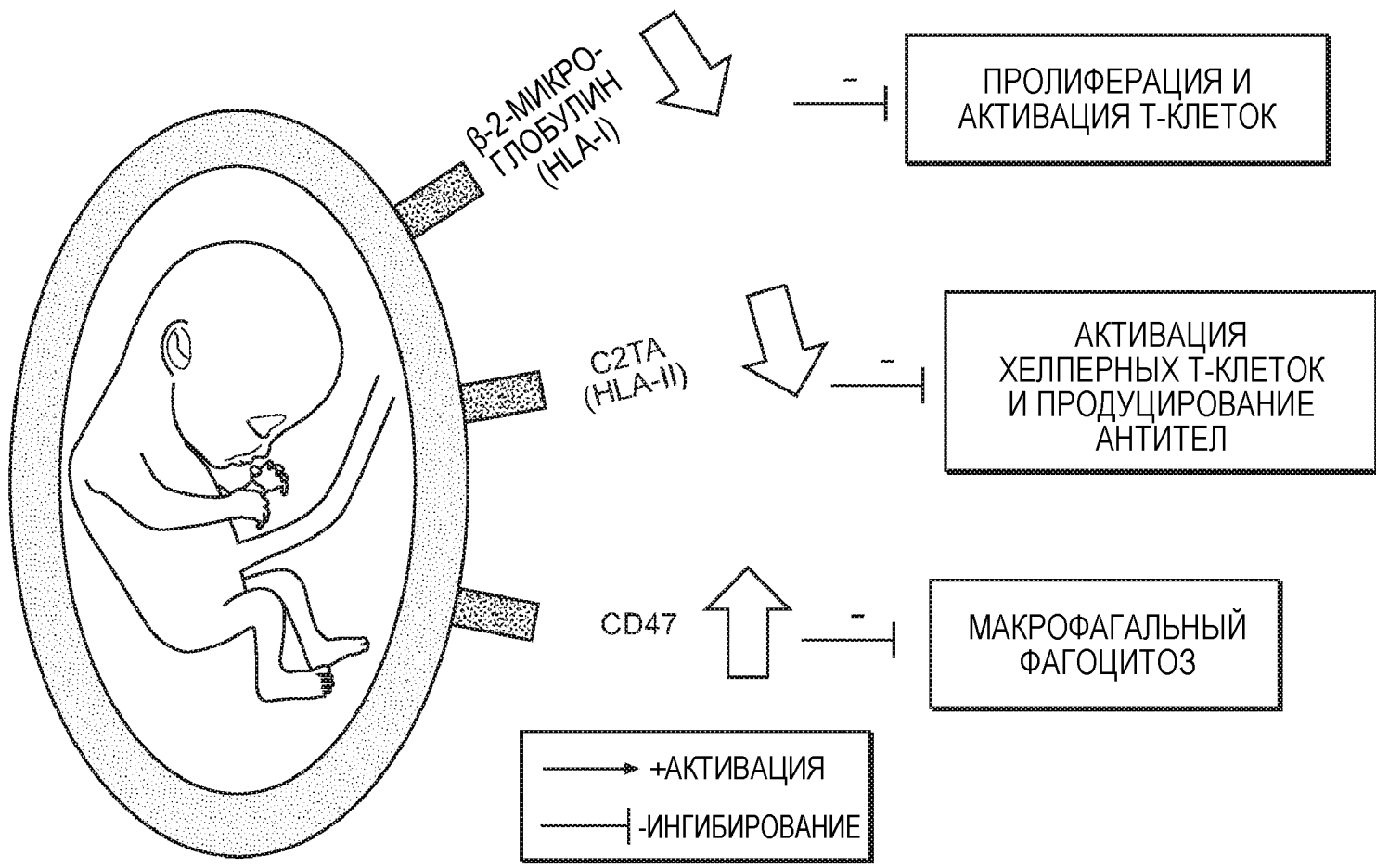
85. Способ по п.78, в котором указанный ген «самоубийства» кодирует индуцируемый белок каспазы, а указанный триггер представляет собой специфический химический индуктор димеризации (CID) .

86. Способ по п.85, в котором указанный ген кодирует индуцируемый белок каспазы, имеющий по меньшей мере 90% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6.

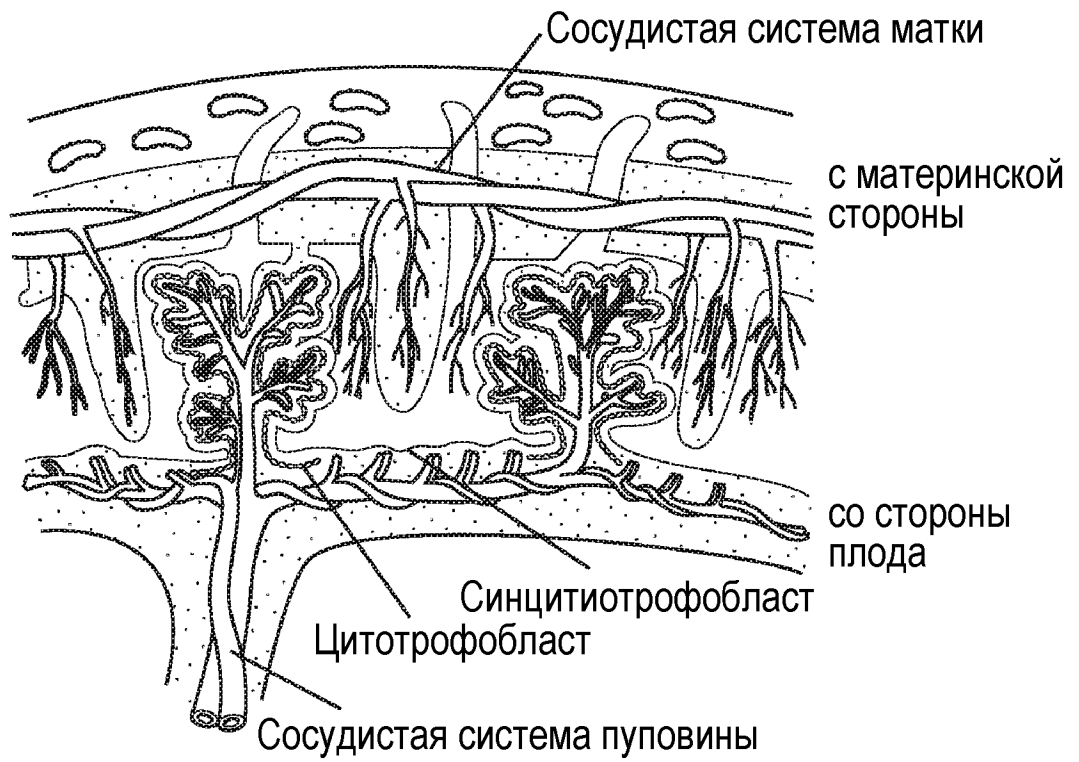
87. Способ по п.86, в котором указанный ген кодирует индуцируемый белок каспазы, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6.

88. Способ по любому из пп. 85-87, в котором указанный CID представляет собой AP1903.

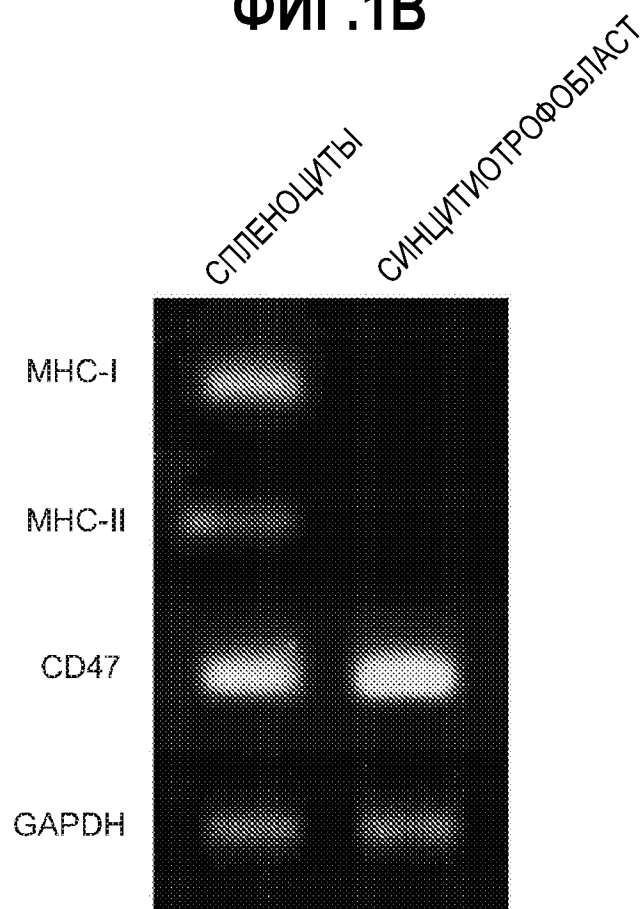
По доверенности



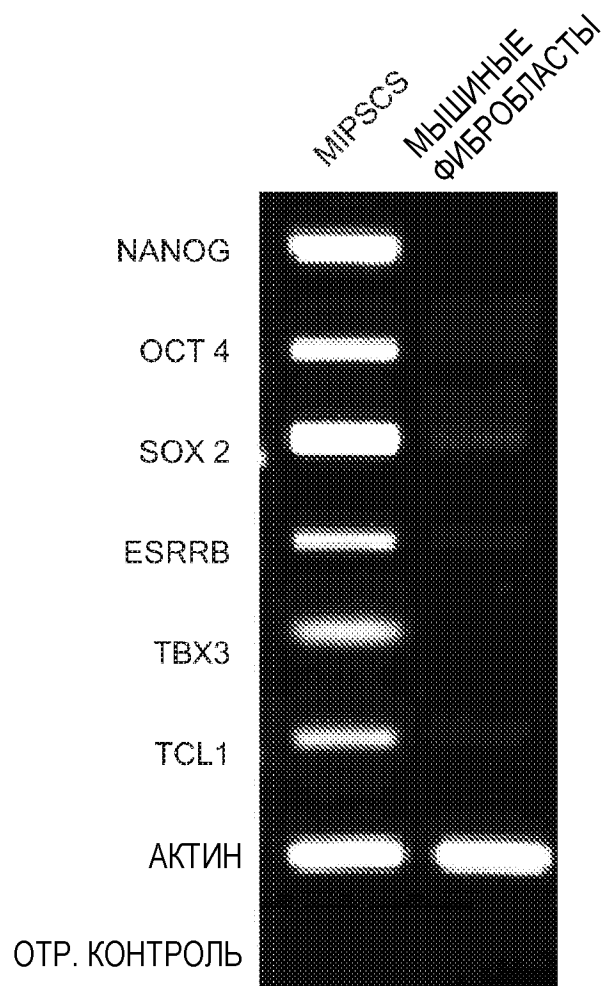
ФИГ.1А



ФИГ.1В

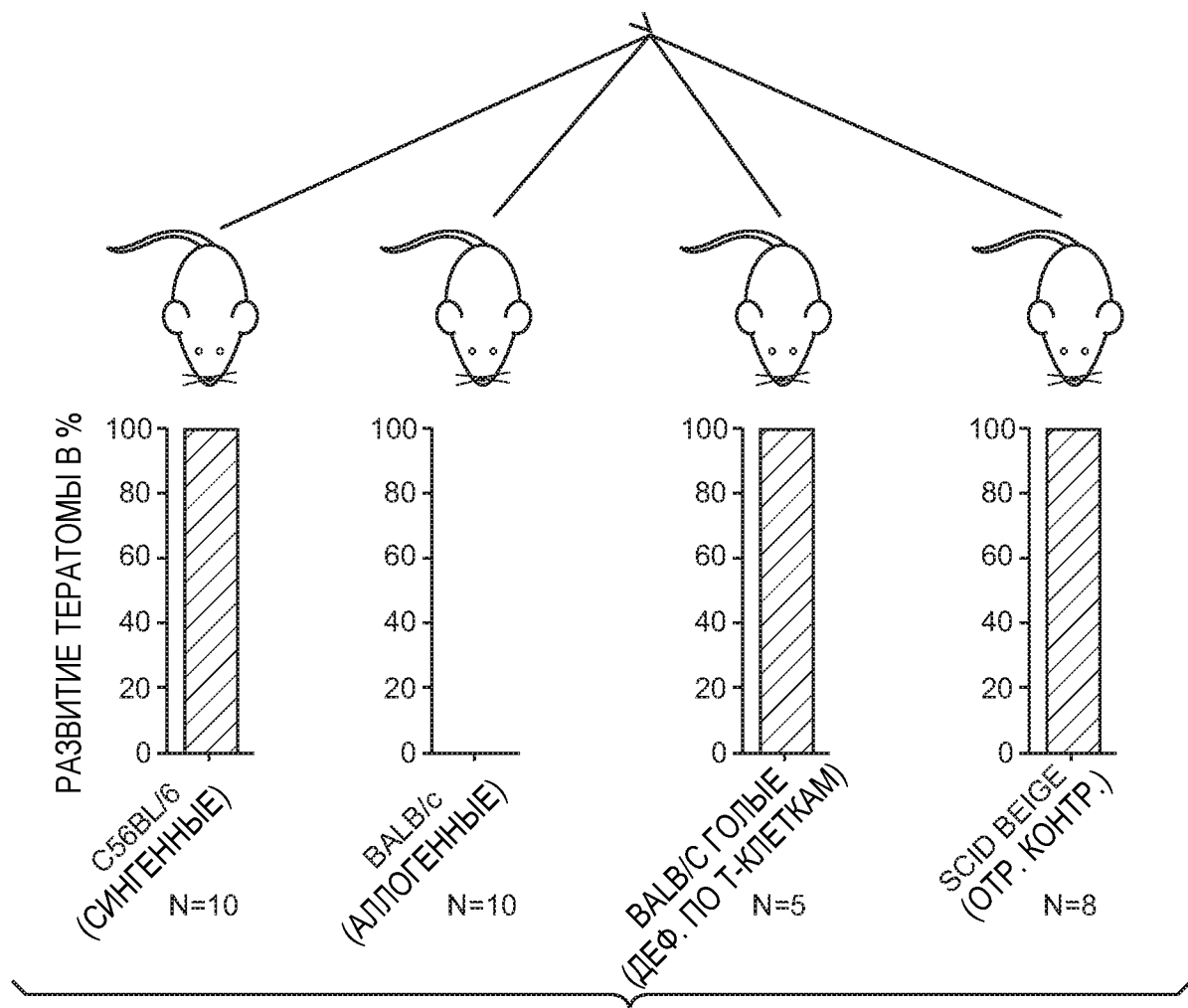


ФИГ.1С



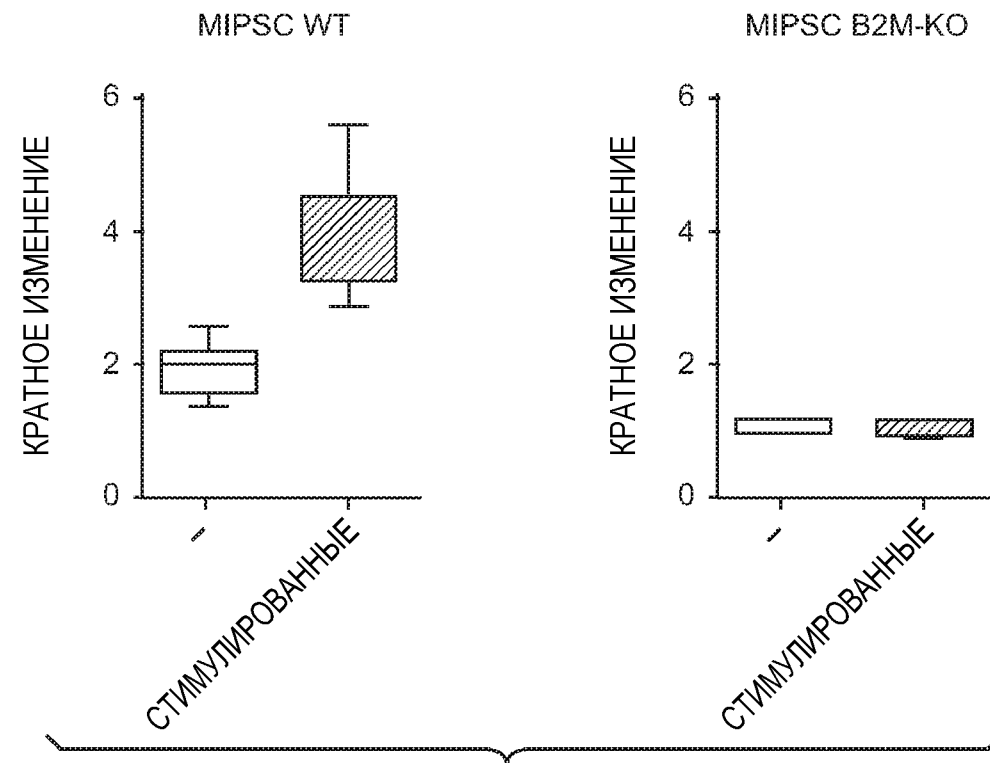
ФИГ.2

2×10^6 КЛЕТОК IPS (C57BL/6) I.M.

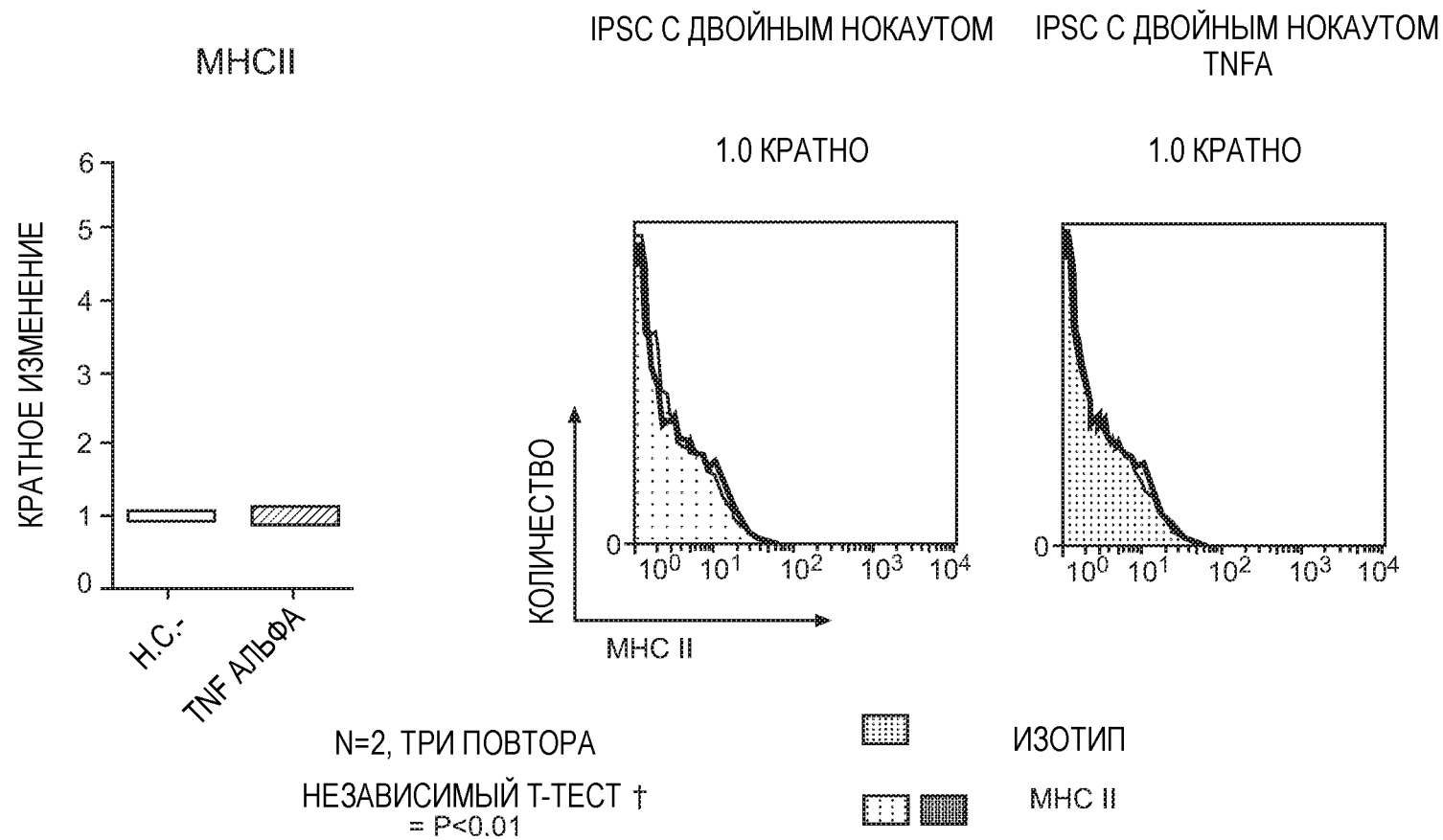


ФИГ.3

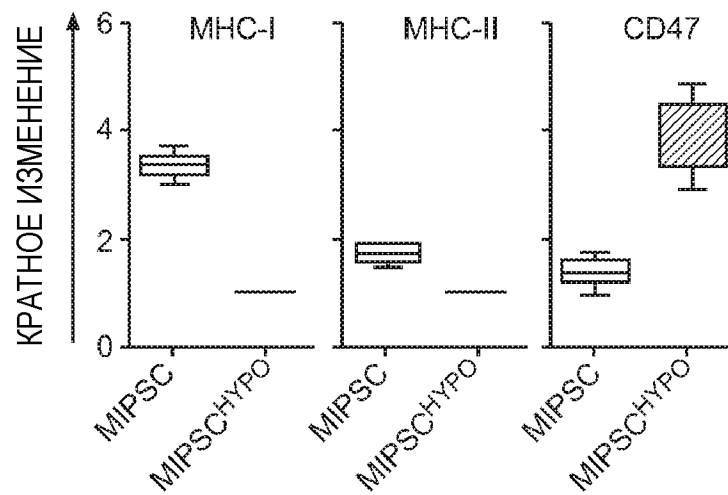
MHCI



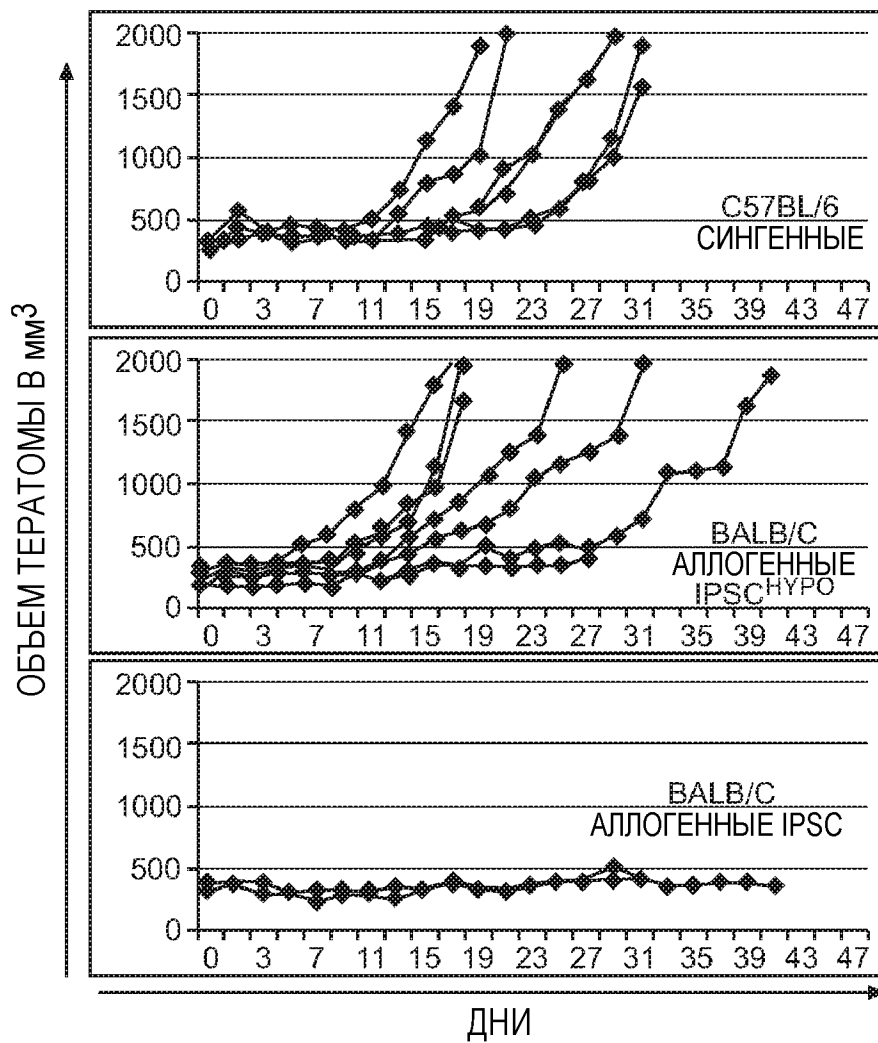
ФИГ.4



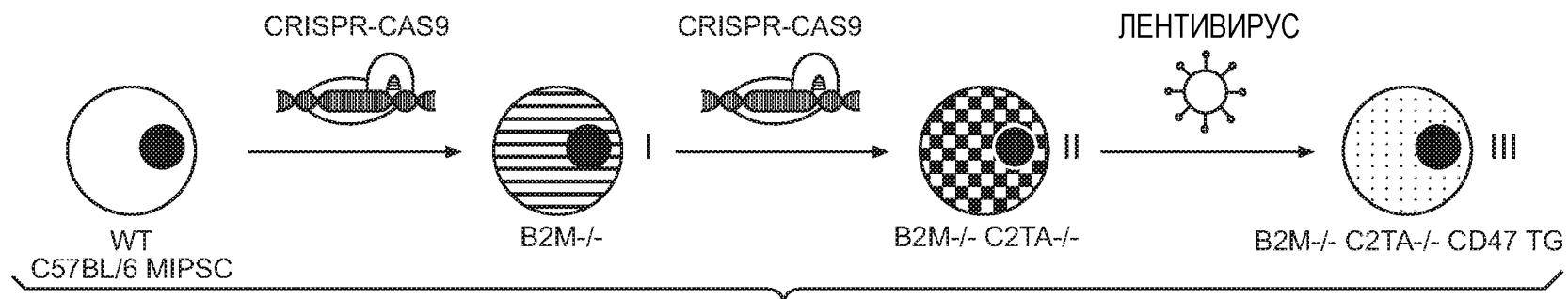
ФИГ.5



ФИГ.6А

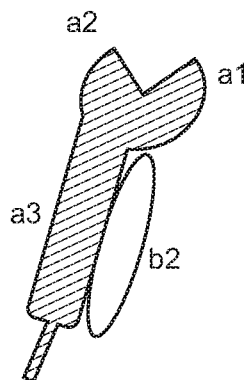


ФИГ.6В



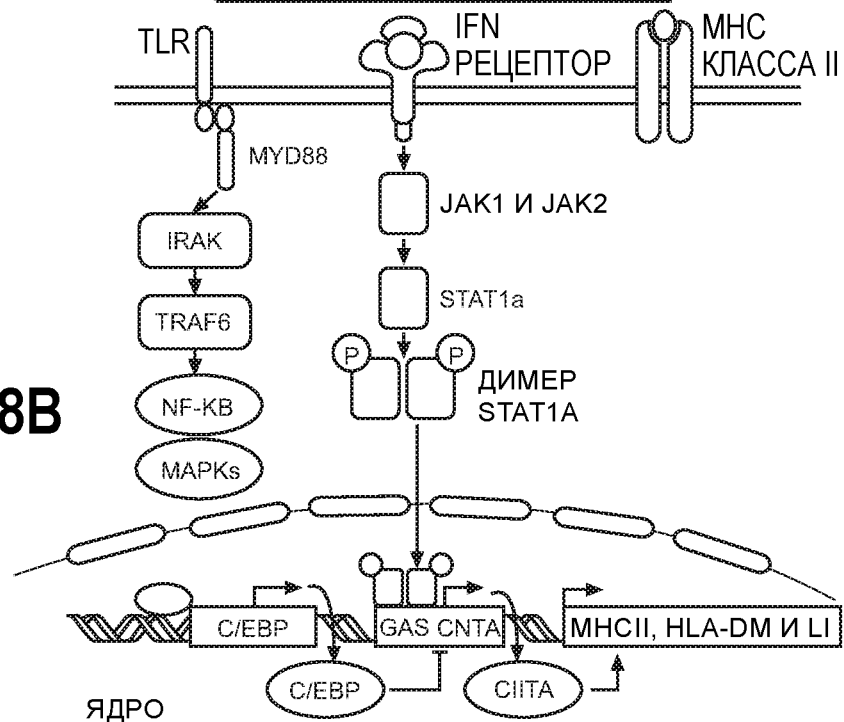
ФИГ.7

ИСТОЩЕНИЕ МНС I С
ПОМОЩЬЮ B2M-НОКАУТА

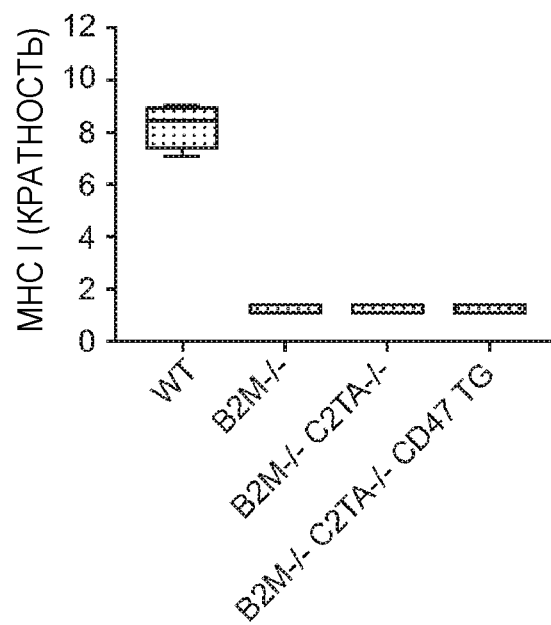


ФИГ.8А

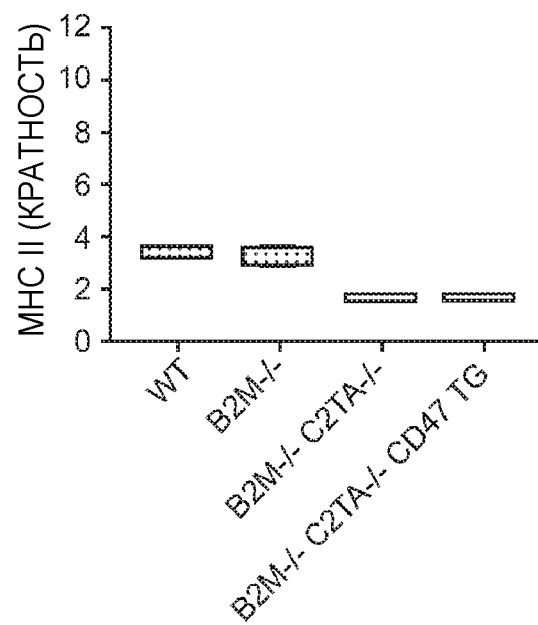
ИСТОЩЕНИЕ МНС II С
ПОМОЩЬЮ C2TA-НОКАУТА



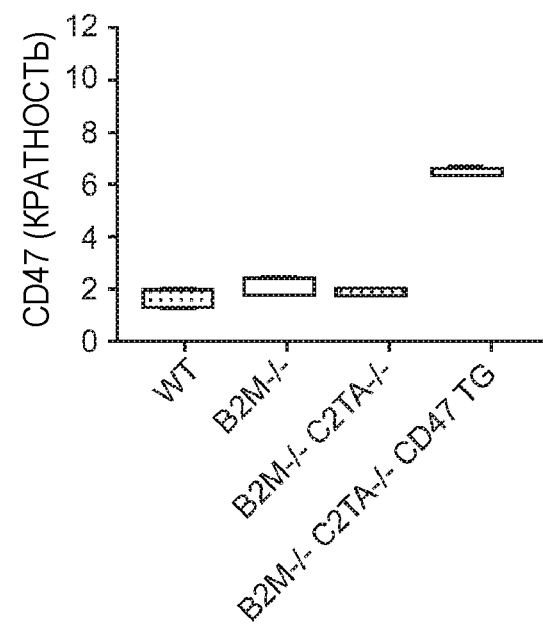
ФИГ.8В



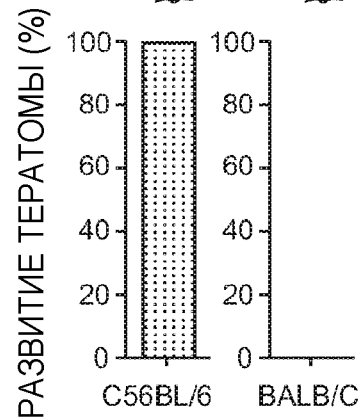
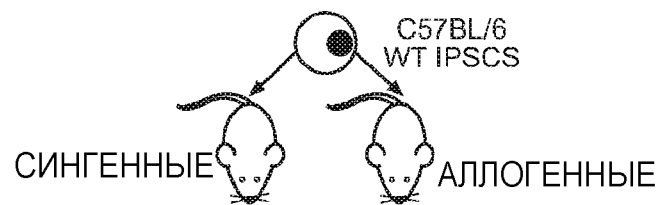
ФИГ.9А



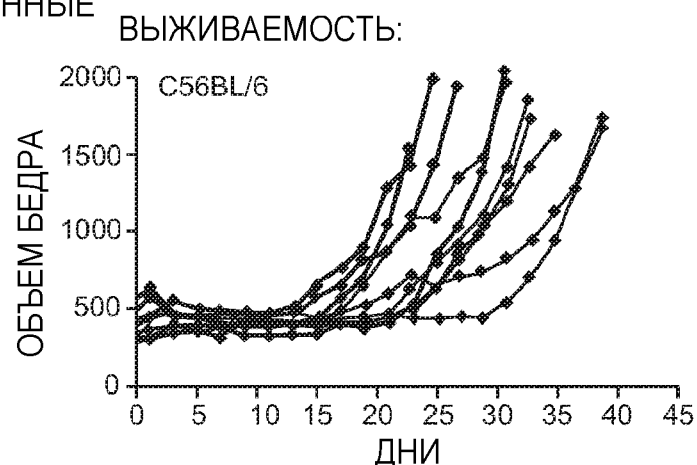
ФИГ.9В



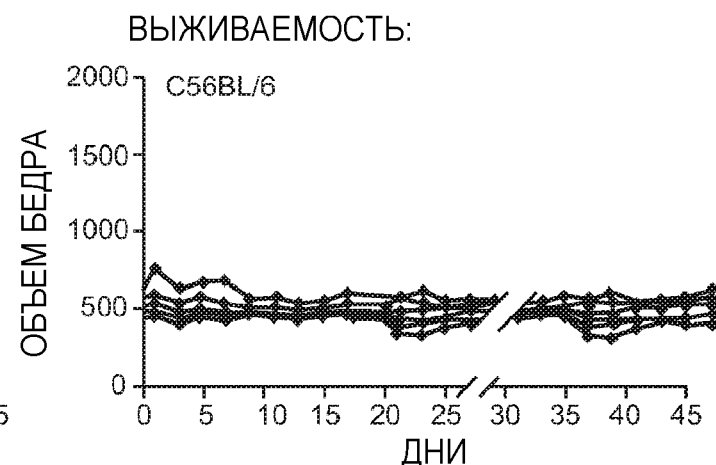
ФИГ.9С



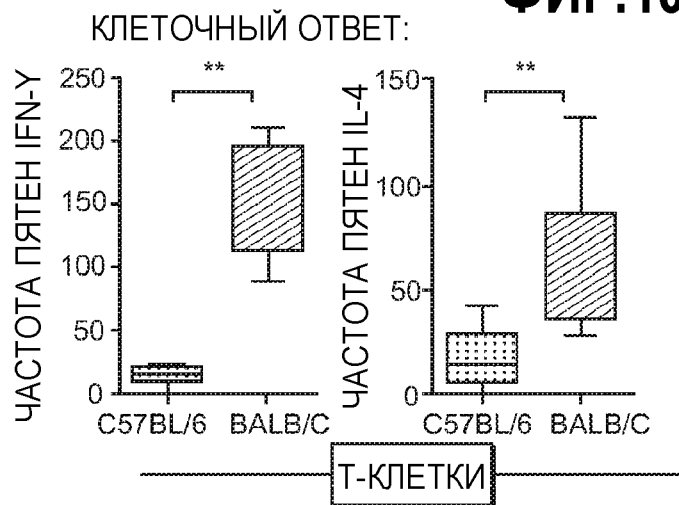
ФИГ.10А



ФИГ.10В



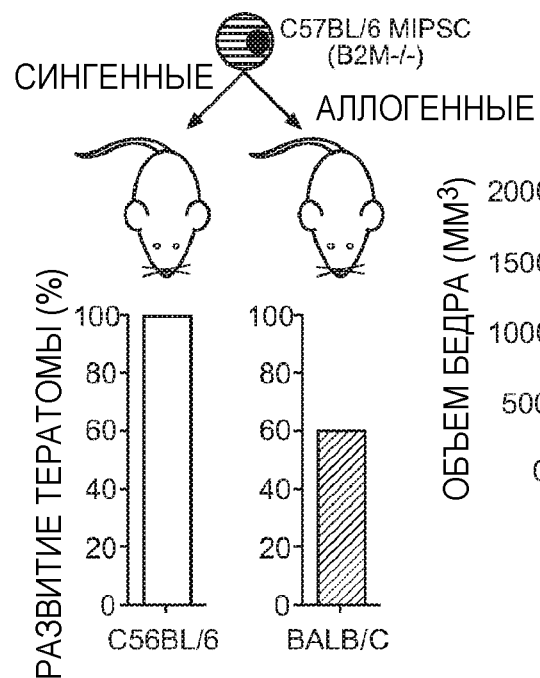
ФИГ.10С



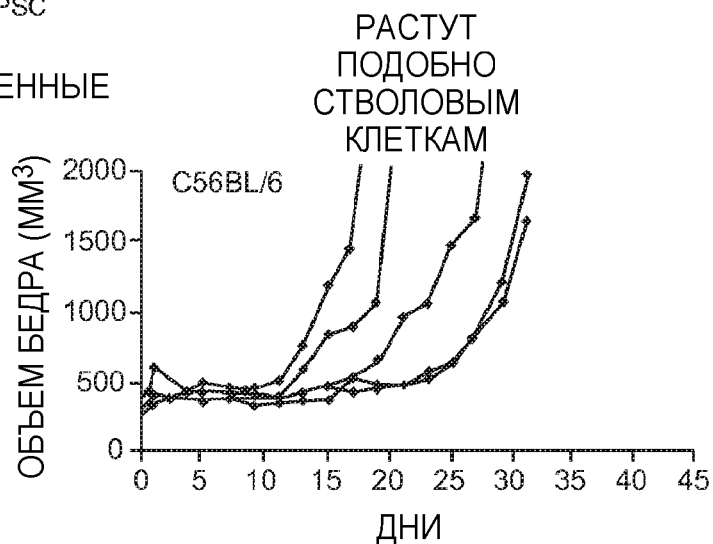
ФИГ.10D



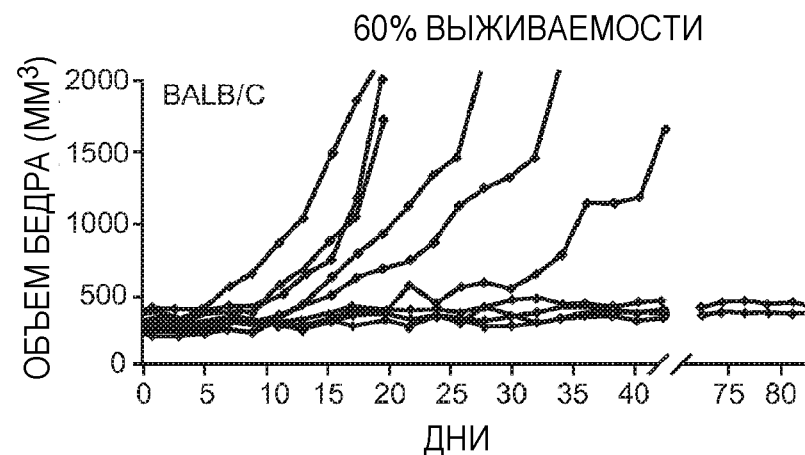
ФИГ.10Е



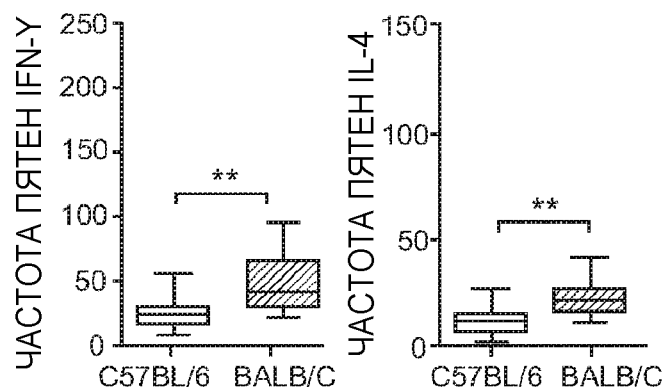
ФИГ.11А



ФИГ.11В

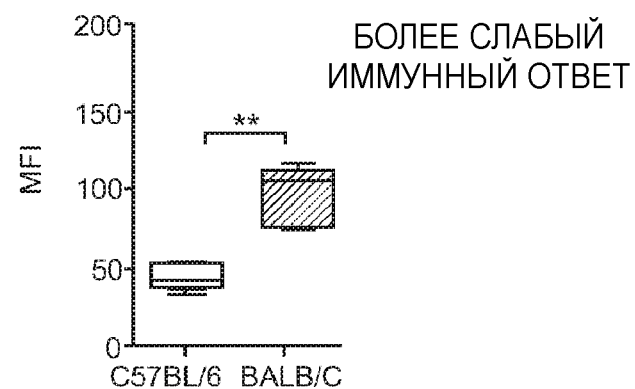


ФИГ.11С



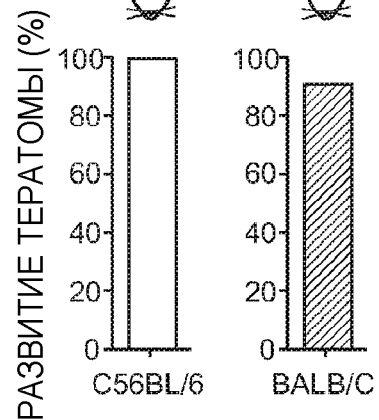
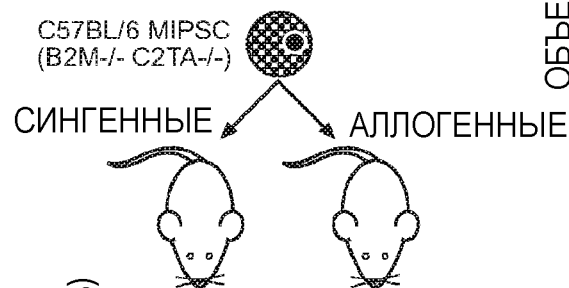
Т-КЛЕТКИ

ФИГ.11D

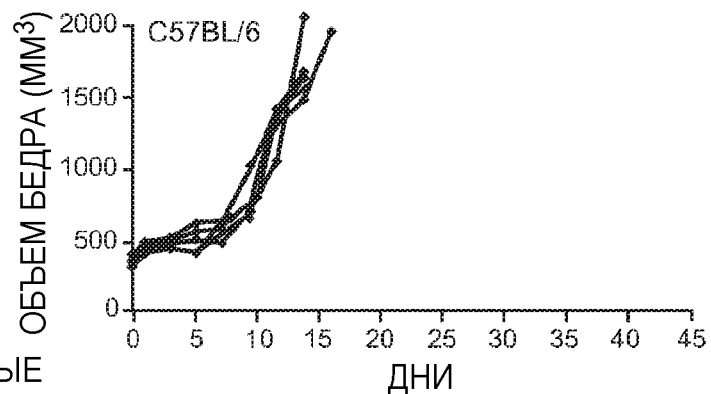


В-КЛЕТКИ

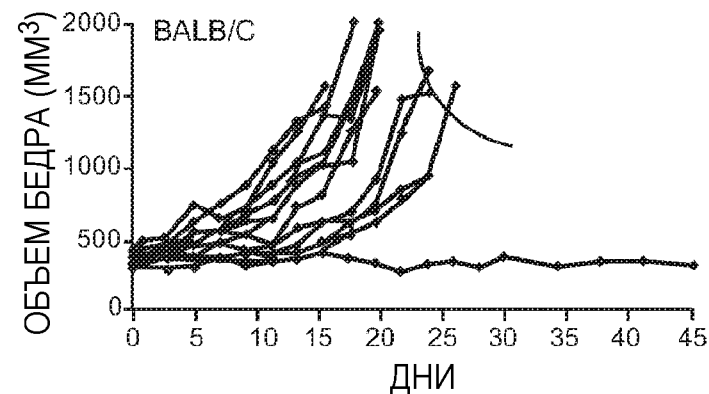
ФИГ.11Е



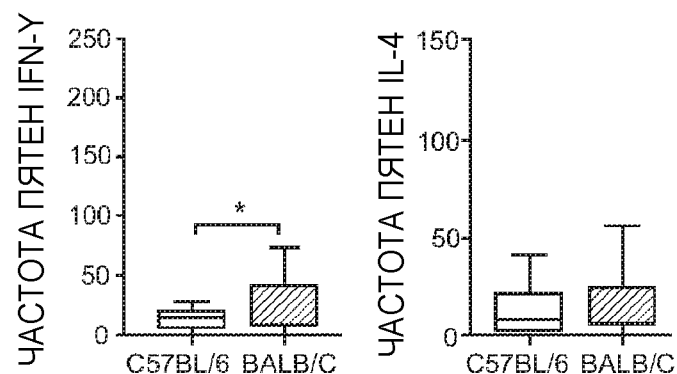
ФИГ.12А



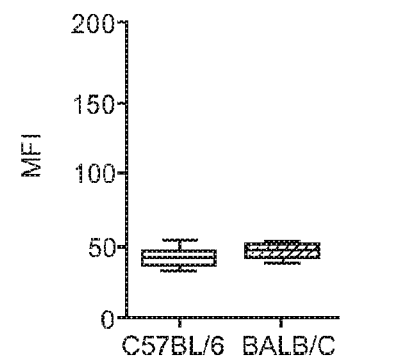
ФИГ.12В



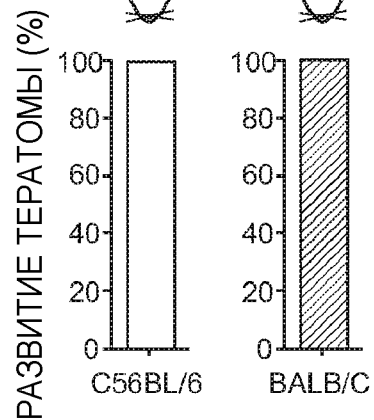
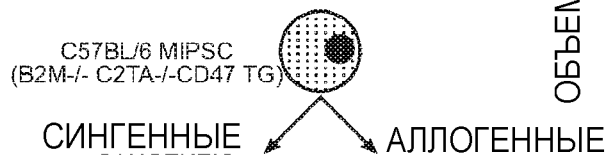
ФИГ.12С



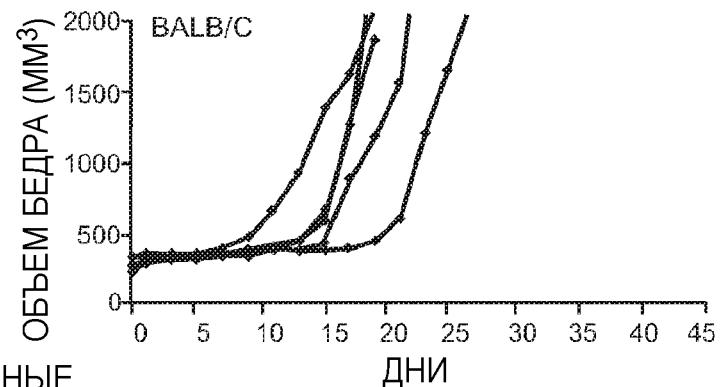
ФИГ.12D



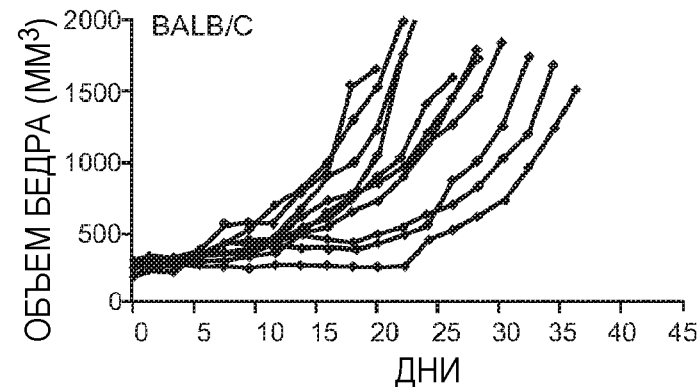
ФИГ.12Е



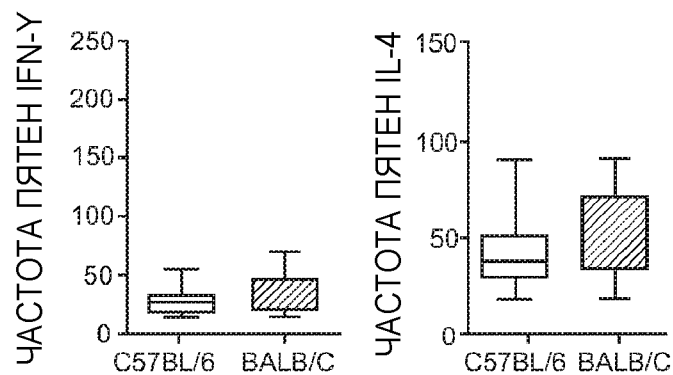
ФИГ.13А



ФИГ.13В

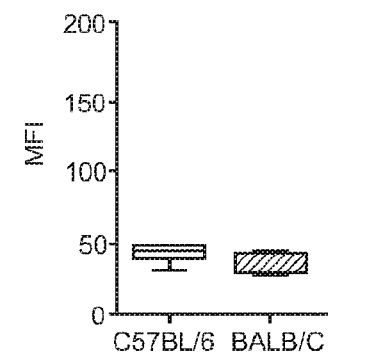


ФИГ.13С



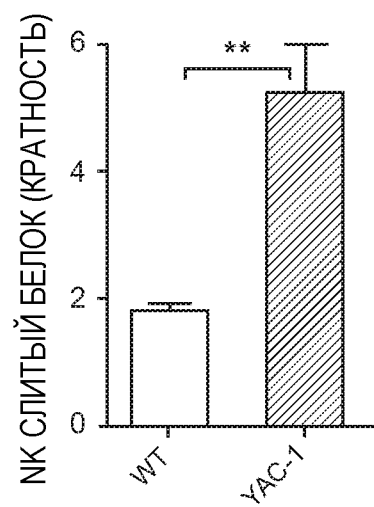
Т-КЛЕТКИ

ФИГ.13D

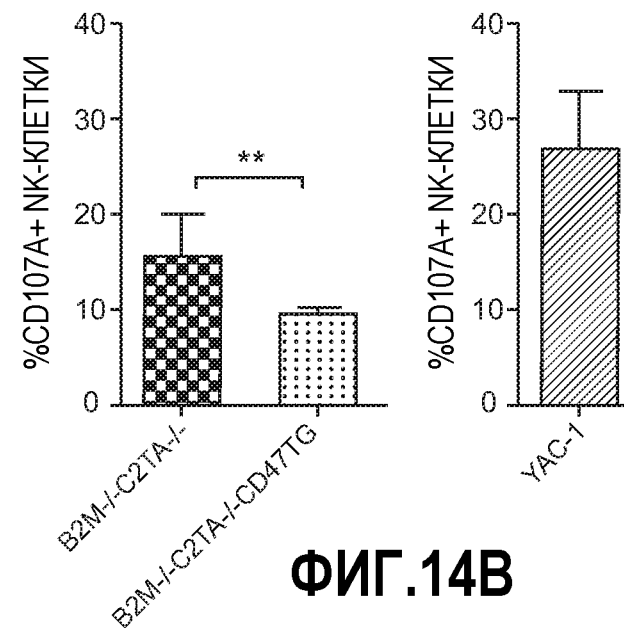
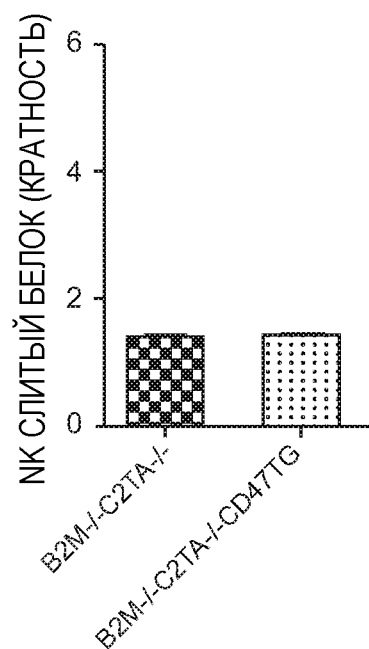


В-КЛЕТКИ

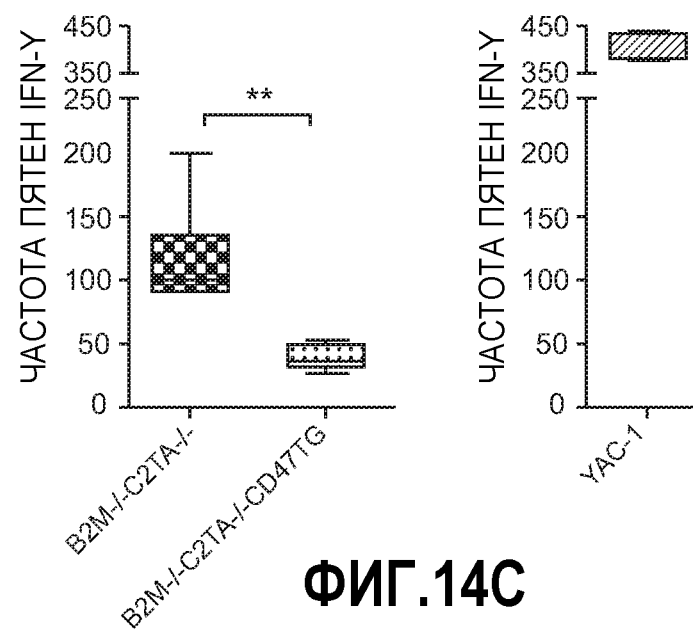
ФИГ.13Е



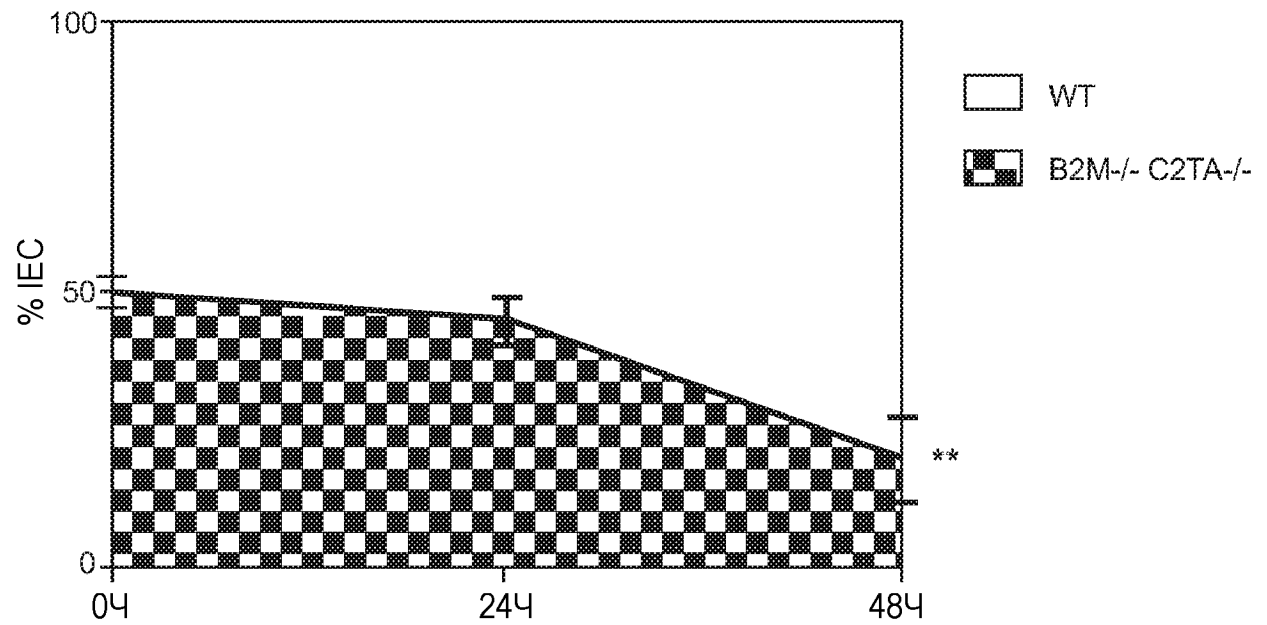
ФИГ.14А



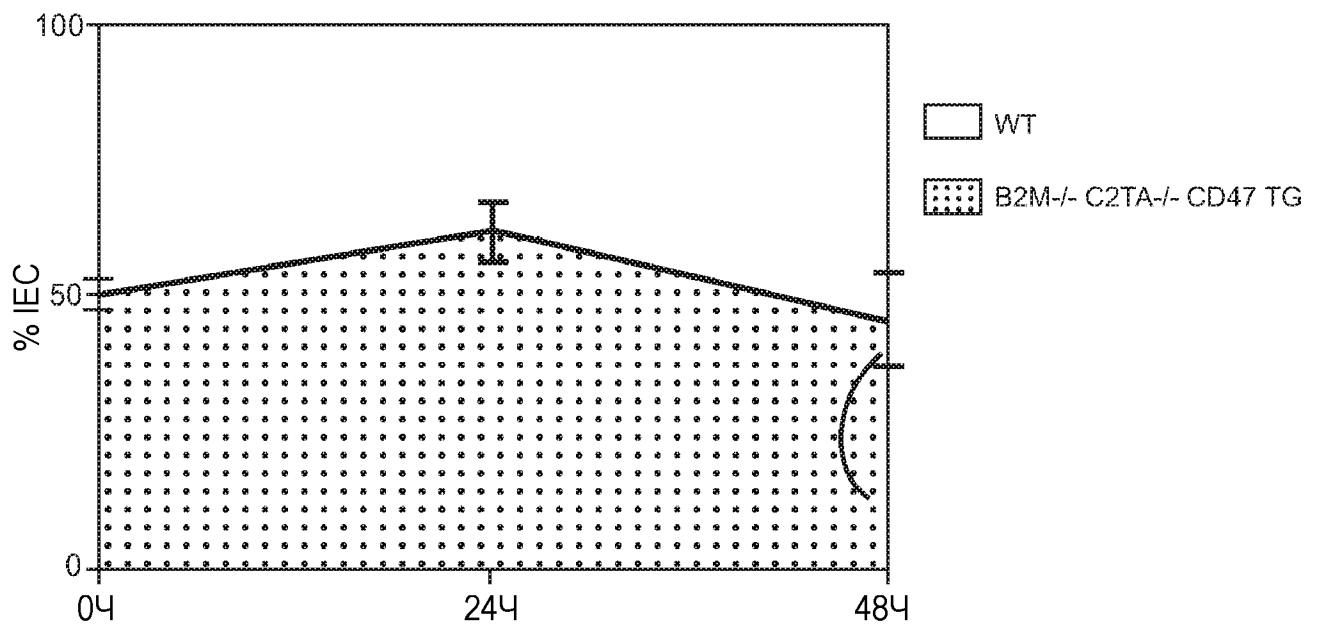
ФИГ.14В



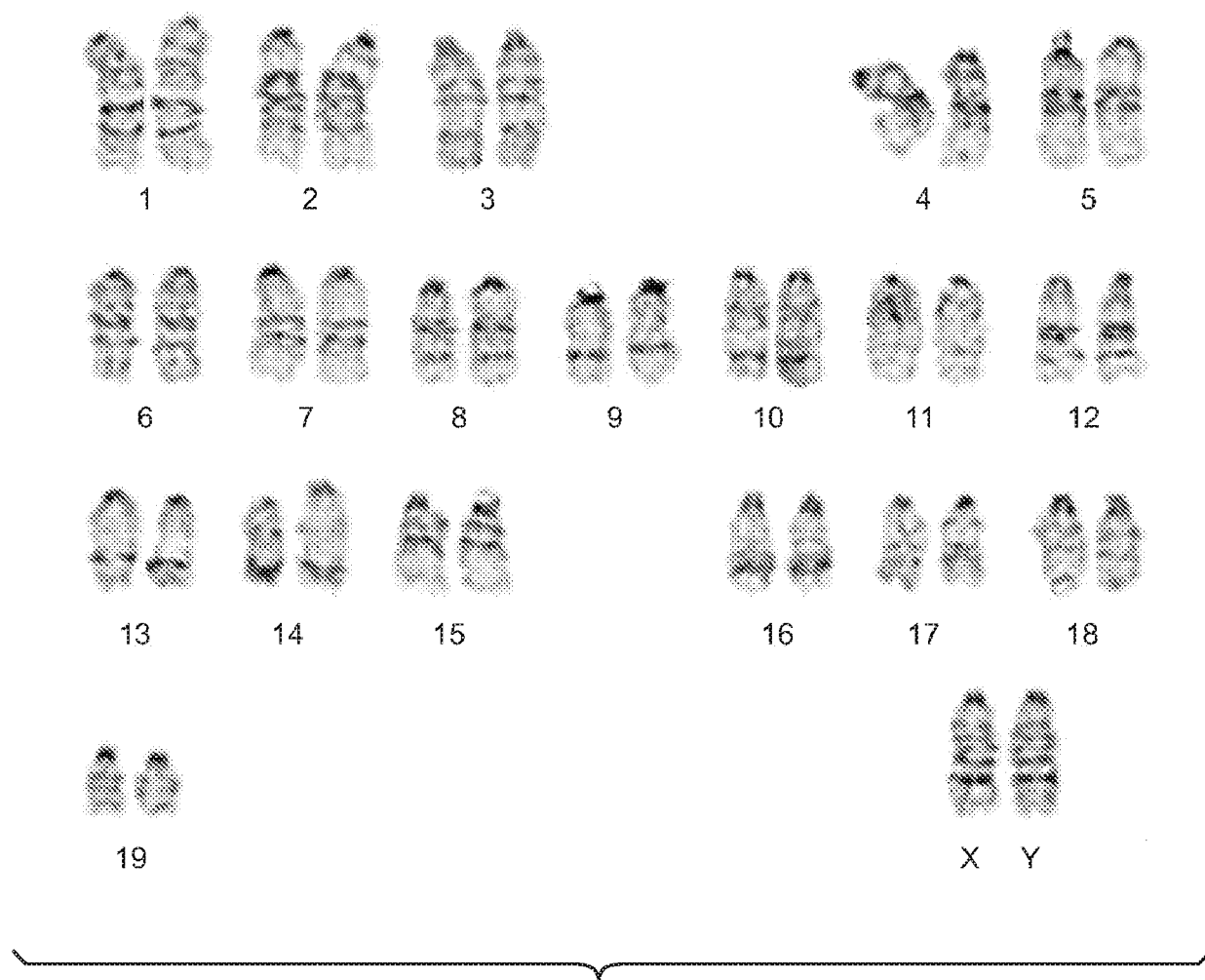
ФИГ.14С

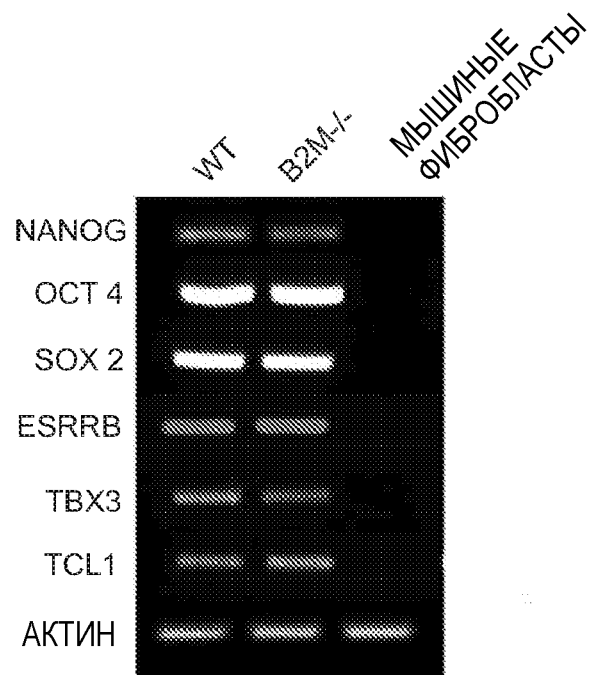


ФИГ.15А

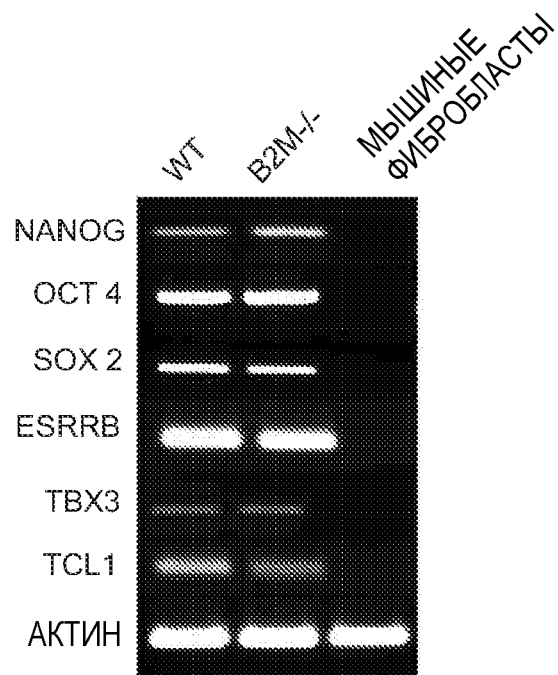


ФИГ.15В

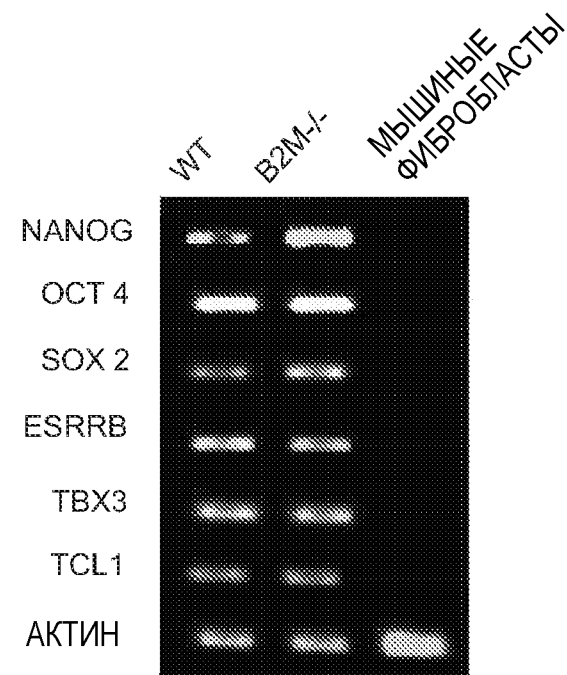




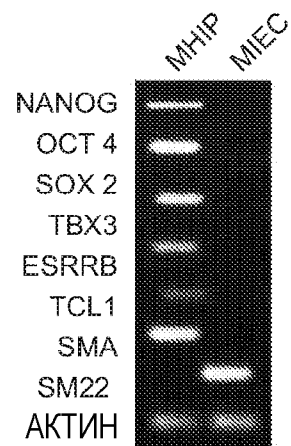
ФИГ.17А



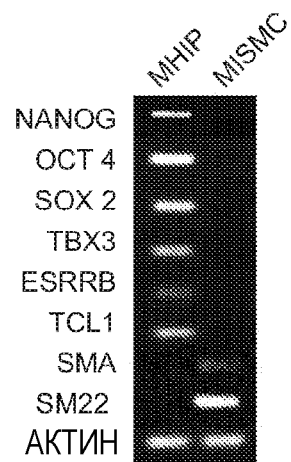
ФИГ.17В



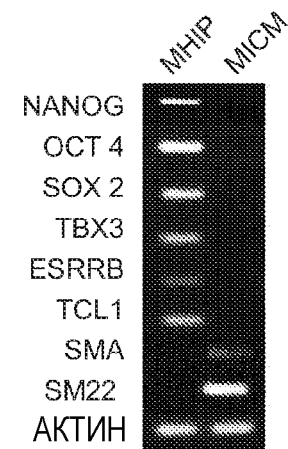
ФИГ.17С



ФИГ.18А

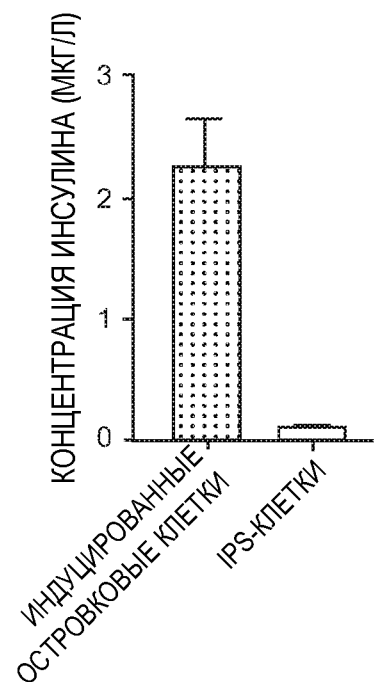
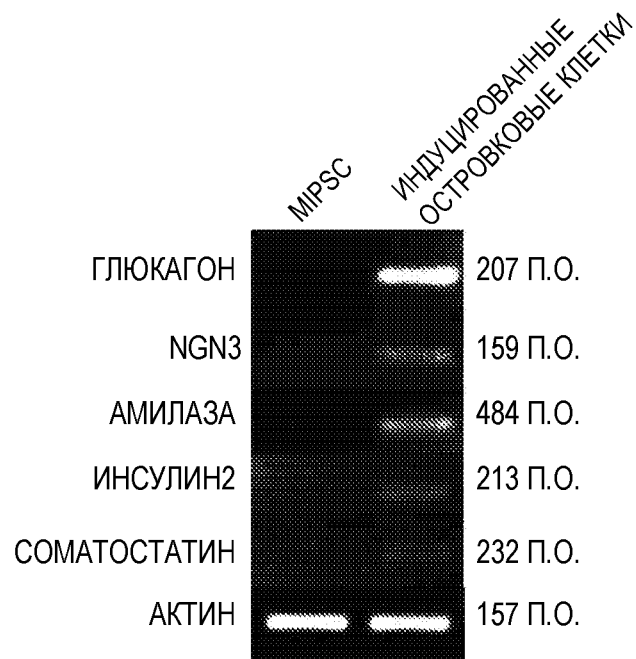


ФИГ.18В

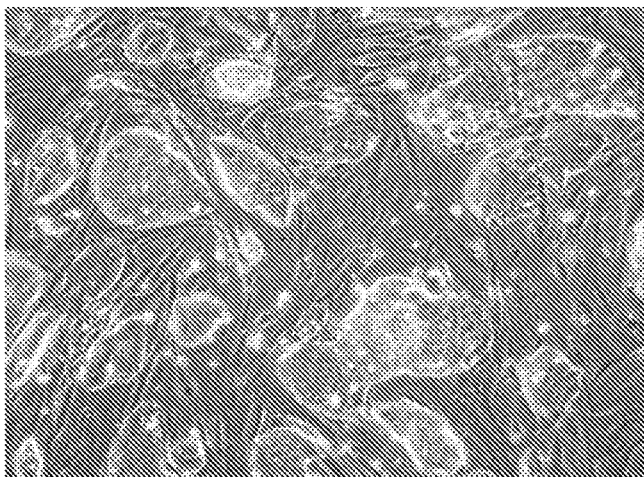


ФИГ.18С

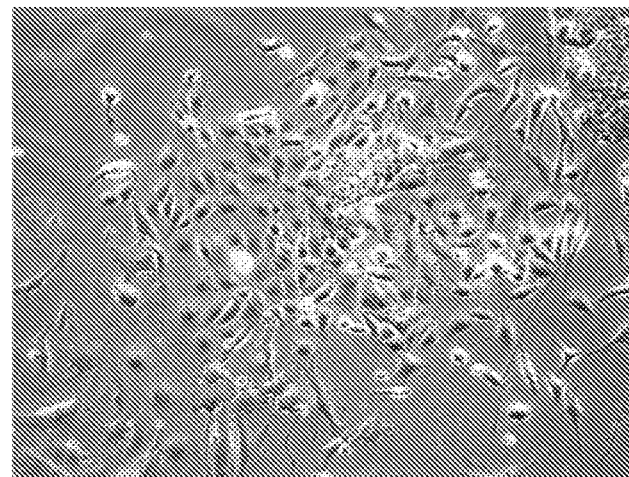
ФИГ.19А



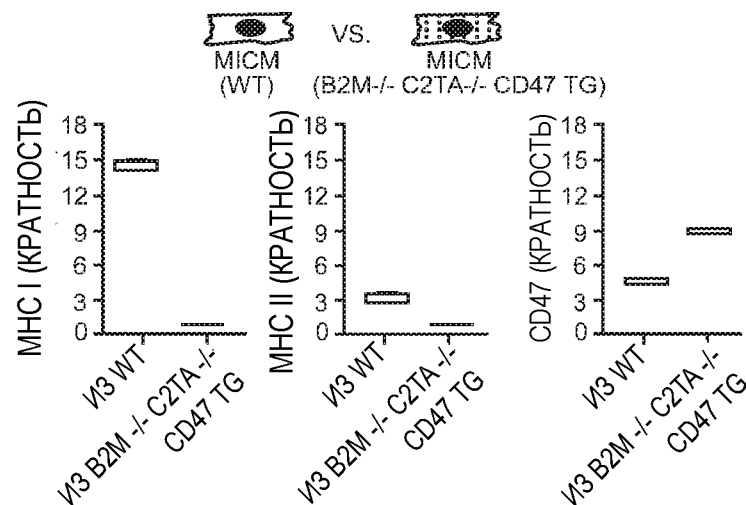
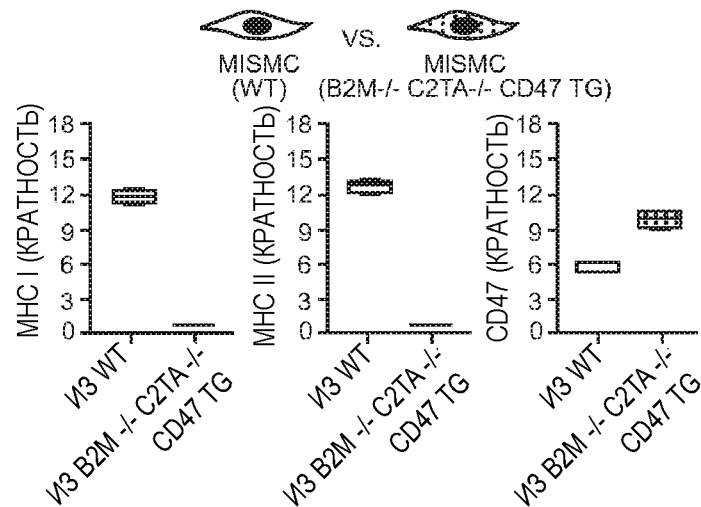
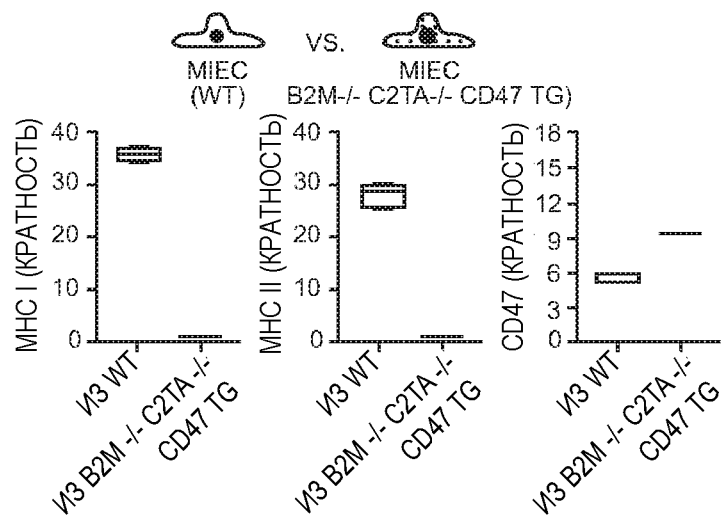
ФИГ.19В

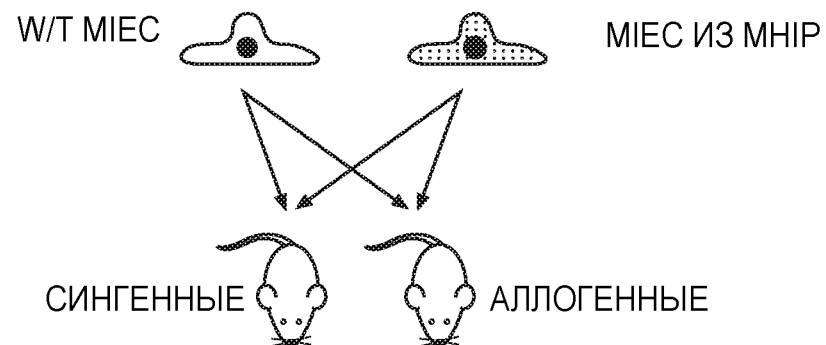


ФИГ.20А

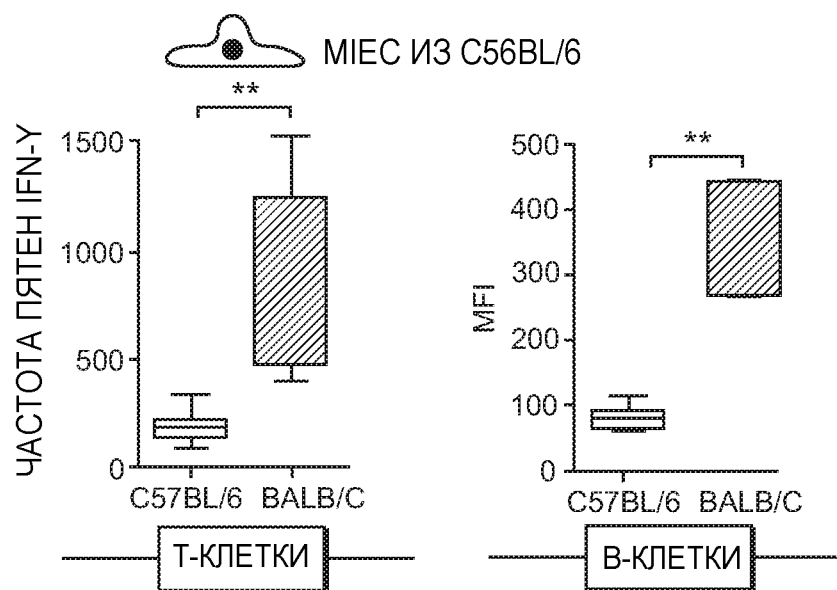


ФИГ.20В

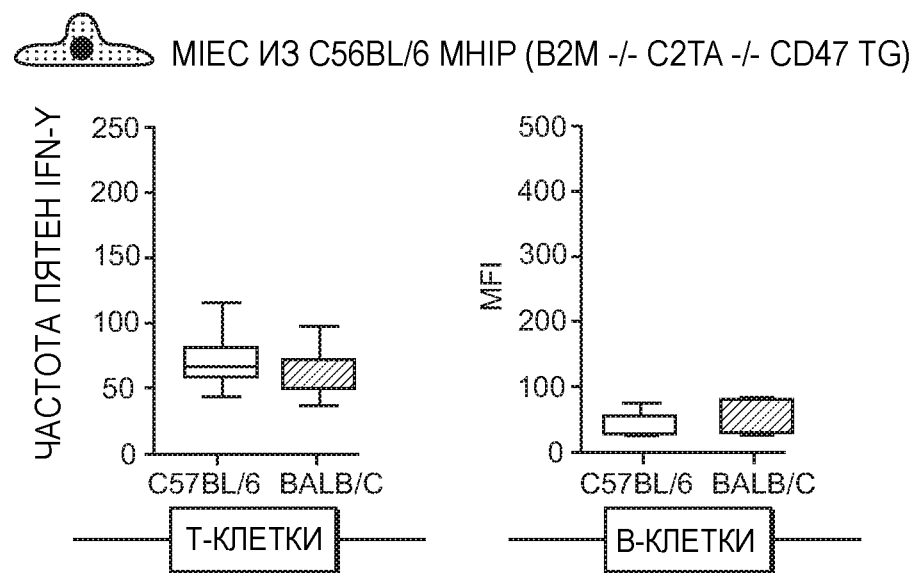




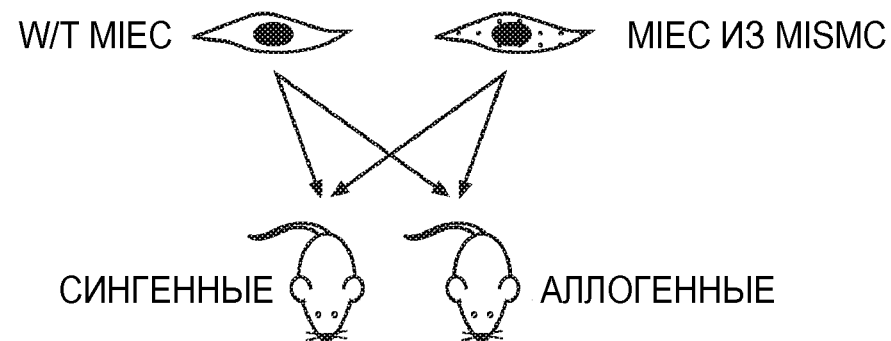
ФИГ.22А



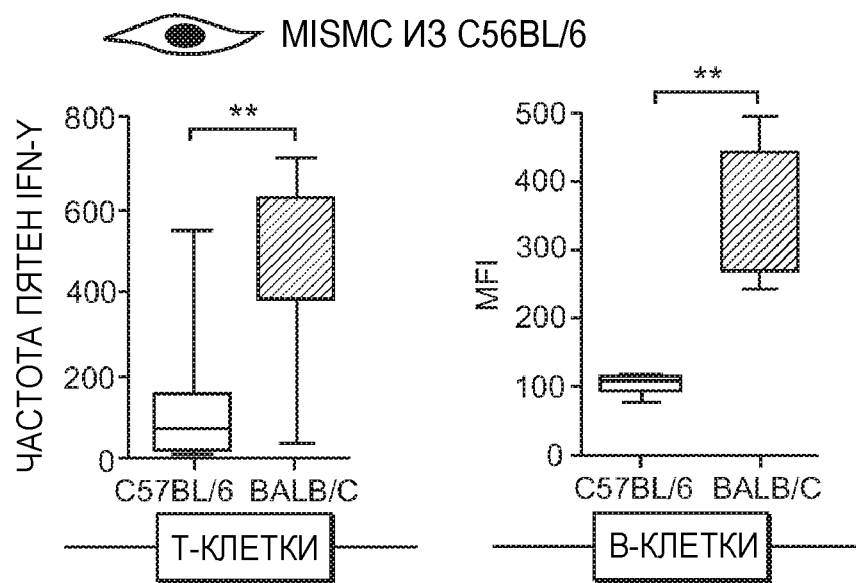
ФИГ.22В



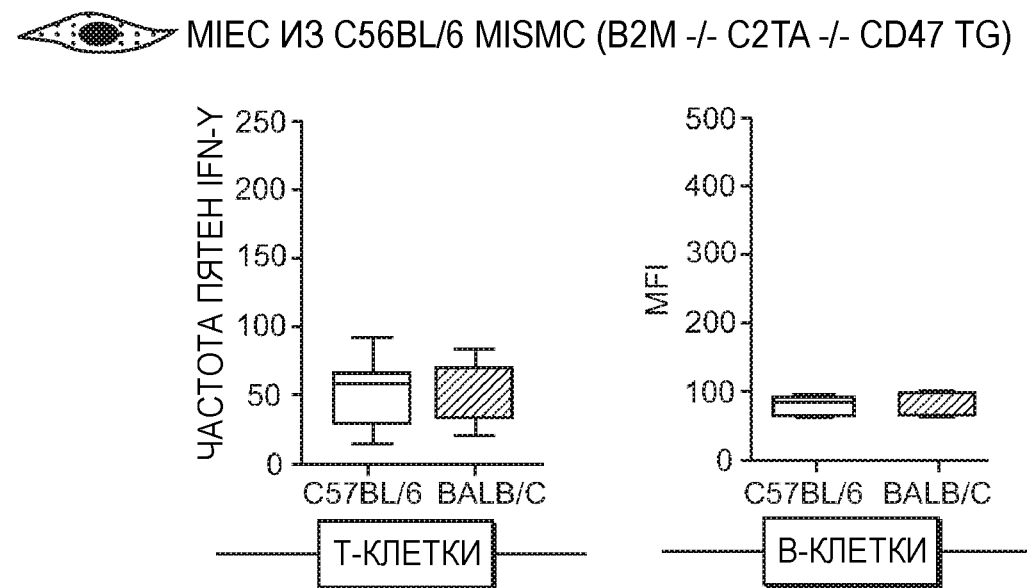
ФИГ.22С



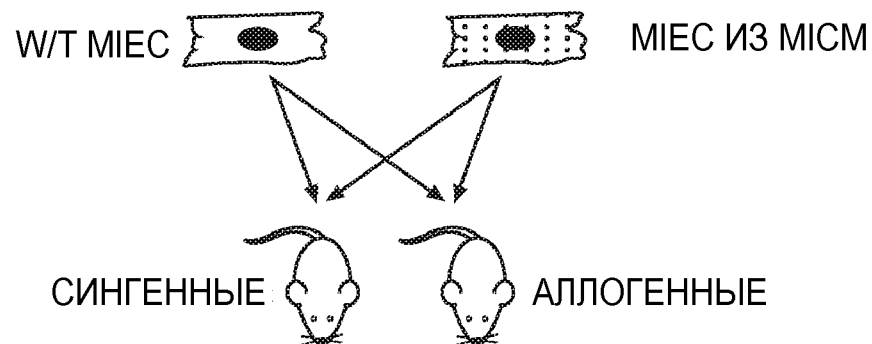
ФИГ.23А



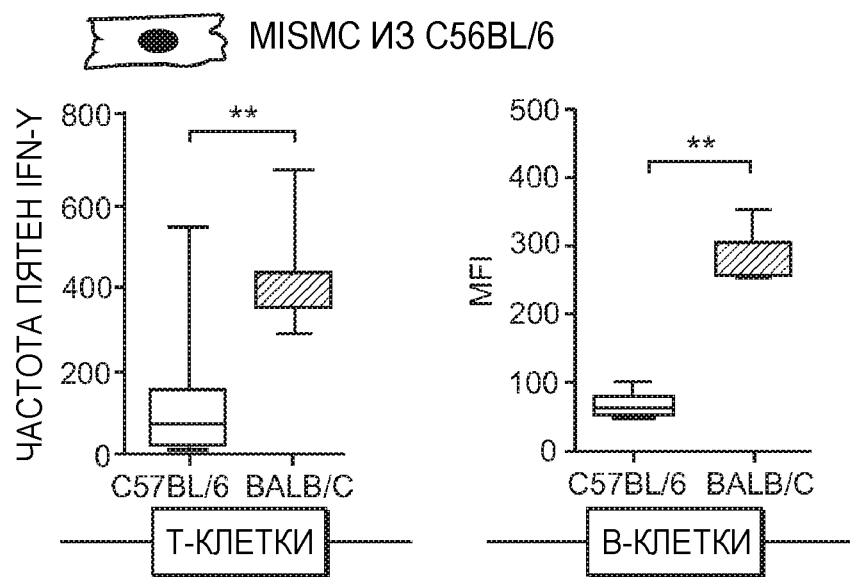
ФИГ.23В



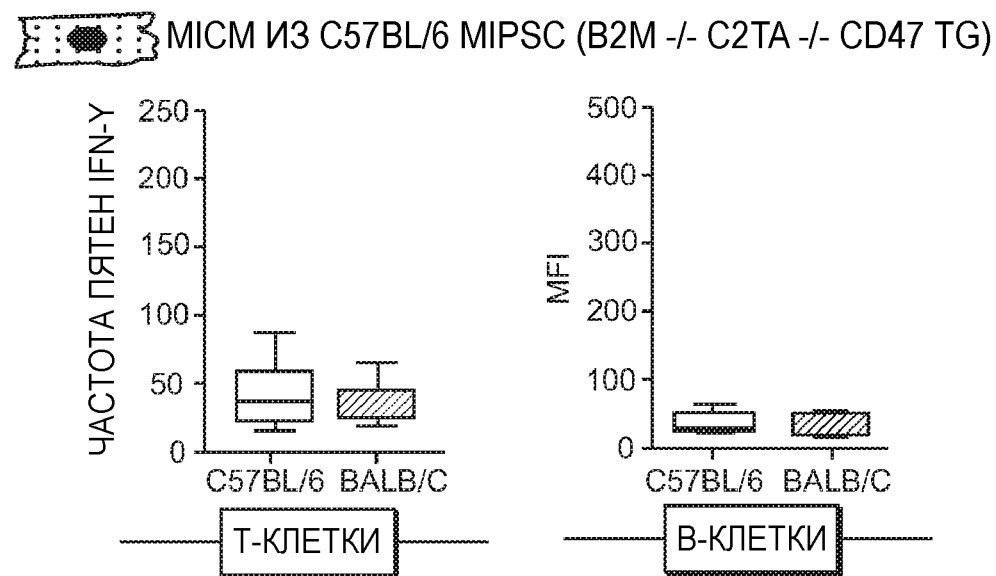
ФИГ.23С



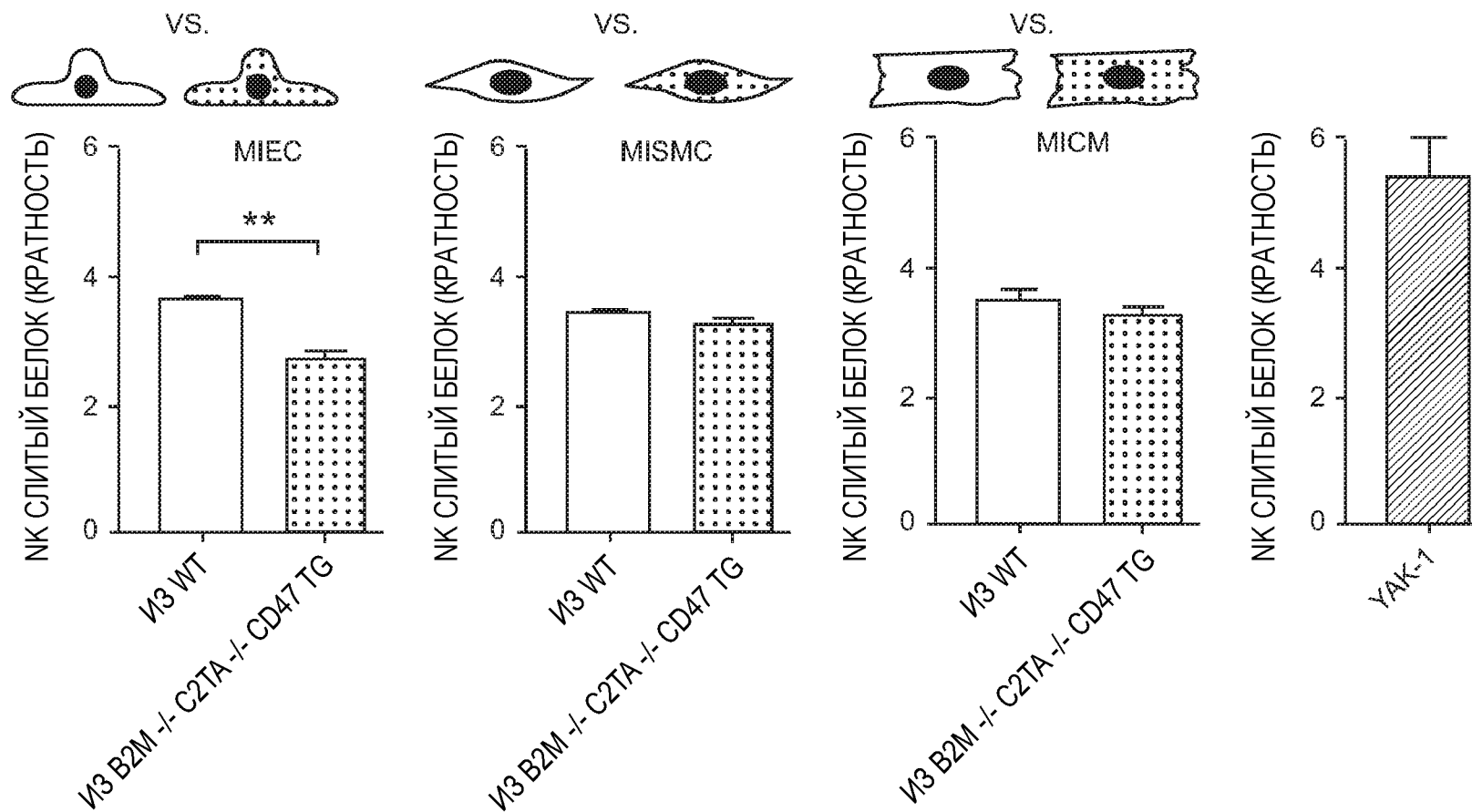
ФИГ.24А



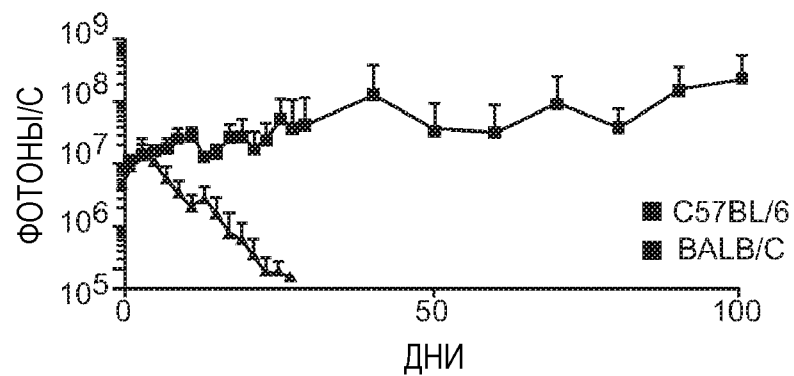
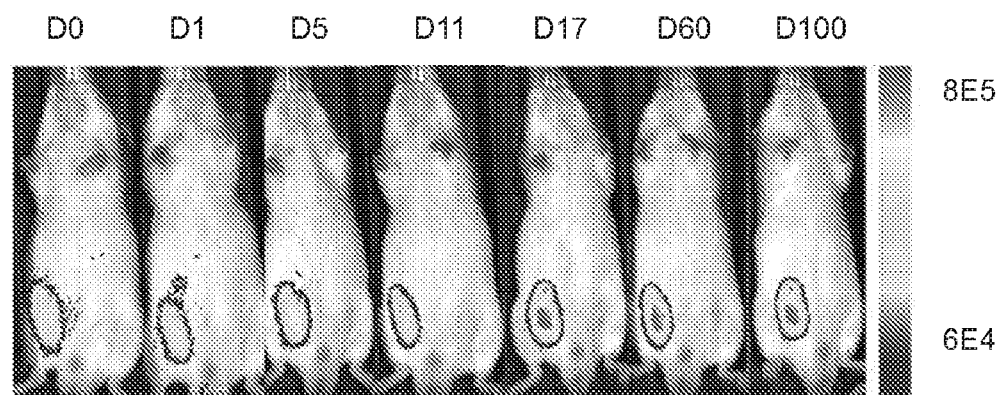
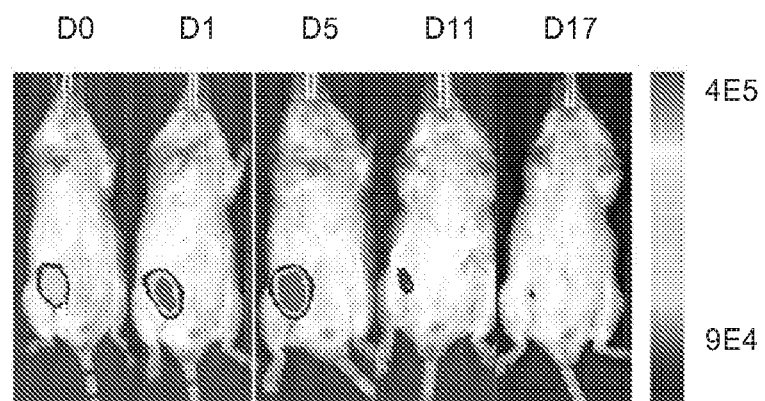
ФИГ.24В



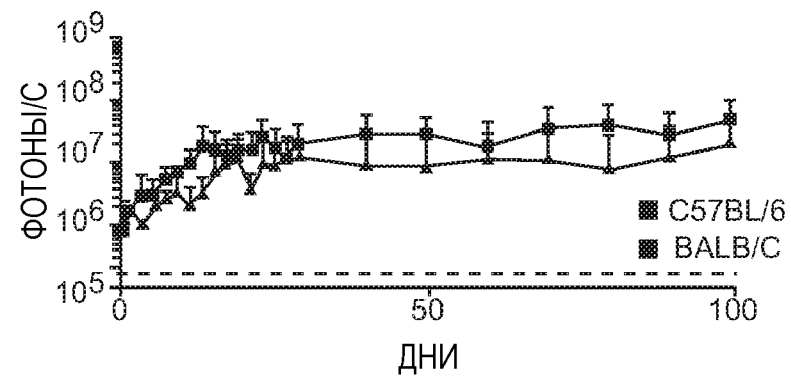
ФИГ.24С



ФИГ.25

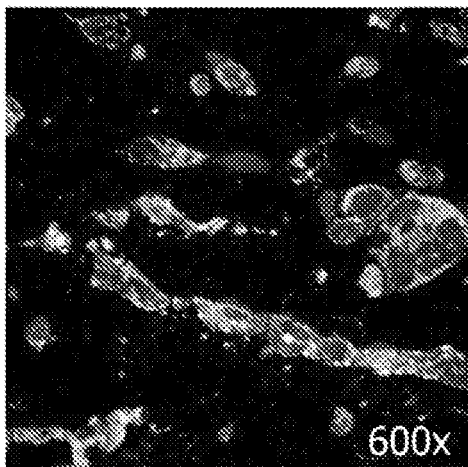


ФИГ.26А

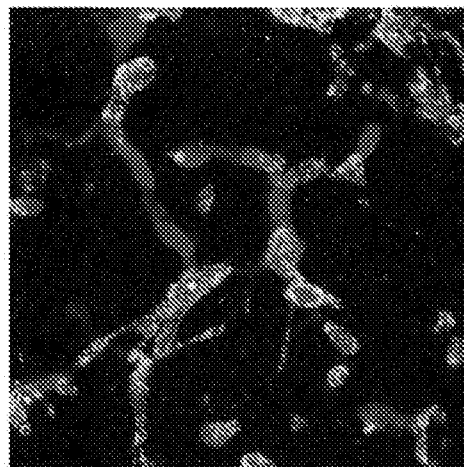


ФИГ.26В

1 НЕДЕЛЯ



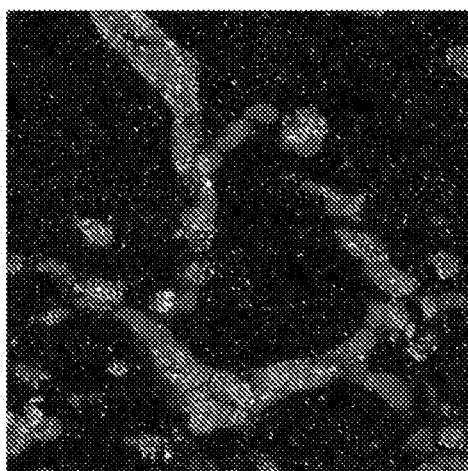
2 НЕДЕЛЯ



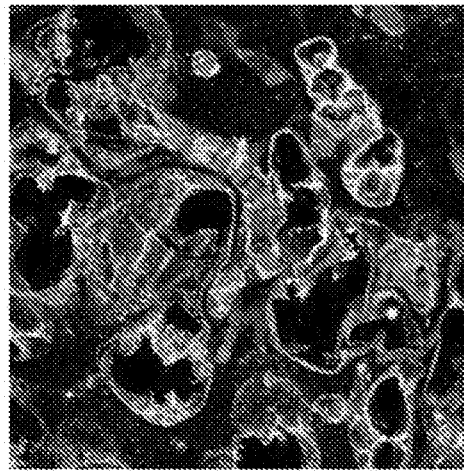
3 НЕДЕЛЯ



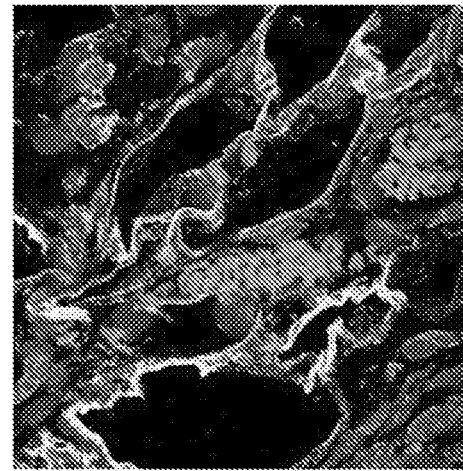
4 НЕДЕЛЯ



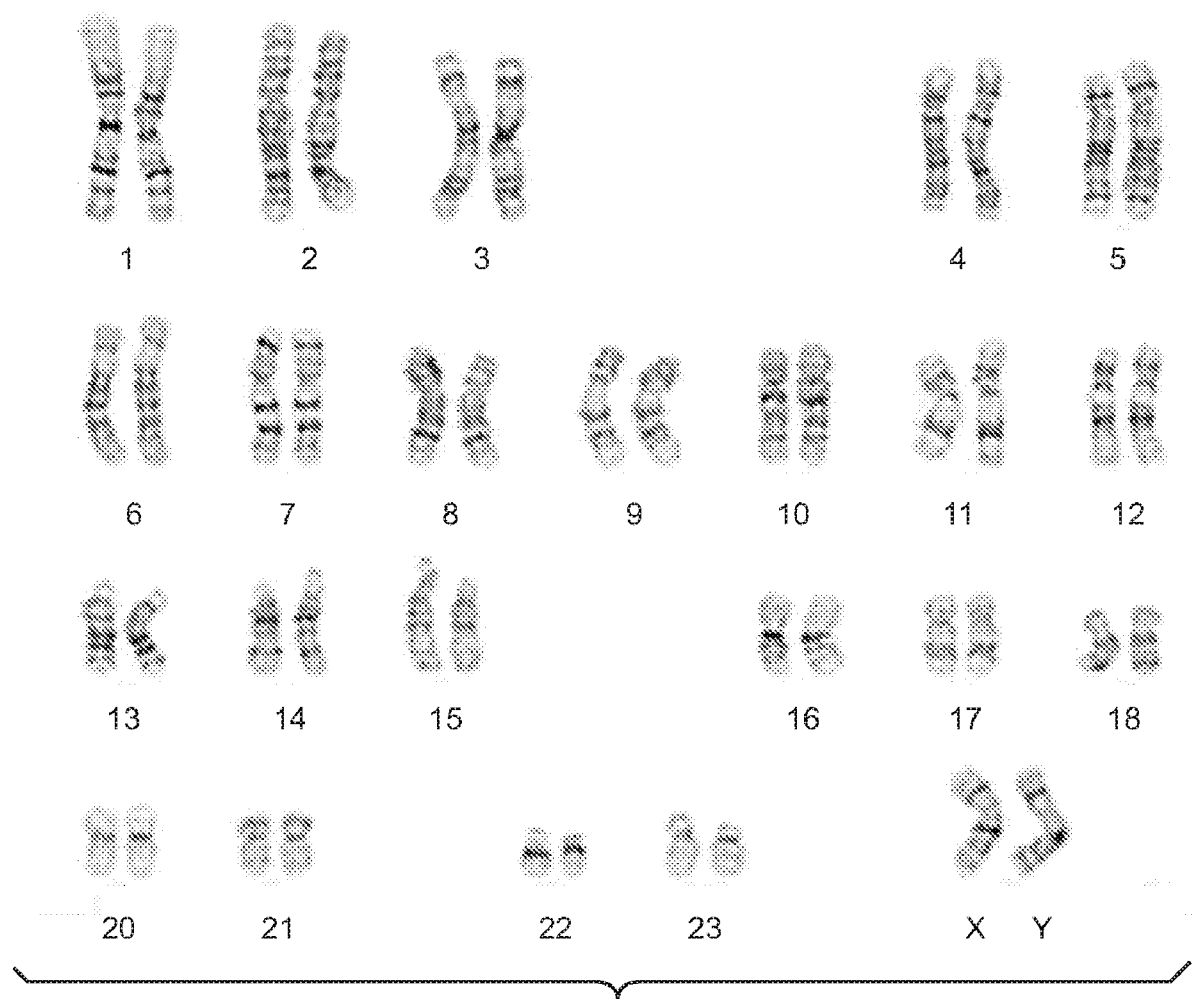
5 НЕДЕЛЯ



6 НЕДЕЛЯ

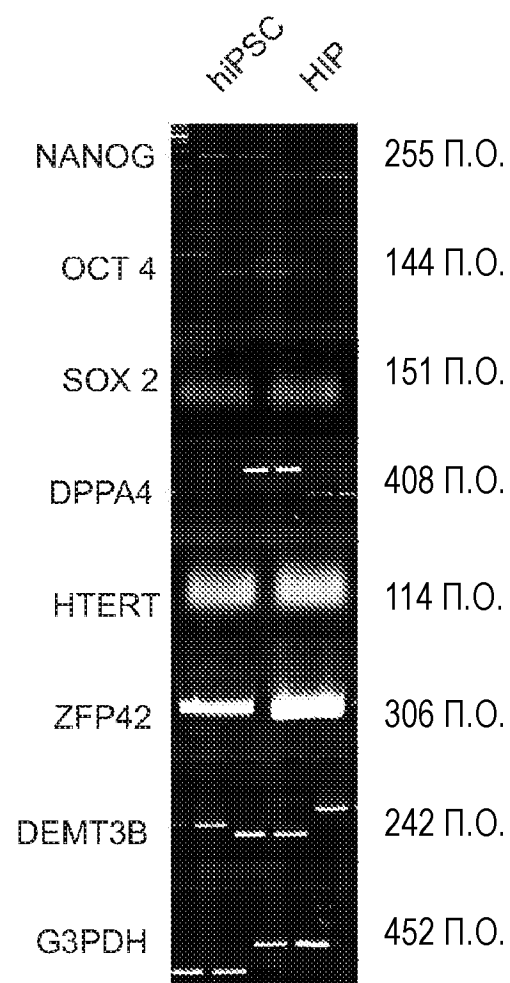


ФИГ.27

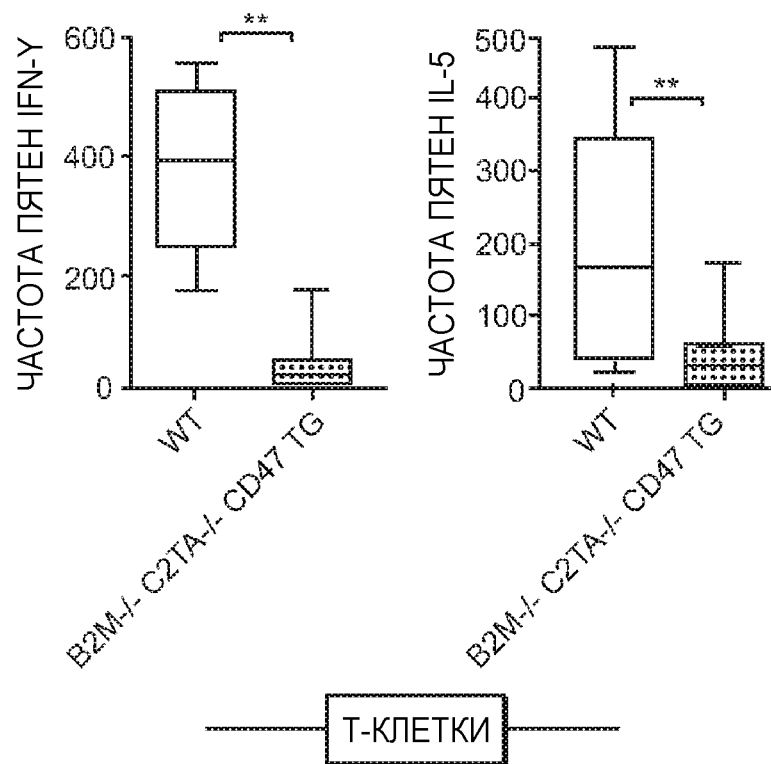


ФИГ.28

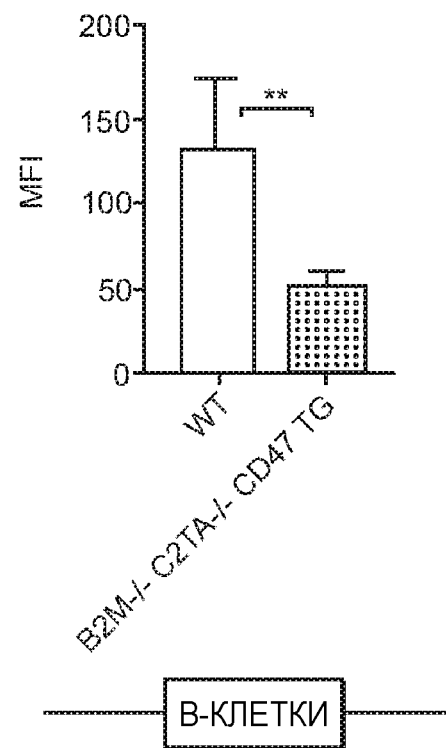
ПЦР НА ГЕНЫ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ:



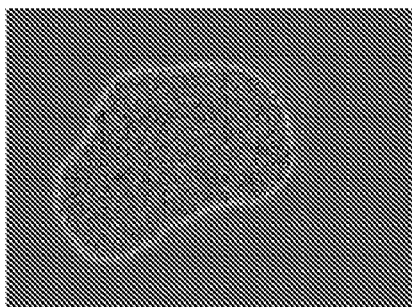
ФИГ.29



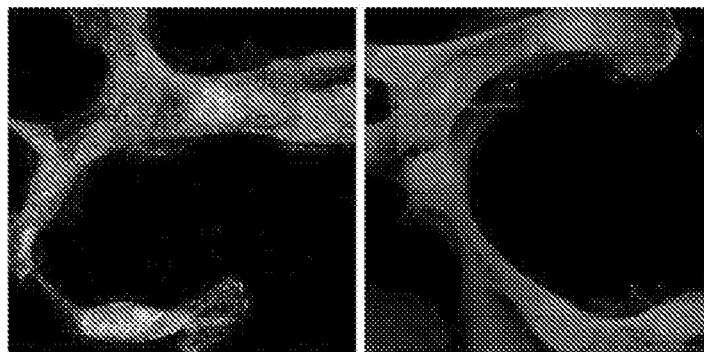
ФИГ.30А



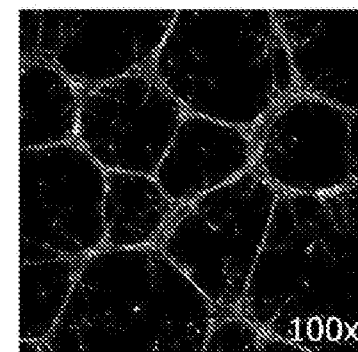
ФИГ.30В



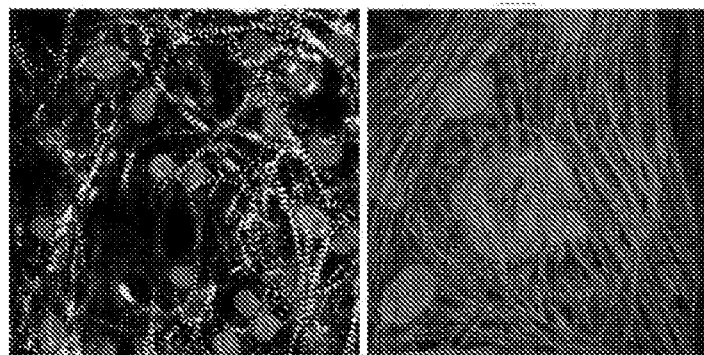
ФИГ.31А



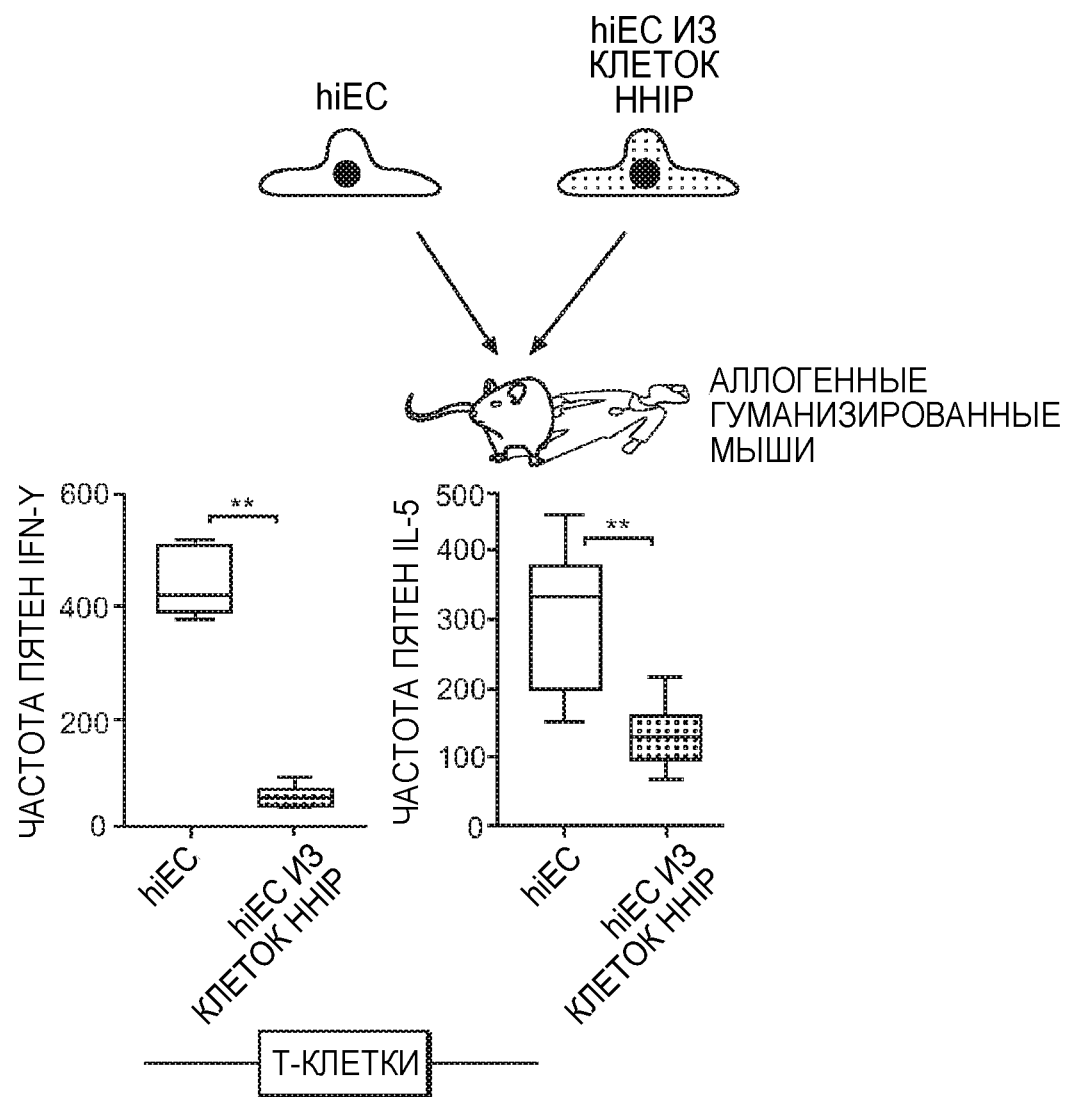
ФИГ.31В



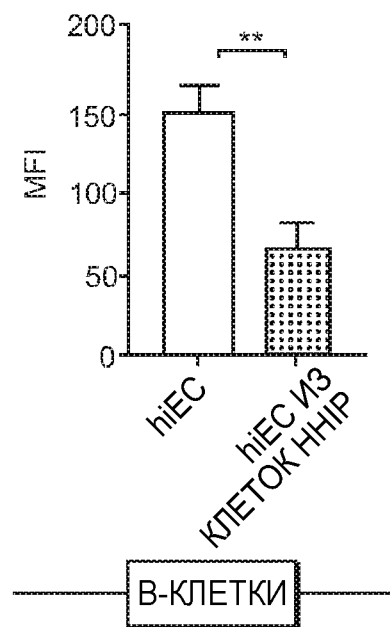
ФИГ.31D



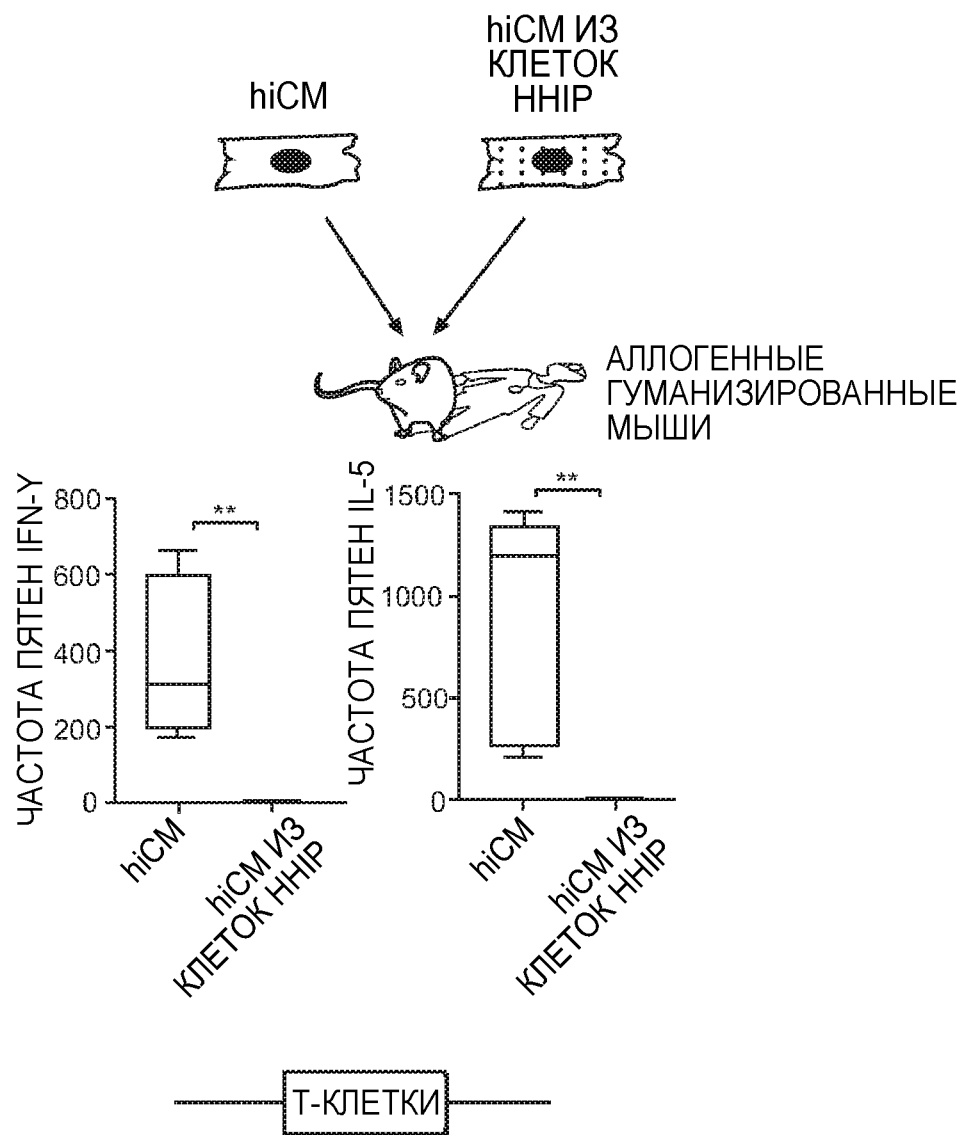
ФИГ.31С



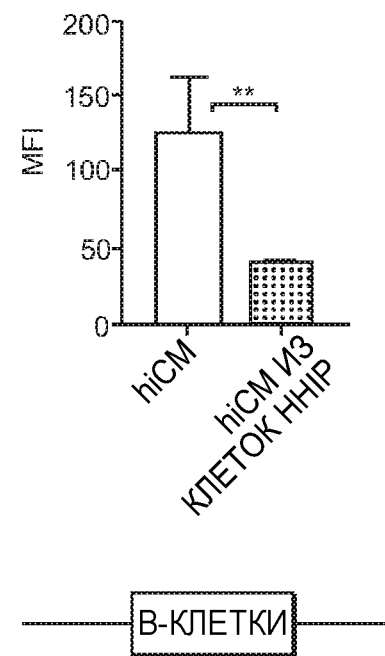
ФИГ.32А



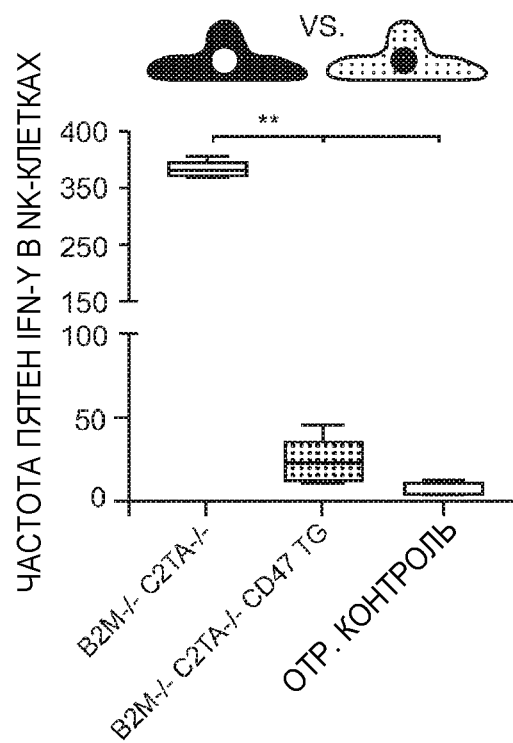
ФИГ.32В



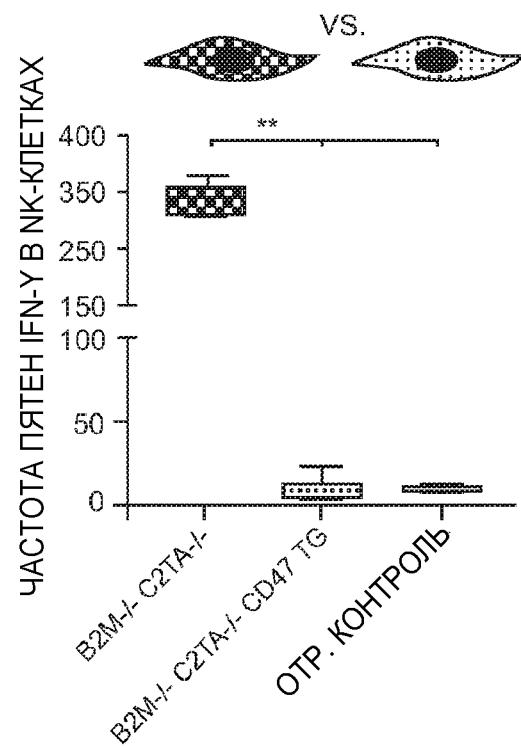
ФИГ.33А



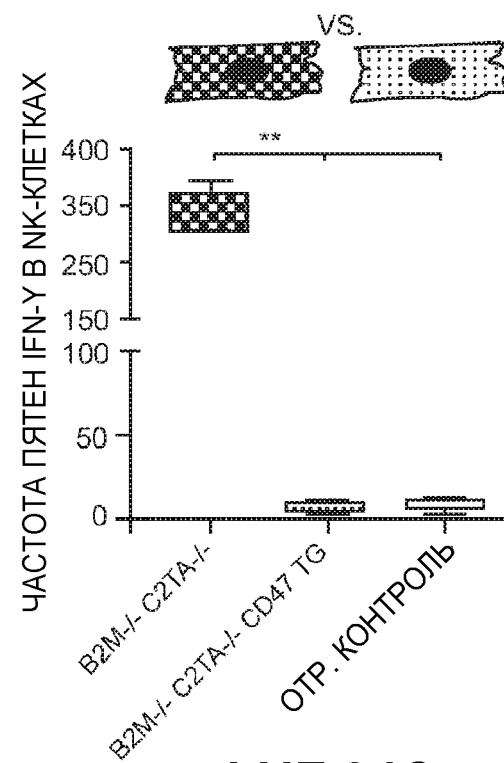
ФИГ.33В



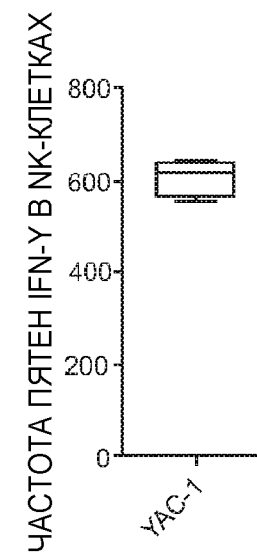
ФИГ.34А



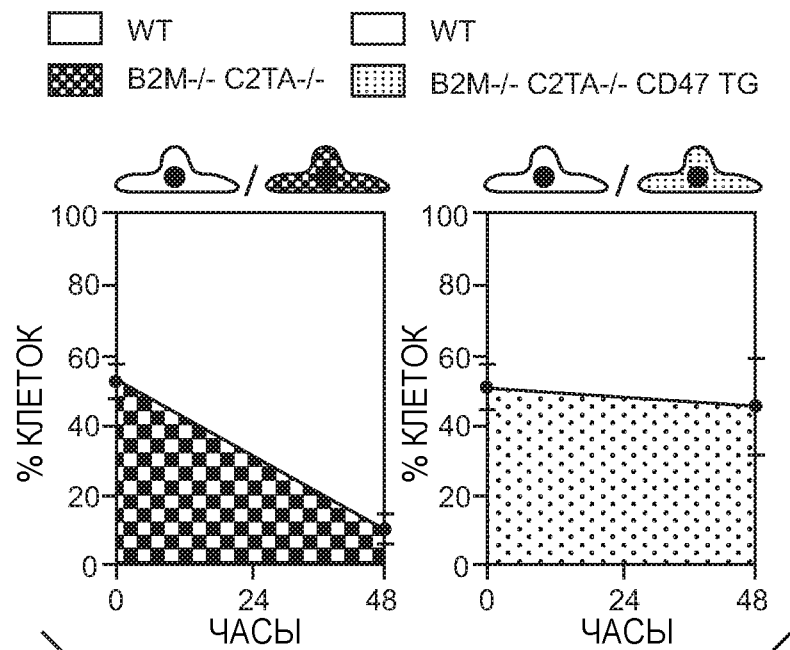
ФИГ.34В



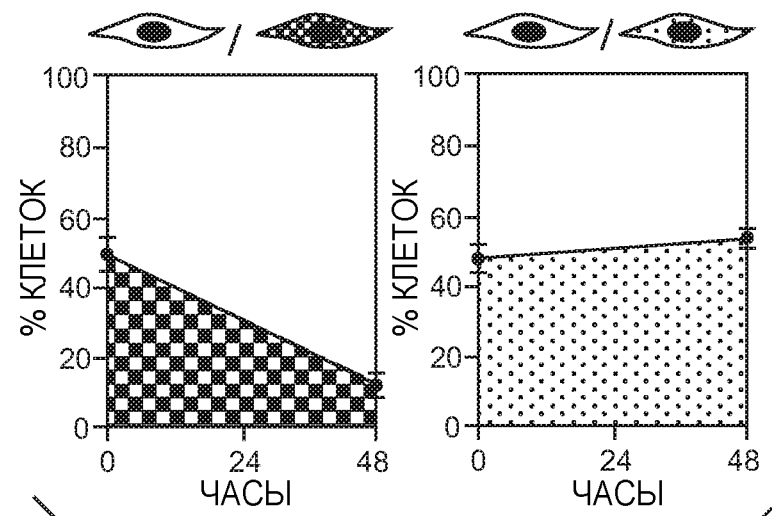
ФИГ.34С



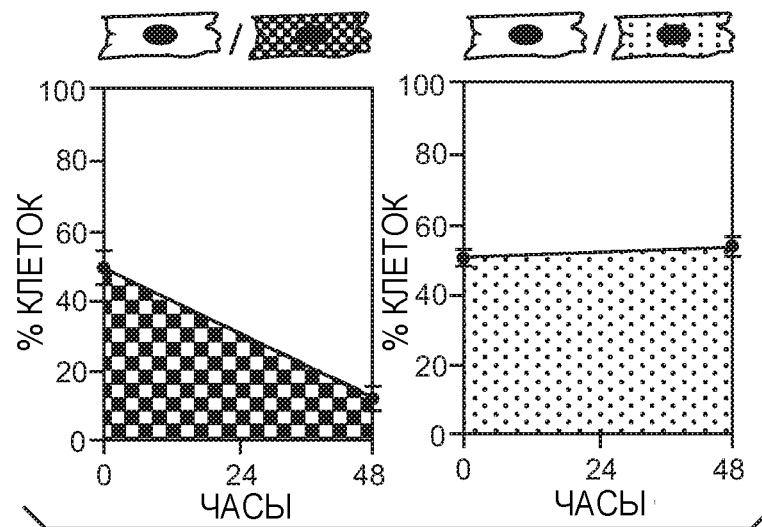
ФИГ.34Д



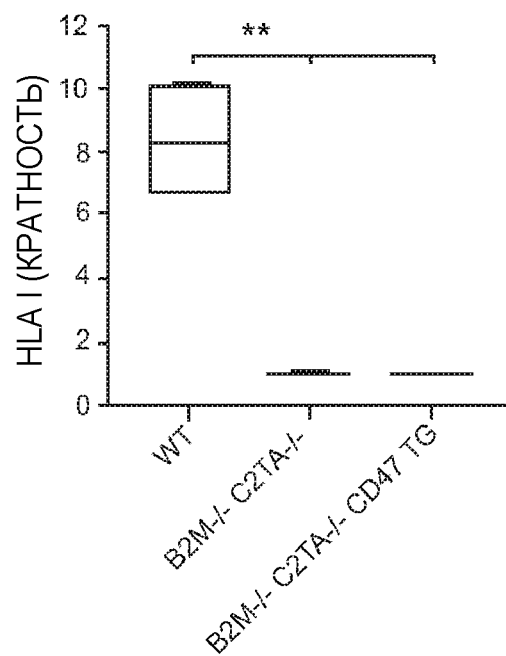
ФИГ.35А



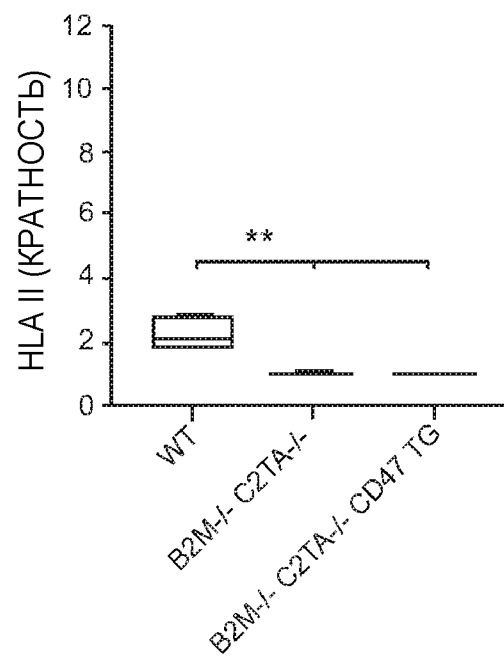
ФИГ.35В



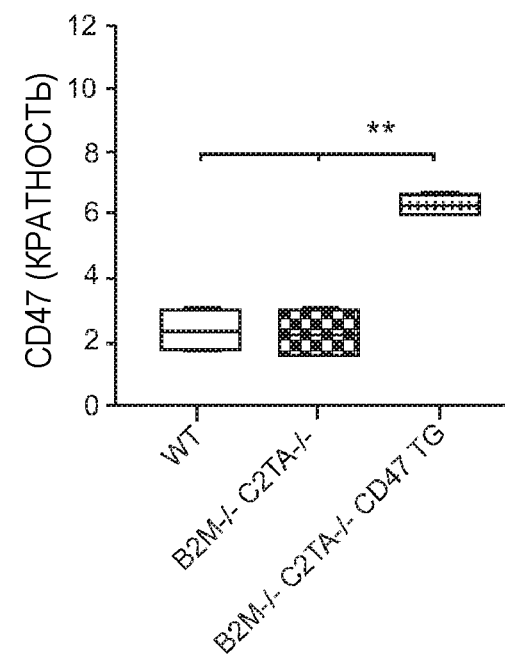
ФИГ.35С



ФИГ.36А



ФИГ.36В



ФИГ.36С

ФИГ.37А

ФИГ.37В

