

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992440** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.05.12

(51) Int. Cl. *C12N 5/0735* (2010.01)  
*C12N 5/0783* (2010.01)  
*C12N 5/0775* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.05.25

(54) **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ  
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ**

(31) 62/511,907; 62/514,467

(72) Изобретатель:  
Гшвенг Эрик, Родригез Рубен, Оуян  
Юн (US)

(32) 2017.05.26; 2017.06.02

(33) US

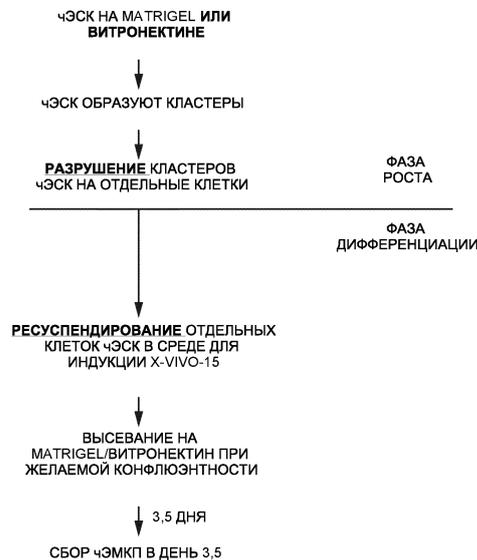
(86) PCT/US2018/034567

(74) Представитель:  
Нилова М.И. (RU)

(87) WO 2018/218105 2018.11.29

(71) Заявитель:  
КАЙТ ФАРМА, ИНК. (US)

(57) В настоящем изобретении предложен способ получения некластеризованных стволовых клеток. Разрушение кластеров перед мезодермальной дифференцировкой повышает выход и эффективность чЭМКП (эмбриональных мезенхимальных клеток-предшественников человека) и дифференцировки Т-клеток. Таким образом, данный способ обеспечивает развитие улучшенных способов чЭМКП и дифференцировки Т-клеток.



201992440

A1

A1

201992440

## **СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки США № 62/511,907, поданной 26 мая 2017 года, и предварительной заявки США № 62/514,467, поданной 2 июня 2017 года, обе из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[2] Различные типы рака человека по своей природе состоят из нормальных клеток, которые подверглись генетическому или эпигенетическому перерождению и стали абнормальными раковыми клетками. При этом раковые клетки начинают экспрессировать белки и другие антигены, отличные от экспрессируемых нормальными клетками. Эти aberrantные опухолевые антигены могут использоваться иммунной системой организма для специфичного нацеливания на раковые клетки и их уничтожения. Однако раковые клетки используют различные механизмы для препятствования успешному нацеливанию на иммунных клеток, таких как Т- и В-лимфоциты, на раковые клетки.

[3] Применяющиеся на сегодняшний день средства Т-клеточной терапии основаны на том, что обогащенные или модифицированные Т-клетки человека нацеливаются на раковые клетки у пациента и уничтожают их уничтожения. Полученные от пациента или нормального донора Т-клетки являются конечными по своей природе, поскольку им не свойственно самообновление. Получение Т-клеток из источника стволовых клеток обеспечит потенциально неограниченный источник клеток для терапевтического применения. Существует потребность в эффективных способах дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в эмбриональные мезодермальные предшественники и зрелые Т-клетки *in vitro*.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[4] Настоящее изобретение удовлетворяет данную потребность за счет, среди прочего, обеспечения улучшенных способов получения эмбриональных мезенхимальных клеток-предшественников человека (чЭМКП, human embryonic mesenchymal progenitor cells, hEMP), производных указанных клеток, а также применения указанных клеток и производных для эффективного получения Т-клеток.

[5] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения эмбриональных мезенхимальных клеток-предшественников человека (чЭМКП), причем указанный способ включает этапы осуществления контакта некластеризованных стволовых клеток с субстратом при заданной плотности отдельных клеток; культивирования стволовых клеток в условиях культивирования, способствующих росту клеток, до желаемой конfluence; и изменения условий культивирования для индукции дифференцировки стволовых клеток в чЭМКП в течение желаемого времени инкубации; с получением посредством этого чЭМКП.

[6] В некоторых вариантах реализации некластеризованные стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) человека. В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК по происхождению являются клетками человека (человеческими клетками).

[7] В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК представляют собой клетки H1, клетки H9, клетки HES3, клетки HSF1, клетки HSF6, клетки ESI-017, клетки CS02iCTR-NTn1, клетки CS03iCTR-NTn1, клетки CS80iCTR-Tn3, клетки CS179iCTR-NTn1, клетки CS201iCTR-NTn4, клетки CS202iCTR-NTn2 или клетки CS206iCTR-Tn5.

[8] В некоторых вариантах реализации заданная плотность отдельных клеток составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^5$  до приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>. В некоторых вариантах реализации заданная плотность отдельных клеток составляет приблизительно  $1,89 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,6 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,79 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $7,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> или приблизительно  $7,58 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>.

[9] В некоторых вариантах реализации субстрат покрывают матриксом Matrigel® или рекомбинантным витронектином человека, но не эмбриональными

фибробластами мыши (ЭФМ). В некоторых вариантах реализации субстрат представляет собой луночный планшет, чашку для клеточных культур, мембрану, мешок, культуральный флакон, инвертированный опал, полимерную сетку, суспензию статичных клеток, суспензию перемешиваемых клеток или обработанный плазмой полимер. В некоторых вариантах реализации субстрат содержит мембрану.

[10] В некоторых вариантах реализации условия культивирования, способствующие росту клеток, включают культивирование стволовых клеток в среде mTeSR1. В некоторых вариантах реализации среда mTeSR1 дополнительно содержит ингибитор ROCK. В некоторых вариантах реализации среда mTeSR1 дополнительно содержит ингибитор ROCK Y27632.

[11] В некоторых вариантах реализации клетки выращивают до желаемой конфлюэнтности от приблизительно 20% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах реализации конфлюэнтность составляет приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70% или приблизительно 80%.

[12] В некоторых вариантах реализации этап изменения условий культивирования включает культивирование клеток в культуральной среде X-VIVO™ 15.

[13] В некоторых вариантах реализации время инкубации составляет от приблизительно 2 до приблизительно 4 дней. В некоторых вариантах реализации время инкубации составляет приблизительно 2,0, приблизительно 2,5, приблизительно 3,0, приблизительно 3,5 или приблизительно 4,0 дня. В некоторых вариантах реализации время инкубации составляет приблизительно 3,5 дня.

[14] В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает этап дифференцировки чЭМКП в Т-клетки.

[15] В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает этап разрушения кластеров стволовых клеток для получения некластеризованных стволовых клеток. В некоторых вариантах реализации кластеры стволовых клеток разрушают путем механического или химического разрушения. В некоторых вариантах реализации химическое разрушение включает инкубацию с трипсиноподобным ферментом (Trypsin-like enzyme, TrypLE). В некоторых вариантах реализации трипсиноподобный

фермент представляет собой трипсин, TrypLE Express, TrypLE Select, коллагеназу, диспазу или трипсин-ЭДТА.

[16] В некоторых вариантах реализации эмбриональную мезенхимальную клетку-предшественника человека (чЭМКП) получают в соответствии со способом, описанным в настоящем документе.

[17] В одном аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая популяцию эмбриональных мезенхимальных клеток-предшественников человека (чЭМКП), полученных в соответствии со способом, описанным в настоящем документе.

[18] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ получения Т-клеток, причем указанный способ включает этапы: осуществления контакта некластеризованных стволовых клеток с субстратом при заданной плотности отдельных клеток, причем стволовые клетки не содержат эмбриональные фибробласты мыши (ЭФМ); культивирования стволовых клеток в условиях культивирования, способствующих росту клеток, до желаемой конfluence; и изменения условий культивирования для индукции дифференцировки стволовых клеток в Т-клетки в течение желаемого времени инкубации; с получением посредством этого Т-клеток из стволовых клеток.

[19] В некоторых вариантах реализации стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) человека. В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК по происхождению являются клетками человека.

[20] В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК представляют собой клетки H1, клетки H9, клетки HES3, клетки HSF1, клетки HSF6, клетки ESI-017, клетки CS02iCTR-NTn1, клетки CS03iCTR-NTn1, клетки CS80iCTR-Tn3, клетки CS179iCTR-NTn1, клетки CS201iCTR-NTn4, клетки CS202iCTR-NTn2 или клетки CS206iCTR-Tn5.

[21] В некоторых вариантах реализации заданная плотность отдельных клеток составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^5$  до приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>. В некоторых вариантах реализации заданная плотность отдельных клеток составляет приблизительно  $1,89 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,6 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>,

приблизительно  $3,79 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $7,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> или приблизительно  $7,58 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>.

**[22]** В некоторых вариантах реализации на субстрат нанесен Matrigel® или рекомбинантный витронектин человека, но не эмбриональные фибробласты мыши (ЭФМ). В некоторых вариантах реализации субстрат представляет собой луночный планшет, чашку для клеточных культур, мембрану, мешок, культуральный флакон, инвертированный опал, полимерную сетку, суспензию статичных клеток, суспензию перемешиваемых клеток или обработанный плазмой полимер. В некоторых вариантах реализации субстрат содержит мембрану.

**[23]** В некоторых вариантах реализации условия культивирования, способствующие росту клеток, включают культивирование стволовых клеток в среде mTeSR1. В некоторых вариантах реализации среда mTeSR1 дополнительно содержит ингибитор ROCK. В некоторых вариантах реализации среда mTeSR1 дополнительно содержит ингибитор ROCK Y27632.

**[24]** В некоторых вариантах реализации клетки выращивают до желаемой конфлюэнтности от приблизительно 20% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах реализации конфлюэнтность составляет приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70% или приблизительно 80%.

**[25]** В некоторых вариантах реализации этап изменения условий культивирования включает культивирование клеток в культуральной среде X-VIVO™15.

**[26]** В некоторых вариантах реализации время инкубации составляет от приблизительно 2 до приблизительно 4 дней. В некоторых вариантах реализации время инкубации составляет приблизительно 2,0, приблизительно 2,5, приблизительно 3,0, приблизительно 3,5 или приблизительно 4,0 дня. В некоторых вариантах реализации время инкубации составляет приблизительно 3,5 дня.

**[27]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена Т-клетка, полученная в соответствии со способом, описанным в настоящем документе.

**[28]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена композиция, содержащая популяцию Т-клеток, полученных в соответствии со способом, описанным в настоящем документе.

[29] Любой аспект или вариант реализации, описанный в настоящем документе, можно объединить с любым другим аспектом или вариантом реализации, раскрытым в настоящем документе. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, приведенное ниже описание предназначено для иллюстрации, а не ограничения, объема настоящего изобретения, который определен объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации относятся к объему приведенной ниже формулы изобретения.

[30] Патентная и научная литература, ссылки на которую приведены в настоящем документе, составляет уровень знаний, доступный специалистам в данной области техники. Все патенты Соединенных Штатов и опубликованные или неопубликованные заявки на патенты Соединенных Штатов, упоминаемые в настоящем документе, включены посредством ссылки. Все опубликованные зарубежные патенты и заявки на патенты, упоминаемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки. Все другие опубликованные источники, словари, документы, рукописи и научная литература, упоминаемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки.

[31] Другие свойства и преимущества настоящего изобретения будут очевидны на основании чертежей и приведенного ниже подробного описания изобретения, включая примеры, а также формулы изобретения.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[32] Приведенные выше и ниже свойства станут более определенно понятны из последующего подробного описания во взаимосвязи с прилагаемыми чертежами. Однако чертежи предназначены исключительно для иллюстративных целей, а не для ограничения.

[33] На фигуре 1 представлены иллюстративные данные проточной цитометрии, иллюстрирующие изменение экспрессированных на поверхности CD326 и CD56.

[34] На фигуре 2 представлен сводный график иллюстративных данных проточной цитометрии, иллюстрирующий изменение экспрессированных на поверхности CD326 и CD56.

[35] На фигуре 3 представлена иллюстративная блок-схема получения чЭМКП из ЭСК или иПСК.

[36] На фигуре 4 представлены иллюстративные данные проточной цитометрии, иллюстрирующие изменение экспрессированных на поверхности CD326 и CD56 на субстратах Matrigel® и витронектин.

[37] На фигуре 5 представлена иллюстративная блок-схема получения чЭМКП из ЭСК или иПСК.

[38] На фигуре 6 представлены данные проточной цитометрии, иллюстрирующие клетки, – чистоту индуцированных и отсортированных чЭМКП. Чистота после сортировки, как было определено, составила >95% как для отличных от чЭМКП клеток, так и для чЭМКП.

[39] На фигуре 7 представлены данные проточной цитометрии, иллюстрирующие анализ развития Т-клеток в неделю 4. Собранные клетки окрашивали антителами в отношении следующих антигенов: CD45, CD56, CD3, CD4, CD8, ТCR $\alpha\beta$  (Т-клеточный рецептор  $\alpha\beta$ ).

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[40] Чтобы настоящее изобретение было легче понять, для начала ниже будут определены некоторые термины. Дополнительные определения для следующих и других терминов приведены по всему настоящему описанию.

[41] В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают указания на объекты во множественном числе, если контекст однозначно не диктует обратное.

[42] Если не указано конкретно или если не очевидно из контекста, в настоящем документе термин «или» понимается как включающий и охватывает как «или», так и «и».

[43] Термин «и/или» в настоящем документе следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных свойств или компонентов вместе с другим свойством или компонентом либо без него. Таким образом, термин «и/или» во фразе, такой как «А и/или В», в настоящем документе предназначен для включения А и В, А или В, А (самого по себе) и В (самого по себе). Аналогично, термин «и/или» во фразе,

такой как «А, В и/или С», предназначен для включения каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (самого по себе); В (самого по себе); и С (самого по себе).

**[44]** Термины «например» и «т.е.» в настоящем документе используются исключительно в качестве примера, не предусматривая ограничения, и их не следует истолковывать как относящиеся только к объектам, явным образом перечисленным в описании.

**[45]** Термины «или более», «по меньшей мере», «более чем» и т.п., например, «по меньшей мере один», понимают как включающие, без ограничения, по меньшей мере 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, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 или 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или более, чем указанное значение. Также включено любое большее число или дробное число между указанными.

**[46]** И наоборот, термин «не более чем» включает каждое значение, меньшее, чем указанное значение. Например, «не более чем 100 нуклеотидов» включает 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 и 0 нуклеотидов. Также включено любое меньшее число или дробное число между указанными.

**[47]** Термины «множество», «по меньшей мере два», «два или более», «по меньшей мере второй» и т.п. понимают как включающие, без ограничения, по меньшей мере 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, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120,

121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 или 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 или более. Также включено любое большее число или дробное число между указанными.

**[48]** В текста описания слова «включающий» и «содержащий» либо их варианты, такие как «включает» и «содержит» или «включая», следует понимать как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа или этапа либо группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключающие какие-либо другой элемент, целое число или этап либо группу элементов, целых чисел или этапов. Понятно, что, когда в настоящем документе аспекты описаны словом «содержащий», также предложены в остальном аналогичные аспекты, описанные терминами «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

**[49]** Если не указано конкретно или если не очевидно из контекста, в настоящем документе термин «приблизительно» обозначает значение или композицию, которые находятся в пределах допустимой границы погрешности для конкретного значения или композиции, как определено средним специалистом в данной области техники, и допустимая граница погрешности отчасти будет зависеть от того, как значение или композицию измеряют или определяют, т.е. от пределов возможности системы измерения. Например, «приблизительно» или «состоящий по существу из» может обозначать в пределах одного или более одного стандартного отклонения согласно практике, принятой в данной области техники. «Приблизительно» или «состоящий по существу из» может обозначать диапазон вплоть до 10% (т.е.  $\pm 10\%$ ). Таким образом, «приблизительно» можно понимать как значение, находящееся в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01% или 0,001% более либо менее, чем указанное значение. Например, приблизительно 5 мг может включать любое число от 4,5 мг до 5,5 мг. Более того, что в особенности применимо к биологическим системам или процессам, термины могут обозначать вплоть до порядка величины или вплоть до 5-кратного значения. Когда в настоящем изобретении приведены конкретные значения или композиции, если не указано обратное, значение «приблизительно» или «состоящий по существу из» следует считать находящимся в пределах допустимой границы погрешности для данного конкретного значения или композиции.

**[50]** Как описано в настоящем документе, любой диапазон концентрации, диапазон процентов, диапазон соотношения или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах приведенного диапазона и, если применимо, их долей (таких как одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано обратное.

**[51]** Единицы, префиксы и символы, используемые в настоящем документе, приведены с использованием их формы, принятой в системе СИ (Système International de Unites, SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон.

**[52]** Если не указано обратное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое общепринято понимают специалисты в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, руководства Juo, “The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology”, 2nd ed., (2001), CRC Press; “The Dictionary of Cell & Molecular Biology”, 5th ed., (2013), Academic Press; и “The Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology”, Cammack et al. eds., 2nd ed, (2006), Oxford University Press обеспечивают специалистов в данной области техники общим словарем для множества терминов, используемых в настоящем изобретении.

**[53]** «Введение» обозначает физическое внесение средства субъекту с применением любого из множества способов или систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Иллюстративные пути введения составов, раскрытых в настоящем документе, включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, интраперитонеальный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Фраза «парентеральное введение» в настоящем документе обозначает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно с помощью инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутридермальную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, подпаутинную, внутривозвоночную, эпидуральную и интратермальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах реализации состав вводят непарентеральным путем, например, перорально. Другие непарентеральные пути включают местный, эпидермальный путь введения или введение через слизистые

оболочки, например, интраназально, вагинально, ректально, подъязычно или местно. Введение также можно осуществлять, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных промежутков времени.

**[54]** В настоящем документе антигенсвязывающая молекула, антитело или его антигенсвязывающая молекула «перекрестно конкурирует» с эталонным антителом или его антигенсвязывающей молекулой, если взаимодействие между антигеном и первой связывающей молекулой, антителом или его антигенсвязывающей молекулой блокирует, ограничивает, ингибирует или иным способом снижает способность эталонной связывающей молекулы, эталонного антитела или его антигенсвязывающей молекулы взаимодействовать с антигеном. Перекрестная конкуренция может быть полной, например, связывание связывающей молекулы с антигеном полностью блокирует способность эталонной связывающей молекулы связываться с антигеном, или может быть частичной, например, связывание связывающей молекулы с антигеном снижает способность эталонной связывающей молекулы связываться с антигеном. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывается с тем же или перекрывающимся эпитопом, что и эталонная антигенсвязывающая молекула. В других вариантах реализации антигенсвязывающая молекула, которая перекрестно конкурирует с эталонной антигенсвязывающей молекулой, связывается с эпитопом, отличным от эпитопа эталонной антигенсвязывающей молекулы. Множество типов анализов конкурентного связывания можно использовать для определения того, конкурирует ли антигенсвязывающая молекула с другой, например: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА); твердофазный прямой или непрямой ферментный иммуноанализ (ФИА); конкурентный анализ в «сэндвич»-формате (Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой ФИА на основе биотина-авидина (Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619); твердофазный прямой анализ с использованием метки, твердофазный прямой анализ в «сэндвич»-формате с использованием метки (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой РИА с использованием метки 1-125 (Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15), твердофазный прямой ФИА на основе биотина-авидина (Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552) и прямой РИА с использованием метки (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32:77-82).

**[55]** «Антиген» обозначает любую молекулу, которая вызывает иммунный ответ либо способна быть связанной антителом или антигенсвязывающей молекулой. Иммунный ответ может включать продукцию антител или активацию специфических иммунологически-компетентных клеток, либо оба данных события. Специалист в данной области техники легко понимает, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может выступать в качестве антигена. Антиген может экспрессироваться эндогенно, т.е. экспрессироваться геномной ДНК, или может экспрессироваться рекомбинантно. Антиген может быть специфичным для определенной ткани, такой как раковая клетка, или он может широко экспрессироваться. Помимо этого, фрагменты больших молекул могут выступать в качестве антигенов. В одном варианте реализации антигены представляют собой антигены опухоли.

**[56]** Термин «аллогенный» обозначает любой материал, полученный из одного индивидуума, который затем вводят другому индивидууму того же вида, например, трансплантация аллогенной Т-клетки.

**[57]** Термины «трансдукция» и «трансдуцированный» обозначают процесс, посредством которого чужеродную ДНК вводят в клетку с помощью вирусного вектора (см. руководство Jones et al., “ Genetics: principles and analysis,” Boston: Jones & Bartlett Publ (1998)). В некоторых вариантах реализации вектор представляет собой ретровирусный вектор, вектор ДНК, вектор РНК, аденовирусный вектор, бакуловирусный вектор, вектор на основе вируса Эпштейна-Барр, паповавирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, вектор на основе вируса простого герпеса, аденовирус-ассоциированный вектор, лентивирусный вектор или любую комбинацию указанных векторов.

**[58]** «Рак» обозначает широкую группу различных заболеваний, которые характеризуются неконтролируемым ростом абнормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые инвазируют соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или сосудистое русло. «Рак» или «раковая ткань» могут включать опухоль. Примеры типов рака, которые можно лечить способами согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, типы рака иммунной системы, включая лимфому, лейкоз, миелому и другие злокачественные образования лейкоцитов. В некоторых вариантах реализации способы согласно настоящему изобретению можно применять для снижения размера опухоли для опухоли,

полученной, например, из рака кости, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака головы или шеи, кожной или внутриглазной злокачественной меланомы, рака матки, рака яичников, рака прямой кишки, рака заднепроходной области, рака желудка, рака яичек, рака матки, карциномы фаллопиевых труб, карциномы эндометрия, карциномы шейки матки, карциномы влагалища, карциномы наружных половых органов, множественной миеломы, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы (НХЛ), первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы (ПМВКЛ), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (ДВКЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), трансформированной фолликулярной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), рака пищевода, рака тонкого кишечника, рака эндокринной системы, рака щитовидной железы, рака паращитовидной железы, рака надпочечников, саркомы мягкой ткани, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, хронического или острого лейкоза, острого миелоидного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) (включая отличный от Т-клеточного ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), солидных опухолей детского возраста, лимфоцитарной лимфомы, рака мочевого пузыря, рака почек или мочеточника, карциномы почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичной лимфомы ЦНС, ангиогенеза опухоли, опухоли оси позвоночника, глиомы ствола мозга, аденомы гипофиза, саркомы Капоши, эпидермоидного рака, плоскоклеточного рака, Т-клеточной лимфомы, типов рака, вызванных условиями окружающей среды, включая типы рака, вызванные азбестом, других В-клеточных злокачественных образований и комбинаций указанных типов рака. В одном конкретном варианте реализации рак представляет собой множественную миелому. Конкретный рак может реагировать на химио- или лучевую терапию или рак может быть трудно поддающимся лечению. Трудно поддающийся лечению рак обозначает рак, который не поддается улучшению путем хирургического вмешательства, и рак либо изначально не реагирует на химио- или лучевую терапию, либо становится нереагирующим в течение времени.

**[59]** «Противоопухолевый эффект» в настоящем документе обозначает биологический эффект, который может возникать в виде снижения объема опухоли, снижения числа опухолевых клеток, снижения пролиферации опухолевых клеток, снижения числа метастазов, увеличения общей выживаемости или выживаемости без прогрессирования заболевания, увеличения ожидаемой продолжительности жизни или

облегчении различных физиологических симптомов, связанных с опухолью. Противоопухолевый эффект может также обозначать предотвращение возникновения опухоли, например, вакцину.

**[60]** «Цитокин» в настоящем документе обозначает белок, отличный от антитела, который высвобождается одной клеткой в ответ на контакт со специфичным антигеном, причем цитокин взаимодействует со второй клеткой, чтобы опосредовать ответ во второй клетке. Цитокин может эндогенно экспрессироваться клеткой или может быть введен субъекту. Цитокины могут высвобождаться иммунными клетками, включая макрофаги, В-клетки, Т-клетки и тучные клетки, для распространения иммунного ответа. Цитокины могут вызывать различные ответы в клетке-реципиенте. Цитокины могут включать гомеостатические цитокины, хемокины, провоспалительные цитокины, эффекторы и белки острой фазы. Например, гомеостатические цитокины, включая интерлейкин (ИЛ)-7 и ИЛ-15, способствуют выживаемости и пролиферации иммунных клеток, а провоспалительные цитокины могут способствовать воспалительному ответу. Примеры гомеостатических цитокинов включают, без ограничения, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12p40, ИЛ-12p70, ИЛ-15 и интерферон (ИФН) гамма. Примеры провоспалительных цитокинов включают, без ограничения, ИЛ-1a, ИЛ-1b, ИЛ-6, ИЛ-13, ИЛ-17a, фактор некроза опухоли (ФНО)-альфа, ФНО-бета, фактор роста фибробластов (ФРФ) 2, гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), растворимую молекулу межклеточной адгезии 1 (soluble intercellular adhesion molecule 1, sICAM-1), растворимую молекулу сосудистой адгезии 1 (soluble vascular adhesion molecule 1, sVCAM-1), фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), ФРЭС-С, ФРЭС-D и плацентарный фактор роста (ПФР). Примеры эффекторов включают, без ограничения, гранзим А, гранзим В, растворимый лиганд Fas (soluble Fas ligand, sFasL) и перфорин. Примеры белков острой фазы включают, без ограничения, С-реактивный белок (СРБ) и амилоид сыворотки А (serum amyloid A, SAA).

**[61]** «Хемокины» представляют собой тип цитокинов, которые опосредуют хемотаксис, или направленное движение клеток. Примеры хемокинов включают, без ограничения, ИЛ-8, ИЛ-16, эотаксин, эотаксин-3, макрофагальный хемокин (macrophage-derived chemokine, MDC или CCL22), моноцитарный хемотактический белок 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1 или CCL2), MCP-4, макрофагальный белок воспаления 1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , MIP-1a), MIP-1 $\beta$  (MIP-

1b), гамма-индуцированный белок 10 (IP-10) и хемокины, регулируемые тимусом и активацией (thymus and activation regulated chemokine, TARC или CCL17).

**[62]** «Терапевтически эффективное количество», «эффективная доза», «эффективное количество» или «терапевтически эффективная доза» терапевтического средства, например, сконструированных Т-клеток с ХАР (химерным антигенным рецептором), представляет собой любое количество, которое при применении само по себе или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает субъекта от манифестации заболевания или способствует ремиссии заболевания, что подтверждается снижением тяжести симптомов заболевания, повышением частоты и длительности периодов без симптомов заболевания либо предотвращением патологии или инвалидизации в связи с болезненным поражением. Способность терапевтического средства способствовать ремиссии заболевания можно оценить с применением множества способов, известных квалифицированному практику, например, на пациентах-людях в течение клинических исследований, на системах моделей на животных, позволяющих прогнозировать эффективность у человека, или путем оценки активности средства в анализах *in vitro*.

**[63]** Термин «лимфоцит» в настоящем документе включает клетки-природные киллеры (natural killer, NK), Т-клетки или В-клетки. NK-клетки представляют собой тип цитотоксических (токсичных по отношению к клеткам) лимфоцитов, которые представляют собой основной компонент врожденной иммунной системы. NK-клетки отбраковывают опухоли и клетки, инфицированные вирусом. Они функционируют посредством процесса апоптоза, или запрограммированной гибели клеток. Данные клетки назвали «природными киллерами», поскольку для уничтожения клетки им не требуется активация. Т-клетки играют основную роль в клеточноопосредованном иммунитете (без вовлечения антител). Их Т-клеточные рецепторы (ТКР) отличаются от рецепторов других типов лимфоцитов. Тимус, специализированный орган иммунной системы, в первую очередь отвечает за созревание Т-клеток. Существует шесть типов Т-клеток, а именно: Т-клетки хелперы (например, CD4+ клетки), цитотоксические Т-клетки (также известны как ТЦ, цитотоксические Т-лимфоциты, ЦТЛ, Т-клетки киллеры, цитолитические Т-клетки, CD8+ Т-клетки или Т-клетки киллеры), Т-клетки памяти ((i) стволовые клетки памяти (stem memory T-cells, TSCM), такие как наивные клетки, представляют собой CD45RO-, CCR7+, CD45RA+, CD62L+ (L-селектин), CD27+, CD28+ и ИЛ-7Rα+, но они также экспрессируют большие количества CD95, ИЛ-

2R $\beta$ , CXCR3 и LFA-1 и демонстрируют множество функциональных свойств, отличных от свойств клеток памяти); (ii) центральные клетки памяти (central memory T-cells, TCM) экспрессируют L-селектин и CCR7, они секретируют ИЛ-2, но не ИФН $\gamma$  или ИЛ-4, и (iii) эффекторные клетки памяти (effector memory T-cells, TEM), однако, не экспрессируют L-селектин или CCR7, но продуцируют эффекторные цитокины, такие как ИФН $\gamma$  и ИЛ-4), регуляторные Т-клетки (Treg, супрессорные Т-клетки или CD4+CD25+ регуляторные Т-клетки), Т-клетки-природные киллеры (NKT) и Т-клетки гамма-дельта. В-клетки, с другой стороны, играют принципиальную роль в гуморальном иммунитете (с участием антител). Они образуют антитела и антигены, выполняют роль антигенпрезентирующих клеток (АПК) и превращаются в В-клетки памяти после активации в результате взаимодействия с антигеном. У млекопитающих незрелые В-клетки образуются в костном мозге.

**[64]** Термин «генетически сконструированный», «сконструированный» или «модифицированный» обозначает способ модификации клетки, включая, без ограничения, создание дефекта в гене путем делетирования кодирующей или некодирующей области или ее части либо с применением технологии антисмысловых мРНК, или повышение экспрессии белка путем введения кодирующей области или ее части. В некоторых вариантах реализации клетка, которую модифицировали, представляет собой стволовую клетку (например, гемопоэтическую стволовую клетку (ГСК), эмбриональную стволовую клетку (ЭСК), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (иПСК)), лимфоцит (например, Т-клетку), которую можно получить от пациента или донора.

**[65]** «Иммунный ответ» обозначает действие клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, клеток-природных киллеров (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцированных любой из данных клеток или печенью (включая АТ (антитела), цитокины и комплемент), которое приводит к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из тела позвоночного инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других абнормальных клеток или, в случаях аутоиммунных реакций либо патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

**[66]** Термин «иммуноterapia» обозначает лечение субъекта, пораженного или подверженного риску получения заболевания либо страдающего от рецидива

заболевания, способом, включающим вызов, усиление, подавление или модификацию иммунного ответа иным способом. Примеры иммунотерапии включают, без ограничения, варианты Т-клеточной терапии. Т-клеточная терапия может включать адоптивную Т-клеточную терапию, иммунотерапию опухоль-инфильтрующими лимфоцитами (ОИЛ), аутологическую клеточную терапию, сконструированную аутологическую клеточную терапию (engineered autologous cell therapy, eACT™) и аллогенную трансплантацию Т-клеток. Однако специалист в данной области техники понимает, что способы кондиционирования, раскрытые в настоящем документе, усилят эффективность любой терапии трансплантированными Т-клетками. Примеры вариантов Т-клеточной терапии описаны в публикациях патента США №№ 2014/0154228 и 2002/0006409, патенте США № 5,728,388 и международной публикации № WO 2008/081035.

[67] Т-клетки иммунотерапии могут происходить из любого источника, известного в данной области техники. Например, Т-клетки могут быть дифференцированы *in vitro* из популяции гемопоэтических стволовых клеток; индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), или Т-клетки могут быть получены от субъекта. Т-клетки могут быть получены, например, из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), костного мозга, ткани лимфоузлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из участка инфекции, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. Помимо этого, Т-клетки могут быть получены из одной или нескольких линий Т-клеток, доступных в данной области техники. Т-клетки также могут быть получены из единицы крови, взятой у субъекта с применением любого числа методик, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение с помощью FICOLL™ и/или аферез. Дополнительные способы выделения Т-клеток для Т-клеточной терапии раскрыты в публикации патента США № 2013/0287748, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[68] Термин «терапия с применением сконструированных аутологичных клеток», который можно сокращенно обозначить как «eACT™», также известный как адоптивный перенос клеток, представляет собой процесс, посредством которого собственные Т-клетки пациента собирают, а затем генетически изменяют, чтобы они распознавали один или более антигенов, экспрессируемых на поверхности клетки одной или нескольких конкретных опухолевых клеток либо злокачественных образований, и

нацеливались на данные антигены. «Пациент» в настоящем документе включает любого человека, который страдает от рака (например, лимфомы или лейкоза). Термины «субъект» и «пациент» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

[69] В настоящем документе термин «клетка *in vitro*» обозначает любую клетку, которую культивируют *ex vivo*. В частности, клетка *in vitro* может включать Т-клетку.

[70] Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и обозначают соединение, состоящее из остатков аминокислот, ковалентно связанных пептидными связями. Белок или пептид содержит по меньшей мере две аминокислоты, и ничто не ограничивает максимальное число аминокислот, которое может содержать последовательность белка или пептида. Полипептиды включают любой пептид или белок, содержащий две или более аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями. В настоящем документе данный термин обозначает как короткие цепи, которые также обычно обозначаются в данной области техники как пептиды, олигопептиды и олигомеры, например, так и более длинные цепи, которые обычно обозначаются в данной области техники как белки; существует множество типов белков. «Полипептиды» включают, например, среди прочего, биологически активные фрагменты, по существу гомологичные полипептиды, олигопептиды, гомодимеры, гетеродимеры, варианты полипептидов, модифицированные полипептиды, производные, аналоги, слитые белки. Полипептиды включают природные пептиды, рекомбинантные пептиды, синтетические пептиды или комбинацию указанных пептидов.

[71] «Стимуляция» в настоящем документе обозначает первичный ответ, вызванный связыванием стимулирующей молекулы с ее когнатным лигандом, причем связывание опосредует событие передачи сигнала. «Стимулирующая молекула» представляет собой молекулу на Т-клетке, например, комплекс Т-клеточного рецептора (ТКР)/CD3, который специфично связывается с когнатным стимулирующим лигандом, присутствующим на антигенпрезентирующей клетке. «Стимулирующий лиганд» представляет собой лиганд, который при присутствии на антигенпрезентирующей клетке (например, АПК, дендритной клетке, В-клетке и т.п.) может специфично связываться со стимулирующей молекулой на Т-клетке, в процессе этого опосредуя первичный ответ Т-клетки, включая, без ограничения, активацию, запуск иммунного ответа, пролиферацию и т.п. Стимулирующие лиганды включают, без ограничения,

антитело против CD3, молекулу МНС класса I, связанную с пептидом, суперагонистическое антитело против CD2 и суперагонистическое антитело против CD28.

[72] «Костимулирующий сигнал» в настоящем документе обозначает сигнал, который в комбинации с первичным сигналом, таким как связывание ТКР/CD3, приводит к Т-клеточному ответу, такому как, без ограничения, пролиферация и/или повышающая регуляция либо понижающая регуляция ключевых молекул.

[73] «Костимулирующий лиганд» в настоящем документе включает молекулу на антигенпрезентирующей клетке, которая специфично связывается с когнатной костимулирующей молекулой на Т-клетке. Связывание костимулирующего лиганда обеспечивает сигнал, который опосредует Т-клеточный ответ, включая, без ограничения, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п. Костимулирующий лиганд вызывает сигнал, который дополняет первичный сигнал, обеспеченный стимулирующей молекулой, например, в результате связывания комплекса Т-клеточного рецептора (ТКР)/CD3 с молекулой основного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС), нагруженной пептидом. Костимулирующий лиганд может включать, без ограничения, 3/TR6, лиганд 4-1BB, агонист или антитело, которое связывается с рецептором Toll-лиганда, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), лиганд CD30, CD40, CD7, CD70, CD83, медиатор проникновения герпесвируса (herpes virus entry mediator, HVEM), лейкоцитарный антиген G человека (human leukocyte antigen G, HLA-G), ILT4, иммуноглобулиноподобный транскрипт (immunoglobulin-like transcript, ILT) 3, индуцибельный костимулирующий лиганд (inducible costimulatory ligand, ICOS-L), молекулу межклеточной адгезии (intercellular adhesion molecule, ICAM), лиганд, который специфично связывается с B7-H3, рецептор лимфотоксина бета, белок А, связанный с цепью МНС класса I (MHC class I chain-related protein A, MICA), белок В, связанный с цепью МНС класса I (MICB), лиганд OX40, PD-L2 или лиганд запрограммированной смерти (programmed death, PD) L1. Костимулирующий лиганд включает, без ограничения, антитело, которое специфично связывается с костимулирующей молекулой, присутствующей на Т-клетке, такой как, без ограничения, 4-1BB, B7-H3, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD7, ICOS, лиганд, который специфично связывается с CD83, функционально-ассоциированный антиген лимфоцитов (lymphocyte function-associated antigen-1, LFA-1), рецептор С клеток-

природных киллеров (NKG2C), OX40, PD-1 или член 14 суперсемейства фактора некроза опухоли (TNFSF14 или LIGHT).

[74] «Костимулирующая молекула» является когнатным партнером по связыванию на Т-клетке, который специфично связывается с костимулирующим лигандом, опосредуя за счет этого костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, без ограничения. «Костимулирующая молекула» представляет собой когнатный партнер связывания на Т-клетке, который специфично связывается с костимулирующим лигандом, посредством этого опосредуя костимулирующий ответ Т-клетки, такой как, без ограничения, пролиферация. Костимулирующие молекулы включают, без ограничения, 4-1BB/CD137, B7-H3, BAFFR, BLAME (SLAMF8), BTLA, CD 33, CD 45, CD100 (SEMA4D), CD103, CD134, CD137, CD154, CD16, CD160 (BY55), CD18, CD19, CD19a, CD2, CD22, CD247, CD27, CD276 (B7-H3), CD28, CD29, CD3 (альфа; бета; дельта; эпсилон; гамма; дзета), CD30, CD37, CD4, CD40, CD49a, CD49D, CD49f, CD5, CD64, CD69, CD7, CD80, лиганд CD83, CD84, CD86, CD8альфа, CD8бета, CD9, CD96 (сенсорный), CD1-la, CD1-lb, CD1-lc, CD1-ld, CDS, CEACAM1, CRT AM, DAP-10, DNAM1 (CD226), рецептор Fc-гамма, GADS, GITR, HVEM (LIGHTR), IA4, ICAM-1, ICAM-1, ICOS, Ig альфа (CD79a), ИЛ2R бета, ИЛ2R гамма, ИЛ7R альфа, интегрин, ITGA4, ITGA4, ITGA6, ITGAD, ITGAE, ITGAL, ITGAM, ITGAX, ITGB2, ITGB7, ITGB1, KIRDS2, LAT, LFA-1, LFA-1, LIGHT, LIGHT (член 14 суперсемейства фактора некроза опухоли; TNFSF14), LTBR, Ly9 (CD229), ассоциированный с функцией антиген лимфоцитов-1 (LFA-1 (CD1 la/CD18), молекулу ГКГС класса I, NKG2C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, NKp80 (KLRF1), OX40, PAG/Cbp, PD-1, PSGL1, SELPLG (CD162), сигнальную лимфоцит-активирующую молекулу (signaling lymphocytic activation molecule, SLAM (SLAMF1; CD150; IPO-3), SLAMF4 (CD244; 2B4), SLAMF6 (NTB-A; Lyl08), SLAMF7, SLP-76, ФНО, рецептор ФНО (TNF), TNFR2, рецептор Toll-лиганда, TRANCE/RANKL, VLA1 или VLA-6 либо фрагменты, усечения или комбинации указанных молекул.

[75] Термины «снижение» и «уменьшение» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и обозначают любое изменение, которое является меньшим, чем исходная величина. «Снижение» и «уменьшение» являются родственными терминами, требующими проведения сравнения между

предшествующими и последующими измерениями. «Снижение» и «уменьшение» включают полное исчерпывание.

[76] «Лечение» субъекта обозначает любой тип вмешательства или процесс, который осуществляют в отношении субъекта, либо обозначает введение активного агента субъекту с целью обратного развития, облегчения, ослабления, ингибирования, замедления или предотвращения манифестации, прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения или состояния либо биохимического признака, связанного с заболеванием. В одном варианте реализации «лечение» включает частичную ремиссию. В другом варианте реализации «лечение» включает полную ремиссию.

[77] Чтобы рассчитать процент идентичности, сравниваемые последовательности обычно выравнивают образом, который обеспечивает наибольшее совпадение между последовательностями. Примером компьютерной программы, которую можно использовать для определения процента идентичности, является пакет программ GCG, который включает GAP (Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; генетическая компьютерная группа (Genetics Computer Group), Висконсинский Университет, Мэдисон, Висконсин). Компьютерный алгоритм GAP используют для выравнивания двух полипептидов или полинуклеотидов, для которых определяют процент идентичности последовательностей. Последовательности выравнивают для оптимального совпадения их соответствующих аминокислот или нуклеотидов («охват совпадения», как определено алгоритмом.) В некоторых вариантах реализации алгоритм также использует стандартную матрицу сравнения (см. публикацию Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 применительно к матрице сравнения PAM 250; и публикацию Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 применительно к матрице сравнения BLOSUM 62).

[78] В настоящем документе термин «разрушение» или «разрушать» обозначает механическое, химическое и/или ферментативное отсоединение кластеризованных клеток. В настоящем документе разрушенные клетки остаются интактными, но утрачивают межклеточные адгезионные контакты, а также свойства адгезии мембран.

[79] В настоящем документе термин «культивирование» или его грамматические эквиваленты обозначает процесс поддержания клеток в условиях,

благоприятствующих росту, выживаемости или дифференцировки. Термины «культивирование» и «культура клеток» или любые синонимы используются в настоящей заявке взаимозаменяемо.

**[80]** В настоящем документе термин «плотность клеток» или «плотность отдельных клеток» обозначает количество клеток в объеме или площади поверхности. В некоторых вариантах реализации плотность клеток выражается в клетках/лунку шестилуночного планшета. Согласно настоящему изобретению стандартный шестилуночный планшет характеризуется площадью поверхности приблизительно 9,5 см<sup>2</sup>. В некоторых вариантах реализации плотность клеток выражается в клетках/см<sup>2</sup>.

**[81]** В настоящем документе термин «сосуд для культивирования» обозначает любой контейнер, который может обеспечить асептическое окружение для клеточных культур. Примеры сосудов для культивирования включают, без ограничения, стеклянные, пластиковые или металлические контейнеры.

**[82]** Различные аспекты настоящего изобретения описаны более подробно в следующих подразделах.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

**[83]** Согласно настоящему изобретению ГСК или другие стволовые клетки (эмбриональные стволовые (ЭСК) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК)) можно использовать для получения большого, возможно, бесконечного числа сконструированных Т-клеток желаемого направления дифференцировки. В настоящем изобретении предложены, среди прочего, высокоэффективные способы дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека в эмбриональные мезодермальные предшественники (чЭМКП) и/или Т-клетки, а также композиции, содержащие указанные клетки.

**[84]** Не опираясь на какую-либо конкретную теорию, предполагают, что получение Т-клеток из ЭСК или иПСК является более эффективным, если ему предшествует этап индукции, называемый «мезодермальный толчок», или индукция чЭМКП. Вкратце, ЭСК или иПСК культивируют, пересевают и выращивают до желаемой конfluence. Затем условия культивирования заменяют на индукционную среду чЭМКП. В некоторых вариантах реализации способ

культивирования ЭСК или иПСК является бесфидерным (т.е. без добавления ЭФМ) на Matrigel® или рекомбинантном витронектине человека. Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что чЭМКП можно получать более эффективно, если для «мезодермального толчка» или индукции чЭМКП используют некластеризованные культуры клеток. Например, некластеризованные стволовые клетки можно высевать на субстрате при заданной плотности отдельных клеток и индуцировать. Результатом является эффективный и воспроизводимый мезодермальный толчок. Высокий выход клеток чЭМКП из мезодермального толчка обеспечивает эффективную, быструю и устойчивую дифференцировку Т-клеток в последующих вариантах применения.

### *Плюрипотентные стволовые клетки*

[85] Для реализации настоящего изобретения на практике можно применять различные плюрипотентные стволовые клетки. Например, гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) в костном мозге (также в пуповинной крови или периферической крови) дают начало, помимо всех других зрелых клеток крови, коммитированным тимическим предшественникам. Данные тимические предшественники перемещаются в тимус, в котором начинают развиваться в зрелые Т-клетки. Передача сигналов от рецепторов Notch посредством их лигандов дельта и Jagged, в особенности, Notch1 и дельта-подобного лиганда 4, в тимусе запускает транскрипционный каскад (т.е. Tcf7, Gata3, Bcl11b и т.д.), который приводит к реаранжировке локуса ТКР под действием активирующих рекомбиназу генов RAG1 и RAG2. Сначала продуктивная реаранжировка ТКРβ (т.е. приводящая к получению белка ТКР) позволит получить белок, который спаривается с рТа и перемещается на поверхность. Это перемещение к поверхности передает сигнал назад в клетку, что позволяет переходить к последующему развитию. Поверхности рТа-ТКРβ не требуется взаимодействие с МНС, как происходит в зрелом ТКР, – сигнал выживаемости может не зависеть от пептида:МНС. Затем клетка переходит к реаранжировке ТКР $\alpha$ , тщательно проверяется в отношении успешного спаривания альфа/бета и слабого распознавания аутопептида:МНС (т.е. положительный и отрицательный отбор или центральная толерантность), перед тем как стать зрелой наивной Т-клеткой и переместиться посредством кровообращения на периферию.

**[86]** В некоторых вариантах реализации можно применять эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК).

**[87]** Стволовые клетки могут быть получены из любого источника, известного в данной области техники. Например, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) или эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) могут быть получены из коммерческих источников. Подходящие ГСК, ЭСК, иПСК и другие стволовые клетки могут также представлять собой культивируемые бессмертные линии клеток или могут быть выделены непосредственно от пациента. Различные способы выделения, разработки и/или культивирования стволовых клеток известны в данной области техники, и их можно применять для реализации настоящего изобретения на практике.

#### *Получение некластеризованных стволовых клеток*

**[88]** Как описано в настоящем документе, культивирование некластеризованных отдельных стволовых клеток в суспензии перед мезодермальной индукцией приводит к повышению эффективности дифференцировки стволовых клеток. Для получения некластеризованных культур стволовых клеток можно использовать различные способы. Например, ЭСК или иПСК можно сначала культивировать в виде кластеров на эмбриональных фибробластах мыши (ЭФМ), матриксе Matrigel® или витронектине и пересевать в виде кластеров на планшеты, сенсibilизированные Matrigel® или витронектином. В некоторых вариантах реализации для получения отдельных клеток в суспензии кластеры химическим способом разрушают с помощью расщепления трипсином, трипсиноподобным ферментом или другим веществом, разрушающим межклеточную адгезию, известным в данной области техники. В некоторых вариантах реализации кластеры разрушают механическим способом с помощью гомогенизации (например, ресуспендирования, механического перемешивания, промывки средой, промывки буфером, диссоциатора клеток (например, Miltenyi GentleMACS) или вортекса) для получения отдельных клеток в суспензии.

**[89]** В некоторых вариантах реализации условия культивирования адаптируют для стимуляции роста отдельных клеток, так, чтобы стволовые клетки не образовывали кластеры. Например, стволовые клетки можно выращивать в суспензии.

## **Субстраты**

**[90]** Согласно настоящему изобретению некластеризованные стволовые клетки высевают на субстрате при заданной плотности отдельных клеток для роста. В настоящем документе термин «субстрат» обозначает любую твердую или полутвердую поверхность или подложку. Например, подходящий субстрат может представлять собой слой, микрогранулу, луночный планшет, чашку для клеточных культур, мембрану, мешок, культуральный флакон, сосуд, инвертированный опал, полимерную сетку, гель или полимер.

**[91]** В некоторых вариантах реализации подходящий субстрат можно обработать желаемым покрытием. Например, подходящий субстрат можно покрыть матриксом Matrigel<sup>®</sup> или витронектином. В некоторых вариантах реализации подходящий субстрат покрывают коллагеном (например, коллагеном I, II, III или IV), желатином, фибронектином, ламинином, витронектином, фибриногеном, BD Matrigel<sup>®</sup>, матрицей базальной мембраны, протеогликаном дерматансульфатом, поли-D-лизином и/или комбинацией указанных веществ.

**[92]** Согласно настоящему изобретению некластеризованные клетки высевают на субстрате при заданной плотности отдельных клеток. Плотность отдельных клеток, подходящая для настоящего изобретения, может варьировать от приблизительно  $1,0 - 50 \times 10^6$  клеток/лунку в стандартном 6-луночном планшете (например, приблизительно  $1,0 - 40 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 30 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 20 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 10 \times 10^6$  клеток/лунку,  $1,0 - 8 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 4,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 4 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 3,6 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 3 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 2,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 2,0 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 1,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 10 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 8 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 4 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 3,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 3,0 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 2,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 2,0 \times 10^6$  клеток/лунку).

**[93]** В некоторых вариантах реализации клетки пересевают при заданной плотности отдельных клеток (например, приблизительно  $1,8 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $3,6 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $7,2 \times 10^6$  клеток/лунку).

**[94]** В некоторых вариантах реализации клетки пересевают при плотности клеток, варьирующей от приблизительно  $1,5 \times 10^5$  до приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> (например,  $1,89 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,6 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,79 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $7,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> или приблизительно  $7,58 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>).

**[95]** В некоторых вариантах реализации заданная плотность отдельных клеток при высевании выражена в виде процента конфлюэнтности. Согласно настоящему изобретению высевают при заданной плотности клеток такой, что поверхностная конфлюэнтность варьирует от 1% до 100% (например, приблизительно 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 99%). В некоторых вариантах реализации клетки пересевают при высоком проценте конфлюэнтности (например, приблизительно 70 – 100%, приблизительно 80%). В некоторых вариантах реализации клетки пересевают при среднем проценте конфлюэнтности (например, приблизительно 30 – 70%, приблизительно 40%). В некоторых вариантах реализации клетки пересевают при низком проценте конфлюэнтности (например, приблизительно 1 – 30%, приблизительно 20%).

**[96]** В некоторых вариантах реализации клетки высевают в среде для роста. В других вариантах реализации клетки высевают в среде для индукции. В некоторых вариантах реализации клетки высевают в среде для индукции, выращивают до желаемой конфлюэнтности согласно настоящему изобретению и повторно высевают в среду для индукции.

### ***Условия культивирования клеток***

[97] Согласно настоящему изобретению ЭСК или iPСК можно адаптировать для роста в виде отдельных клеток в суспензионной культуре. В некоторых вариантах реализации ЭСК или iPСК поддерживают в суспензии. ЭСК или iPСК, суспендированные в питательной среде, могут поддерживаться с помощью циркуляционного устройства, которое обеспечивает, чтобы выделенные клетки оставались в суспензии в питательной среде.

#### **Культуральная среда**

[98] Согласно настоящему изобретению можно использовать различные среды и условия для клеточных культур. Например, клетки можно получать в содержащей сыворотку или бессывороточной среде для клеточных культур. В некоторых вариантах реализации среда представляет собой бессывороточную среду. В некоторых вариантах реализации среда для культивирования представляет собой среду, не содержащую животных компонентов, т.е. среду, в которой отсутствуют компоненты, полученные от животных. В некоторых вариантах реализации среда представляет собой среду с химически определенным составом. В настоящем документе термин «питательная среда с химически определенным составом» обозначает среду, в которой известны по существу все химические компоненты. В некоторых вариантах реализации питательная среда с химически определенным составом не содержит компонентов, полученных от животных, таких как сыворотка, сывороточные белки (например, альбумин или фетуин) и другие компоненты. В некоторых случаях среда с химически определенным составом содержит один или более белков (например, белки – факторы роста или цитокины). В некоторых случаях питательная среда с химически определенным составом содержит гидролизаты одного или нескольких белков. В других случаях питательная среда с химически определенным составом представляет собой безбелковую среду, т.е. бессывороточную среду, которая не содержит белки, гидролизаты или компоненты неизвестного состава.

[99] В некоторых вариантах реализации в среду с химически определенным составом можно добавить один или более компонентов животного происхождения. Такие компоненты животного происхождения включают, без ограничения, эмбриональную телячью сыворотку, сыворотку лошади, сыворотку козы, сыворотку

осла, сыворотку человека и сывороточные белки, такие как альбумины (например, бычий сывороточный альбумин или сывороточный альбумин человека).

**[100]** В некоторых вариантах реализации для клеточных культур можно выбрать определенные предпочтительные свойства или рост при конкретных условиях. Как понимает специалист в данной области техники, такие свойства могут быть установлены на основании известных характеристик и/или черт устойчивой линии (т.е. охарактеризованной коммерчески доступной линии клеток) либо в ходе эмпирической оценки. В некоторых вариантах реализации линию клеток можно выбрать на основании ее способности расти на фидерном слое клеток. В некоторых вариантах реализации линию клеток можно выбрать на основании ее способности расти в виде адгезивного монослоя клеток. В некоторых вариантах реализации способы включают культивирование стволовых клеток и/или клеток-предшественников в культуре клеток, содержащей среду для культивирования.

**[101]** Согласно настоящему изобретению получение эмбриональных мезенхимальных клеток-предшественников человека (чЭМКП) включает фазу роста и фазу дифференцировки. В некоторых вариантах реализации среда для культивирования в течение фазы роста по существу отличается от среды для культивирования в течение фазы дифференцировки. В некоторых вариантах реализации среду mTESR1 используют для фазы роста, и среду X-VIVO™ 15 используют для фазы дифференцировки.

**[102]** Можно использовать различные культуральные среды. Иллюстративные, но неограничивающие культуральные среды включают, без ограничения, MEM (Minimum Essential Medium, минимальная питательная среда), DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко), BME (Basal Medium Eagle, основная среда Игла), RPMI 1640, DMEM/F-12 (среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко: питательная смесь F-12), DMEM/F-10 (среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко: питательная смесь F-10), a-MEM (a-Minimal Essential Medium, минимальная питательная среда), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium, минимальная питательная среда Глазго), FMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium, среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков), питательная среда 8 (essential 8, E8), KnockOut DMEM, AIM V, mTeSR™1, X-VIVO™ 15, StemSpan, среда для дендритных клеток CellGro.

**[103]** В некоторых вариантах реализации для эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека используют бесфидерную среду для клеточных культур. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение применяют для получения некластеризованных ЭСК или иПСК. В некоторых вариантах реализации в бессывороточной среде, подходящей для настоящего изобретения, отсутствуют компоненты, полученные от животных. В некоторых вариантах реализации бессывороточная среда, подходящая для настоящего изобретения, представляет собой среду с химически определенным составом. Например, среду mTeSR™1 можно использовать для роста клеток. MTeSR™1 представляет собой высокоспециализированную бессывороточную и полную среду для клеточных культур.

**[104]** В некоторых вариантах реализации в культуральную среду добавлен ингибитор пути Rho-ассоциированной протеинкиназы (ROCK) (например, Y27632). Ингибитор ROCK можно использовать для способствования перепрограммированию, поддержанию, самообновлению и/или дифференцировки.

#### Желаемая конfluence при индукции

**[105]** Согласно настоящему изобретению некластеризованные клетки ресуспендируют в среде или переносят в среду для индукции и высевают на планшете на субстрате при заданной плотности отдельных клеток. Плотность отдельных клеток, подходящая для настоящего изобретения, может варьировать от приблизительно  $1,0 - 50 \times 10^6$  клеток/лунку в стандартном 6-луночном планшете (например, приблизительно  $1,0 - 40 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 30 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 20 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 10 \times 10^6$  клеток/лунку,  $1,0 - 8 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 4,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 4 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 3,6 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 3 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 2,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 2,0 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,0 - 1,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 10 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 8 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 4 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 3,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 3,0 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 2,5 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $1,5 - 2,0 \times 10^6$  клеток/лунку).

**[106]** В некоторых вариантах реализации некластеризованные клетки ресуспендируют в среде или переносят в среду для индукции и высевают на планшете на субстрате при заданной плотности отдельных клеток (например,  $1,8 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $3,6 \times 10^6$  клеток/лунку, приблизительно  $7,2 \times 10^6$  клеток/лунку).

**[107]** В некоторых вариантах реализации некластеризованные клетки ресуспендируют в среде или переносят в среду для индукции и высевают на планшете на субстрате при заданной плотности отдельных клеток, варьирующей от приблизительно  $1,5 \times 10^5$  до приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> (например,  $1,89 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,6 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,79 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $7,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> или приблизительно  $7,58 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>).

**[108]** В некоторых вариантах реализации заданная плотность отдельных клеток при индукции выражена в виде процента конфлюэнтности. Согласно настоящему изобретению некластеризованные клетки ресуспендируют в среде или переносят в среду для индукции и высевают на планшете на субстрате при заданной плотности клеток такой, что поверхностная конфлюэнтность варьирует от 1% до 100% (например, приблизительно 1%, приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 99%). В некоторых вариантах реализации клетки индуцируют при высоком проценте конфлюэнтности (например, приблизительно 70 – 100%, приблизительно 80%). В некоторых вариантах реализации клетки индуцируют при среднем проценте конфлюэнтности (например, приблизительно 30 – 70%, приблизительно 40%). В некоторых вариантах реализации клетки индуцируют при низком проценте конфлюэнтности (например, приблизительно 1 – 30%, приблизительно 20%).

### Фаза роста и дифференцировки

[109] В некоторых вариантах реализации клетки культивируют при температуре, варьирующей в диапазоне приблизительно 30 – 37 °С (например, приблизительно 31 – 37 °С, приблизительно 32 – 37 °С, приблизительно 33 – 37 °С, приблизительно 34 – 37 °С, приблизительно 35 – 37 °С, приблизительно 36 – 37 °С). В некоторых вариантах реализации клетки культивируют при температуре приблизительно 30 °С, 31 °С, 32 °С, 33 °С, 34 °С, 35 °С, 36 °С или 37 °С. Любую из температур, описанных в настоящем документе, можно использовать для фазы роста и/или дифференцировки. В некоторых вариантах реализации клетки культивируют при различных температурах в течение фазы роста и фазы дифференцировки. В некоторых вариантах реализации клетки культивируют при по существу одинаковых температурах в течение фазы роста и фазы дифференцировки. Любой из рН среды, описанных в настоящем документе, можно использовать для фазы роста и/или дифференцировки. В некоторых вариантах реализации рН среды для фазы роста и фазы дифференцировки отличаются. В некоторых вариантах реализации рН среды для фазы роста и фазы дифференцировки является по существу одинаковым.

[110] В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК выращивают и поддерживают в фазе роста. В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК высевают и выращивают до желаемой конфлюэнтности (например, конфлюэнтности приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% или приблизительно 90%) перед фазой дифференцировки. В других вариантах реализации ЭСК или иПСК не высевают перед фазой дифференцировки. В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК ресуспендируют в среде для дифференцировки и высевают на планшете при желаемой конфлюэнтности (например, конфлюэнтности приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% или приблизительно 90%). В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК культивируют на Matrigel® или витронектине в течение фазы роста. В некоторых вариантах реализации ЭСК или иПСК культивируют на эмбриональных фибробластах мыши (ЭФМ) в течение фазы роста.

[111] В некоторых вариантах реализации время инкубации для фазы роста составляет приблизительно 1 – 6 дней (например, приблизительно 1 – 5 дней, приблизительно 1 – 4 дня, приблизительно 1 – 3 дня, приблизительно 1 – 2 дня,

приблизительно 1 день, приблизительно 2 дня, приблизительно 2,5 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 3,5 дня, приблизительно 4 дня). В некоторых вариантах реализации время инкубации для фазы роста реализуется в два этапа, причем культуру высевают. В некоторых вариантах реализации каждый этап фазы роста составляет приблизительно 1 – 6 дней (например, приблизительно 1 – 5 дней, приблизительно 1 – 4 дня, приблизительно 1 – 3 дня, приблизительно 1 – 2 дня, приблизительно 1 день, приблизительно 2 дня, приблизительно 2,5 дней, приблизительно 3 дня, приблизительно 3,5 дня, приблизительно 4 дня). В некоторых вариантах реализации фаза дифференцировки длится в течение приблизительно 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней.

[112] В некоторых вариантах реализации время инкубации для фазы дифференцировки составляет приблизительно 1 – 6 дней (например, приблизительно 1 – 5 дней, приблизительно 1 – 4 дня, приблизительно 1 – 3 дня, приблизительно 1 – 2 дня, приблизительно 1 день, приблизительно 2 дня, приблизительно 2,5 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 3,5 дня, приблизительно 4 дня). В некоторых вариантах реализации время инкубации для фазы дифференцировки реализуется в два этапа, причем культуру повторно высевают на планшете. В некоторых вариантах реализации каждый этап фазы дифференцировки составляет приблизительно 1 – 6 дней (например, приблизительно 1 – 5 дней, приблизительно 1 – 4 дня, приблизительно 1 – 3 дня, приблизительно 1 – 2 дня, приблизительно 1 день, приблизительно 2 дня, приблизительно 2,5 дня, приблизительно 3 дня, приблизительно 3,5 дня, приблизительно 4 дня). В некоторых вариантах реализации фаза дифференцировки длится в течение приблизительно 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней.

### ***Дифференцировка стволовых клеток***

[113] чЭМКП, полученные с применением подхода на основе отдельных некластеризованных клеток согласно настоящему изобретению, можно затем дифференцировать в различные типы клеток.

#### Мезодермальная индукция

[114] Наиболее ранние CD326–CD56+ чЭМКП, полученные из чЭСК (эмбриональных стволовых клеток человека) или иПСК в присутствии активина А, BMP4, ФРЭС и ФРФ2, представляют собой популяцию мультипотентных мезодермально-коммитированных предшественников. CD326–CD56+

предшественники являются уникальными благодаря своей способности давать начало всем мезодермальным линиям, включая гемопоэтическую, эндотелиальную, мезенхимальную (кость, хрящ, жир, фибробласты), гладкомышечную и кардиомиоциты, при этом не обладая плюрипотентностью чЭСК или иПСК. CD326–CD56+ чЭМКП представляют собой предшественники более линейно-специфических мезодермальных предшественников.

**[115]** CD326–CD56+ чЭМКП можно получить с помощью комбинации BMP4, ФРЭС и bФРФ и временного воздействия активина А.

### Отбор чЭМКП

**[116]** Преобразование ЭСК или иПСК в чЭМКП характеризуется утратой CD326 EPCAM и приобретением CD56 NCAM (CD326-CD56+). Эпителиальный маркер CD326 равномерно экспрессируется на высоких уровнях на недифференцированных клетках из эмбриональных стволовых линий клеток человека (например, H9, H1 и HES3) или иПСК, тогда как CD56 не экспрессируется на недифференцированных чЭСК или иПСК. После дифференцировки в условиях мезоэнтодермальной индукции популяция, отличающаяся утратой экспрессии CD326 и приобретением CD56 (CD326–CD56+), поддается однозначному обнаружению.

**[117]** Дополнительно после дифференцировки чЭМКП E-кадгерин, CD326/TACSTD1, клаудин 3, клаудин 6, клаудин 7, синдекан 1, синдекан 2, бета-катенин, окклюдин, Nanog, Sox 2 и/или OCT4 могут понижающе регулироваться. После дифференцировки чЭМКП Snail-1, Snail2/Slug, Twist 1, LEF1, ZEB1, MMP9, фибронектин, виментин и/или ZEB2 могут повышающе регулироваться.

**[118]** Регуляцию маркеров чЭМКП можно определить с помощью известных в данной области техники методик, включая способы обнаружения белка (например, проточную цитометрию, FACS, вестернблоттинг, ELISA, ВЭЖХ, ЖХ/МС, иммунопреципитацию белка, иммуноэлектрофорез, иммуноокрашивание белка и т.д.) и способы обнаружения нуклеиновой кислоты (например, анализ транскрипта мРНК, нозернблоттинг, микроматричный анализ кДНК, ДНК, полимеразная цепная реакция, профилирование экспрессии генов и т.д.).

## Дифференцировка и отбор Т-клеток

[119] чЭМКП обладают потенциалом дифференцироваться в гематоэндотелиальные клетки (например, кровь, эндотелий), сердечно-сосудистые (например, эндотелий, кардиомиоциты, гладкие мышцы) и мезенхимальные клетки (например, гладкие мышцы, фибробласты, кость, хрящ, жир). Лимфоидные клетки включают Т-клетки, В-клетки и клетки-природные киллеры. Т-клетки происходят из гемопоэтических стволовых клеток в костном мозге. Гемопоэтические предшественники (например, чЭМКП) из гемопоэтических стволовых клеток заселяют тимус и распространяются в результате деления клеток для образования большой популяции незрелых тимоцитов. Самые ранние тимоциты не экспрессируют ни CD4, ни CD8, однако, поскольку они прогрессируют по мере своего развития, они становятся дважды-положительными (ДП) тимоцитами (CD4+CD8+) и, наконец, созревают до однократно-положительных (ОП) (CD4+CD8- или CD4-CD8+) тимоцитов, которые затем высвобождаются из тимуса в периферические ткани.

[120] Повышенная эффективность и выход чЭМКП согласно настоящему изобретению приводят к быстрому и устойчивому коммитированию в Т-линию. В некоторых вариантах реализации Т-клетки могут быть дифференцированы из чЭМКП в системе АТО (Artificial Thymic Organoid, искусственный тимусный органоид). В некоторых вариантах реализации Т-клетки могут быть дифференцированы из чЭМКП с применением способов лентивирусной трансдукции. В некоторых вариантах реализации Т-клетки могут быть дифференцированы из чЭМКП с применением стромальных монослоев.

[121] На дифференцировку чЭМКП в Т-клетки указывает появление CD4+CD3- незрелых однократно-положительных (НОП) клеток и CD4+CD8+ (ДП) клеток. Появляются более зрелые CD3+ТКР $\alpha\beta$ + клетки, и их количество увеличивается с течением времени. Меньшая часть CD3+ТКР $\gamma\delta$ + Т-клеток может также быть получена для прогрессирующего созревания в CD8SP и, в меньшей степени, CD4SP Т-клетки, что согласуется с положительным отбором в АТО.

[122] Анализ методом проточной цитометрии тимусных и полученных из АТО Т-клеток-предшественников можно использовать для оценки следующих фенотипов поверхности: ранний тимусный предшественник (РТП; CD34+CD7-CD1a-), CD1a-про-Т (CD34+CD7+CD1a-) и CD1a+ про-Т (CD34+CD7+CD1a+); или CD5- про-Т (про-Т1;

CD34+CD7+CD5-) и CD5+ про-Т (pro-T2; CD34+CD7+CD5+). Тимусные и полученные из АТО Т-клетки и предшественники определяют как CD14-CD56- в комбинации со следующими фенотипами: суммарные клетки Т-линии (CD7+CD5+), дважды-отрицательные (ДО; CD4-CD8-), CD4 незрелые однократно-положительные (CD4 НОП; CD5+CD4+CD3-), дважды-положительные (ДП; CD4+CD8+), CD8SP (CD3+ТКР $\alpha\beta$ +CD8+CD4-), CD4SP (CD3+ТКР $\alpha\beta$ +CD8-CD4+), незрелые наивные (CD45RA-CD45RO+, которые были CD8SP или CD4SP), зрелые наивные (CD45RA+CD45RO-, которые были CD8SP или CD4SP). Незрелые и зрелые наивные фенотипы подтверждают в результате одновременного окрашивания в отношении CD1a, CD27, CD28 и CCR7.

#### Искусственный тимусный органоид (Artificial Thymic Organoid, АТО)

[123] Модели на генетически модифицированных мышцах *in vivo*, гуманизированные мыши и системы *in vitro*, такие как OP9-DLL1 или недавно описанный искусственный тимусный органоид (АТО), продемонстрировали множество возможностей, с помощью которых стволовые клетки можно модифицировать или культивировать для получения желаемых зрелых Т-клеток, в том числе с антигенными рецепторами против раковых антигенов.

[124] Плюрипотентные стволовые клетки и/или чЭМКП согласно настоящему изобретению можно дополнительно дифференцировать в системе OP9-DLL1 или в системе культуры клеток искусственного тимусного органоида (АТО). АТО представляет собой бессывороточную 3-мерную технологию культуры клеток, которая повторяет дифференцировку Т-клеток. Технология АТО обладает потенциалом для получения готовых к использованию сконструированных Т-клеток для лечения рака и других заболеваний.

[125] Подходящая система искусственного тимусного органоида (АТО) способствует высокоэффективной дифференцировке *in vitro* и положительному отбору нативных и ТКР-сконструированных Т-клеток человека из пуповинной крови, костного мозга и периферической крови HSPC. Полученные из АТО Т-клетки демонстрируют наивный фенотип, разнообразный репертуар ТКР и ТКР-зависимую активацию и пролиферацию. Полученные из АТО сконструированные Т-клетки также созревают до наивного фенотипа и, более того, демонстрируют антиген-специфичное уничтожение

опухоли *in vitro* и *in vivo*. АТО, таким образом, представляют собой эффективный способ получения зрелых наивных и потенциально неаллореактивных сконструированных Т-клеток для адаптивной клеточной терапии. Иллюстративные способы получения сконструированных Т-клеток с помощью культуральные системы АТО описаны, например, в публикации Seet CS, He C, Bethune MT, et al. Generation of mature T cells from human hematopoietic stem/progenitor cells in artificial thymic organoids. Nature methods. 2017;14(5):521-530. doi:10.1038/nmeth.4237, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

**[126]** Популяции Т-клеток высокой степени чистоты легко собрать из АТО с помощью механической диссоциации и их можно дополнительно очистить с помощью стандартных способов для удаления <0,5% загрязняющих стромальных клеток. Выход клеток АТО на стволовую клетку или клетку-предшественника обратно пропорционален числу высеванных клеток (например, чЭМКП) и соотношению клеток на входе к стромальным клеткам.

**[127]** Система АТО способна содействовать дифференцировке и положительному отбору Т-клеток человека от клеток-предшественников (например, чЭМКП), при этом сохраняя ключевые трансляционные свойства, такие как стандартизированные компоненты, воспроизводимость и масштабируемость, подходящие для получения Т-клеток для вариантов терапевтического применения. В настоящем изобретении предложены способы для в значительной степени точного воспроизведения дифференцировки Т-клеток в АТО по сравнению с тимусом человека, результатом чего становится появление полноценной наивной Т-клетки, подобной таковым, обнаруженным в тимусе и крови.

**[128]** АТО, снабженные клетками-предшественниками согласно настоящему изобретению, способствуют устойчивой дифференцировке *in vitro*, положительному отбору и созреванию Т-клеток человека. Полученные из АТО зрелые Т-клетки демонстрируют наивный в отношении антигена фенотип, разнообразный репертуар ТКР и активацию/пролиферацию в ответ на антигенный стимул. АТО также способствуют высокоэффективной дифференцировке ТКР-сконструированных антиген-специфичных Т-клеток из клеток-предшественников, специфичных в отношении опухоль-ассоциированных антигенов.

## *Клетки*

[129] Клетку согласно настоящему изобретению можно получить из любого источника, известного в данной области техники. Например, Т-клетки могут быть дифференцированы *in vitro* из популяции гемопоэтических стволовых клеток или плюрипотентных стволовых клеток, или Т-клетки могут быть получены от субъекта. Т-клетки могут быть получены, например, из мононуклеаров периферической крови, костного мозга, ткани лимфоузлов, пуповинной крови, ткани тимуса, ткани из участка инфекции, асцита, плеврального выпота, ткани селезенки и опухолей. Помимо этого, Т-клетки могут быть получены из одной или более линий Т-клеток, доступных в данной области техники. Т-клетки также могут быть получены из единицы крови, отобранной от субъекта с применением любого числа методик, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение с помощью FICOLL™ и/или аферез. В некоторых вариантах реализации клетки, собранные с помощью афереза, промывают для удаления фракции плазмы и помещают в соответствующий буфер или среду для последующей обработки. В некоторых вариантах реализации клетки промывают ФБР (фосфатным буферным раствором). Как очевидно, можно применять этап промывки, например, с применением полуавтоматизированной проточной центрифуги, например, устройства для обработки клеток Cobe™ 2991, Baxter CytoMate™ или т.п. В некоторых вариантах реализации промытые клетки ресуспендируют в одном или нескольких биологически совместимых буферах либо в другом солевом растворе с буфером или без него. В некоторых вариантах реализации нежелательные компоненты аферезного образца удаляют. Дополнительные способы выделения Т-клеток для Т-клеточной терапии раскрыты в публикации патента США № 2013/0287748, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

[130] В некоторых вариантах реализации стволовые клетки выделяют из МКПК путем лизиса красных клеток крови и истощения моноцитов, например, с применением центрифугирования в градиенте PERCOLL™. В некоторых вариантах реализации специфичную субпопуляцию Т-клеток, такую как CD4+, CD8+, CD28+, CD45RA+ и CD45RO+ Т-клетки, дополнительно выделяют с помощью методик положительного или отрицательного отбора, известных в данной области техники. Например, обогащение популяции Т-клеток с помощью отрицательного отбора можно провести с комбинацией антител, направленных на маркеры поверхности, уникальные для отрицательно отобранных клеток. В некоторых вариантах реализации сортировка и/или отбор клеток

основаны на отрицательной магнитной иммунной адгезии или проточной цитометрии, в которой можно использовать коктейль моноклональных антител, направленных на маркеры поверхности клетки, присутствующие на клетках отрицательно отобранных клеток. Например, для обогащения CD4<sup>+</sup> клетками с помощью отрицательного отбора коктейль моноклональных антител обычно содержит антитела против CD8, CD11b, CD14, CD16, CD20 и HLA-DR. В некоторых вариантах реализации проточную цитометрию и сортировку клеток применяют для выделения популяций клеток, представляющих интерес, с целью применения в настоящем изобретении.

[131] В некоторых вариантах реализации CD8<sup>+</sup> клетки дополнительно сортируют на наивные, стволовые клетки памяти, центральной памяти, эффекторной памяти и эффекторные клетки путем идентификации антигенов поверхности клетки, которые связаны с каждым из данных типов CD8<sup>+</sup> клеток. В некоторых вариантах реализации экспрессия фенотипических маркеров Т-клеток центральной памяти включает CCR7, CD3, CD28, CD45RO, CD62L и CD127, и клетки являются отрицательными в отношении гранзима В. В некоторых вариантах реализации Т-клетки центральной памяти представляют собой CD8<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup> и CD62L<sup>+</sup> Т-клетки. В некоторых вариантах реализации эффекторные Т-клетки являются отрицательными в отношении CCR7, CD28, CD62L и CD127 и положительными в отношении гранзима В и перфорина. В некоторых вариантах реализации CD4<sup>+</sup> Т-клетки дополнительно сортируют на субпопуляции. Например, клетки CD4<sup>+</sup> Т-хелперы можно отсортировать на наивные, центральной памяти и эффекторные клетки путем идентификации популяций клеток, которые содержат антигены поверхности клетки.

[132] В некоторых вариантах реализации иммунные клетки, например, Т-клетки, генетически модифицируют после выделения с применением известных способов, или иммунные клетки активируют и наращивают (или дифференцируют в случае предшественников) *in vitro* до того, как их генетически модифицируют. В другом варианте реализации плюрипотентные стволовые клетки модифицируют перед индукцией в чЭМКП. В другом варианте реализации трансдуцированные чЭМКП подвергают обработке в АТО. В другом варианте реализации иммунные клетки, например, Т-клетки, генетически модифицируют химерным антигенным рецептором или ТКР (например, трансдуцируют вирусным вектором, содержащим одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих ХАР или ТКР), а затем активируют и/или наращивают *in vitro*. Способы активации и наращивания Т-клеток известны в

данной области техники и описаны, например, в патентах США №№ 6,905,874, 6,867,041 и 6,797,514 и публикации PCT № WO 2012/079000, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Как правило, такие способы включают осуществление контакта МКПК или выделенных Т-клеток со стимулирующим агентом или костимулирующим агентом, таким как антитела против CD3 и против CD28, как правило, присоединенные к грануле или другой поверхности, в культуральной среде с соответствующими цитокинами, такими как ИЛ-2. Антитела против CD3 и против CD28, присоединенные к одной грануле, выступают в качестве «заменителя» антигенпрезентирующей клетки (АПК). Примером является система Dynabeads®, активирующая/стимулирующая CD3/CD28 система для физиологической активации Т-клеток человека. В других вариантах реализации Т-клетки активируют и стимулируют для пролиферации с помощью фидерных клеток и соответствующих антител и цитокинов с применением способов, таких как способы, описанные в патентах США №№ 6,040,177, 5,827,642 и публикации PCT № WO 2012/129514, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

**[133]** В некоторых вариантах реализации Т-клетки получают от субъекта-донора. В некоторых вариантах реализации субъект-донор представляет собой пациента-человека, который страдает от рака или опухоли. В других вариантах реализации субъект-донор представляет собой пациента-человека, который не страдает от рака или опухоли.

**[134]** Другие аспекты настоящего изобретения направлены на композиции, содержащие полинуклеотид, описанный в настоящем документе, вектор, описанный в настоящем документе, полипептид, описанный в настоящем документе, или клетку *in vitro*, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель, разжижающее вещество, эмульгирующее вещество, консервант и/или адъювант. В некоторых вариантах реализации композиция содержит вспомогательное вещество.

**[135]** В других вариантах реализации композиция выбрана для парентеральной доставки, для ингаляции или для доставки через пищеварительный тракт, такой как перорально. Получение таких фармацевтически приемлемых композиций находится в пределах способностей специалиста в данной области техники. В некоторых вариантах реализации буферы используют для поддержания рН композиции на физиологическом уровне или незначительно более низком уровне рН, обычно в пределах диапазона рН от

приблизительно 5 до приблизительно 8. В некоторых вариантах реализации, когда предусмотрено парентеральное введение, композиция находится в форме апирогенного, парентерально приемлемого водного раствора, содержащего композицию, описанную в настоящем документе, с дополнительными терапевтическими средствами или без них, в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах реализации носитель для парентеральной инъекции представляет собой стерильную дистиллированную воду, в которой композиция, описанная в настоящем документе, приготовлена в состав с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством или без него в виде стерильного изотонического раствора с добавлением соответствующих консервантов. В некоторых вариантах реализации препарат включает состав желаемой молекулы с полимерными соединениями (такими как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, обеспечивающие контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который затем будет доставлен путем инъекции из депо (инъекции вещества с замедленным всасыванием). В некоторых вариантах реализации имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств применяют для введения желаемой молекулы или клеток.

### *Лечение рака*

**[136]** Способы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения рака у субъекта, снижения размера опухоли, уничтожения клеток опухоли, предотвращения пролиферации клеток опухоли, предотвращения роста опухоли, устранения опухоли у пациента, предотвращения рецидива опухоли, предотвращения метастазирования опухоли, вызова ремиссии у пациента или любой комбинации указанных результатов. В некоторых вариантах реализации способы вызывают полный ответ. В других вариантах реализации способы вызывают частичный ответ.

**[137]** Типы рака, которые можно лечить, включают опухоли, которые не являются васкуляризированными, еще не являются по существу васкуляризированными или являются васкуляризированными. Рак может также включать солидные или несоллидные опухоли. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой гематологический рак. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой рак белых клеток крови. В других вариантах реализации рак представляет собой рак плазматических клеток. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой

лейкоз, лимфому или миелому. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) (включая отличный от Т-клеточного ОЛЛ), острый лимфоидный лейкоз (ОЛЛ) и гемофагоцитарный лимфогистоцитоз (ГЛГ)), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз («ВОЛЛ»), бластное плазмацитоидное дендритное клеточное новообразование, лимфому Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хроническую или острую гранулематозную болезнь, хронический или острый лейкоз, диффузную В-крупноклеточную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), фолликулярную лимфому, фолликулярную лимфому (ФЛ), лейкоз волосатых клеток, гемофагоцитарный синдром (синдром активации макрофагов (САМ), болезнь Ходжкина, крупноклеточную гранулому, дефицит адгезии лейкоцитов, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому (mucosa-associated lymphoid tissue, лимфоидная ткань слизистых оболочек), мантийноклеточную лимфому, лимфому маргинальной зоны, моноклональную гаммапатию неясного генеза (МГНГ), множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром (МДС), миелоидные заболевания, включая, без ограничения, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), неходжкинскую лимфому (НХЛ), пролиферативные нарушения плазматических клеток (например, асимптоматическую миелому (вялотекущую множественную миелому или невыраженную миелому), плазмабластную лимфому, новообразования плазмацитоидных дендритных клеток, плазмацитомы (например, дискразию плазматических клеток; солитарную миелому; солитарную плазмацитому; экстремедуллярную плазмацитому; и множественную плазмацитому), синдром POEMS (синдром Кроу-Фукаса; болезнь Такатсуки; синдром PEP), первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому (ПМВКЛ), мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС), системный амилоидный амилоидоз легкой цепи, Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз («ТОЛЛ»), Т-клеточную лимфому, трансформированную фолликулярную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема или комбинацию указанных типов рака.

**[138]** В одном варианте реализации рак представляет собой миелому. В одном конкретном варианте реализации рак представляет собой множественную миелому. В

другом варианте реализации рак представляет собой лейкоз. В одном варианте реализации рак представляет собой острый миелоидный лейкоз.

**[139]** В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают введение химиотерапевтического средства. В некоторых вариантах реализации выбранное химиотерапевтическое средство представляет собой противолимфоцитарное (прекондиционирующее) химиотерапевтическое средство. Характеризующиеся преимущественно режимы кондиционирования лечения вместе с соответствующими характеризующимися преимущественно биомаркерами описаны в предварительных заявках на патент США №№ 62/262,143 и 62/167,750, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. В данных заявках описаны, например, способы кондиционирования пациента, нуждающегося в Т-клеточной терапии, которые включают введение пациенту указанных благоприятных доз циклофосфида (от 200 мг/м<sup>2</sup>/день до 2000 мг/м<sup>2</sup>/день) и указанных доз флударабина (от 20 мг/м<sup>2</sup>/день до 900 мг/м<sup>2</sup>/день). Один такой режим введения доз включает лечение пациента, включающее введение пациенту ежедневно приблизительно 500 мг/м<sup>2</sup>/день циклофосфида и приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup>/день флударабина в течение трех дней, до введения пациенту терапевтически эффективного количества сконструированных Т-клеток.

**[140]** В других вариантах реализации антигенсвязывающую молекулу, которой трансдуцировали (или иным способом сконструировали) клетки (такую как ХАР или ТКР), и химиотерапевтическое средство вводят каждое в количестве, эффективном для лечения заболевания или состояния у субъекта.

**[141]** В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие ХАР- и/или ТКР-экспрессирующие иммунные эффекторные клетки, раскрытые в настоящем документе, можно вводить в сочетании с любым числом химиотерапевтических средств. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (ЦИТОКСАН<sup>TM</sup>); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилмеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хломафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксида гидрохлорид, мельфалан, новэмбехин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин;

антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, каминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квелаамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклоротетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фолиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльформитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия, гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофилиновую кислоту, 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепу; таксоиды, например паклитаксел (ТАКСОЛ™, Bristol-Myers Squibb) и доцетаксел (ТАКСОТЕР®, Rhone-Poulenc Rorer); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; даунорубицин, аминоптерин; кселоду; ибандронат, СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифформетилорнитин (ДМФО); производные ретиноевой кислоты, такие как Таргретин™ (бексаротен), Панретин™ (алитретиноин); ОНТАК™ (денилейкин-дифтитокс); эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из указанных выше соединений. В некоторых вариантах реализации композиции, содержащие ХАР- и/или ТКР-экспрессирующие иммунные эффекторские клетки, раскрытые в настоящем документе,

можно вводить в сочетании с антигормональным средством, действие которого направлено на регуляцию или ингибирование воздействия гормона на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из указанных выше соединений. Комбинации химиотерапевтических средств также вводят в соответствующих случаях, включая, без ограничения СНОР, т.е. циклофосфамид (Цитоксан®), доксорубицин (гидроксидоксорубицин), винкристин (Онковир®) и преднизон.

**[142]** В некоторых вариантах реализации химиотерапевтическое средство вводят одновременно или в течение одной недели после введения сконструированной клетки или нуклеиновой кислоты. В других вариантах реализации химиотерапевтическое средство вводят через от 1 до 4 недель, от 1 недели до 1 месяца, от 1 недели до 2 месяцев, от 1 недели до 3 месяцев, от 1 недели до 6 месяцев, от 1 недели до 9 месяцев или от 1 недели до 12 месяцев после введения сконструированной клетки или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации химиотерапевтическое средство вводят по меньшей мере за 1 месяц до введения клетки или нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают введение двух или более химиотерапевтических средств.

**[143]** Множество дополнительных терапевтических средств можно использовать в сочетании с композициями, описанными в настоящем документе. Например, потенциально подходящие дополнительные терапевтические средства включают ингибиторы PD-1, такие как ниволумаб (ОПДИВО®), пембролизумаб (КЕЙТРУДА®), пембролизумаб, пидилизумаб (CigeTech) и атезолизумаб (Roche).

**[144]** Дополнительные терапевтические средства, подходящие для применения в комбинации с настоящим изобретением, включают, без ограничения, ибрутиниб (ИМБРУВИКА®), офатумумаб (АРЗЕРРА®), ритуксимаб (РИТУКСАН®), бевацизумаб (АВАСТИН®), трастузумаб (ГЕРЦЕПТИН®), трастузумаб эмтанзин (КАДСИЛА®), иматиниб (ГЛИВЕК®), цетуксимаб (ЭРБИТУКС®), панитумумаб (ВЕКТИБИКС®), катумаксомаб, ибритумомаб, офатумумаб, тозитумомаб, брентуксимаб, алемтузумаб, гемтузумаб, эрлотиниб, gefитиниб, вандетаниб, афатиниб, лапатиниб, нератиниб, акситиниб, мазитиниб, пазопаниб, сунитиниб, сорафениб, тоцераниб, лестауртиниб,

акситиниб, цедираниб, ленватиниб, нинтеданиб, пазопаниб, регорафениб, семаксаниб, сорафениб, сунитиниб, тивозаниб, тоцераниб, вандетаниб, энтректиниб, кабозантиниб, иматиниб, дазатиниб, нилотиниб, понатиниб, радотиниб, бозутиниб, лестауртиниб, руксолитиниб, пакритиниб, кобиметиниб, селуметиниб, траметиниб, биниметиниб, алектиниб, церитиниб, кризотиниб, афлиберцепт, адипотид, денилейкин-дифтитокс, ингибиторы mTOR, такие как эверолимус и темсиролимус, ингибиторы сигнального пути Hedgehog, такие как сонидегиб и висмодегиб, ингибиторы CDK, такие как ингибитор CDK (палбоциклиб).

**[145]** В дополнительных вариантах реализации композиции, содержащую ХАР- и/или ТКР-содержащие иммунные, вводят с противовоспалительным средством. Противовоспалительные средства или лекарственные препараты могут включать, без ограничения, стероиды и глюкокортикоиды (включая бетаметазон, будесонид, дексаметазон, гидрокортизона ацетат, гидрокортизон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон, преднизон и триамцинолон), нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), включая аспирин, ибупрофен, напроксен, метотрексат, сульфасалазин, лефлуномид, лекарственные средства против ФНО, циклофосфамид и микофенолат. Примеры НПВС включают ибупрофен, напроксен, напроксен натрия, ингибиторы Cox-2 и салилаты. Примеры анальгетических средств включают ацетаминофен, оксикодон и трамадол пропоксифен гидрохлорид. Примеры глюкокортикоидов включают кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизолон или преднизон. Примеры модификаторов биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров поверхности клетки (например, CD4, CD5 и т.д.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты ФНО (например, этанерцепт (ЭНБРЕЛ<sup>®</sup>), адалимумаб (ХУМИРА<sup>®</sup>) и инфликсимаб (РЕМИКЕЙД<sup>®</sup>), ингибиторы хемокинов и ингибиторы молекул адгезии. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Примеры БМПП (болезнь-модифицирующих противоревматических препаратов) включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (для перорального (ауранофин) и внутримышечного введения) и миноциклин.

**[146]** В некоторых вариантах реализации композиции, описанные в настоящем документе, вводят в сочетании с цитокином. «Цитокин» в настоящем документе

обозначает белки, высвобождаемые одной популяцией клеток, которые воздействуют на другую клетку в качестве межклеточных медиаторов. Примерами цитокинов являются лимфокины, монокины и традиционные полипептидные гормоны. В цитокины включены гормоны роста, такие как гормон роста человека, N-метионил-гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), тиреостимулирующий гормон (ТСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ); фактор роста печени (ФРП); фактор роста фибробластов (ФРФ); пролактин; плацентарный лактоген; мюллеровская ингибирующая субстанция; гонадотропин-ассоциированный пептид мыши; ингибин; активин; фактор роста сосудистого эндотелия; интегрин; тромбopoэтин (ТПО); факторы роста нервов (ФРН), такие как ФРН-бета; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (ТФР), такие как ТФР-альфа и ТФР-бета; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (ЭПО); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-альфа, бета и гамма; колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как макрофагальный КСФ (М-КСФ); гранулоцитарно-макрофагальный КСФ (ГМ-КСФ); и гранулоцитарный КСФ (Г-КСФ); интерлейкины (ИЛ), такие как ИЛ-1, ИЛ-1 альфа, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12; ИЛ-15, фактор некроза опухоли, такой как ФНО-альфа или ФНО-бета; и другие полипептидные факторы, включая LIF и лиганд kit (KL). В настоящем документе термин «цитокин» включает белки из природных источников или из рекомбинантной культуры клеток и биологически активные эквиваленты нативной последовательности цитокинов.

**[147]** Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ вызова иммунитета против опухоли, включающий введение субъекту эффективного количества модифицированной Т-клетки, раскрытой в настоящем документе. Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ вызова иммунного ответа у субъекта, включающий введение эффективного количества сконструированных иммунных клеток согласно настоящей заявке. В некоторых вариантах реализации иммунный ответ представляет собой опосредованный Т-клетками иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации опосредованный Т-клетками иммунный ответ направлен против одной или более клеток-мишеней. В некоторых вариантах реализации сконструированная иммунная клетка содержит ХАР или ТКР, причем ХАР или ТКР

содержит ТНД, описанный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах реализации клетка-мишень представляет собой клетку опухоли.

**[148]** Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ лечения или предотвращения злокачественного образования, причем указанный способ включает введение субъекту, который нуждается в таком лечении или предотвращении, эффективного количества по меньшей мере одной иммунной клетки, причем иммунная клетка содержит по меньшей мере один ХАР или ТКР.

**[149]** Другой аспект настоящего изобретения направлен на способ лечения рака у субъекта, который нуждается в таком лечении, причем указанный способ включает введение субъекту полинуклеотида, вектора, ХАР или ТКР, клетки или композиции, раскрытых в настоящем документе. В одном варианте реализации способ включает введение полинуклеотида, кодирующего ХАР или ТКР. В другом варианте реализации способ включает введение вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий ХАР или ТКР. В другом варианте реализации способ включает введение ХАР или ТКР, кодируемого полинуклеотидом, раскрытым в настоящем документе. В другом варианте реализации способ включает введение клетки, содержащей полинуклеотид, или вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий ХАР или ТКР.

**[150]** В некоторых вариантах реализации донорные Т-клетки для применения в Т-клеточной терапии получены от пациента (например, для аутологичной Т-клеточной терапии). В других вариантах реализации донорные стволовые клетки, подлежащие дифференцировке в Т-клетки для применения в Т-клеточной терапии, получены от субъекта, который не является пациентом.

**[151]** Т-клетки можно вводить в терапевтически эффективном количестве. Например, терапевтически эффективное количество Т-клеток может составлять по меньшей мере приблизительно  $10^4$  клеток, по меньшей мере приблизительно  $10^5$  клеток, по меньшей мере приблизительно  $10^6$  клеток, по меньшей мере приблизительно  $10^7$  клеток, по меньшей мере приблизительно  $10^8$  клеток, по меньшей мере приблизительно  $10^9$  или по меньшей мере приблизительно  $10^{10}$ . В другом варианте реализации терапевтически эффективное количество Т-клеток составляет приблизительно  $10^4$  клеток, приблизительно  $10^5$  клеток, приблизительно  $10^6$  клеток, приблизительно  $10^7$  клеток или приблизительно  $10^8$  клеток. В одном конкретном варианте реализации терапевтически эффективное количество Т-клеток с ХАР или Т-клеток с ТКР составляет

приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток/кг, приблизительно  $3 \times 10^6$  клеток/кг, приблизительно  $4 \times 10^6$  клеток/кг, приблизительно  $5 \times 10^6$  клеток/кг, приблизительно  $6 \times 10^6$  клеток/кг, приблизительно  $7 \times 10^6$  клеток/кг, приблизительно  $8 \times 10^6$  клеток/кг, приблизительно  $9 \times 10^6$  клеток/кг, приблизительно  $1 \times 10^7$  клеток/кг, приблизительно  $2 \times 10^7$  клеток/кг, приблизительно  $3 \times 10^7$  клеток/кг, приблизительно  $4 \times 10^7$  клеток/кг, приблизительно  $5 \times 10^7$  клеток/кг, приблизительно  $6 \times 10^7$  клеток/кг, приблизительно  $7 \times 10^7$  клеток/кг, приблизительно  $8 \times 10^7$  клеток/кг или приблизительно  $9 \times 10^7$  клеток/кг.

### ***Иммунная толерантность***

[152] Способы согласно настоящему изобретению можно применять для лечения болезни иммунной толерантности у субъекта. В некоторых вариантах реализации способы вызывают полный ответ. В других вариантах реализации способы вызывают частичный ответ.

[153] Нарушения центральной или периферической толерантности могут вызвать аутоиммунное заболевание, приводящее к синдромам, таким как системная красная волчанка, ревматоидный артрит, диабет типа 1, аутоиммунный полиэндокринный синдром типа 1 (АПС-1) и X-сцепленный синдром иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome, IPEX), и потенциально способствуют астме, аллергии и воспалительному заболеванию кишечника. Иммунная толерантность также может создавать проблемы при отторжении трансплантата, например, трансплантата стволовых клеток, трансплантата почек, трансплантата печени и т.д.

[154] Все публикации, патенты и заявки на патент, упоминаемые в настоящем описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была конкретно и отдельно указана как включенная посредством ссылки. Однако ссылку на литературный источник в настоящем документе не следует истолковывать как признание того, что такой литературный источник представляет собой предшествующий уровень техники для настоящего изобретения. В случае, если любое из определений или терминов, представленных в литературных источниках, включенных посредством ссылки,

отличается от терминов и обсуждения, приведенного в настоящем документе, термины и определения настоящего документа являются определяющими.

**[155]** Настоящее изобретение дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует истолковывать как дополнительно ограничивающие. Содержание всех литературных источников, упоминаемых по всей настоящей заявке, явным образом включено в настоящий документ посредством ссылки.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1: Сравнение индукции чЭМКП кластерами и отдельными клетками

[156] Данный пример иллюстрирует сравнение индукции чЭМКП кластерами и отдельными клетками.

[157] Конфлюэнтный планшет ЭСК в виде кластеров вручную пересевали и высевали на планшете в количестве 20%, 40% и 80% эквивалента лунок на 6-луночные планшеты, сенсibiliзированные Matrigel®. Дополнительно, конфлюэнтный планшет ЭСК химическим способом разрушали путем химического расщепления и подсчитывали для определения числа клеток/ площадь поверхности. Отдельные клетки высевали в концентрации  $1,8 \times 10^6$  (конфлюэнтность 20%),  $3,6 \times 10^6$  (конфлюэнтность 40%) и  $7,2 \times 10^6$  (конфлюэнтность 80%). Клетки культивировали в среде mTeSR1, которая, как известно, поддерживает ЭСК в недифференцированном состоянии, в качестве контроля, или в среде для индукции чЭМКП X-VIVO™-15. Во всех условиях добавляли низкомолекулярный ингибитор ROCK Y27632, чтобы способствовать выживаемости ЭСК в течение пересевания. Клетки собирали во всех условиях в д1, д2, д3 и д4. Схема эксперимента представлена в таблицах 1, 2 и 3.

**Таблица 1**

<u>Плотность</u>	<u>Клетки из</u>	<u>Среда</u>	<u>Сбор (д)</u>
$1,8 \times 10^6$ клеток/лунку (~20%)	Кластеров	mTeSR1	1
			2
			3
			4
		X-VIVO™15	1
			2
			3
			4
	Отдельных клеток	mTeSR1	1
			2
			3
			4
		X-VIVO™15	1
			2
			3
			4

Таблица 2

<u>Плотность</u>	<u>Клетки из</u>	<u>Среда</u>	<u>Сбор (д)</u>
3,6 x 10 <sup>6</sup> клеток/лунку (~40%)	Кластеров	mTeSR1	1
			2
			3
			4
		X- VIVO™15	1
			2
			3
			4
	Отдельных клеток	mTeSR1	1
			2
			3
			4
		X- VIVO™15	1
			2
			3
			4

Таблица 3

<u>Плотность</u>	<u>Клетки из</u>	<u>Среда</u>	<u>Сбор (д)</u>
7,2 x 10 <sup>6</sup> клеток/лунку (~80%)	Кластеров	mTeSR1	1
			2
			3
			4
		X- VIVO™15	1
			2
			3
			4
	Отдельных клеток	mTeSR1	1
			2
			3
			4
		X- VIVO™15	1
			2
			3
			4

[158] ЭСК, преобразующиеся в чЭМКП, характеризуются утратой CD326 EPCAM и приобретением CD56 NCAM. Фенотипический анализ на основе изменения экспрессированных на поверхности CD326 и CD56 свидетельствует, что подход на основе отдельных клеток является более эффективным, чем подход на основе кластеров, при получении чЭМКП с оптимальной плотностью 1,8 – 7,2 x 10<sup>6</sup> клеток/лунку в 6-луночном планшете, или 2,53 – 7,58 x 10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Иллюстративные данные проточной цитометрии и сводный график, иллюстрирующий изменение экспрессированных на поверхности CD326 и CD56, представлены на фигуре 1 и фигуре 2, соответственно. Иллюстративный процесс получения чЭМКП представлен на фигуре 3.

## Пример 2: Сравнение Matrigel<sup>®</sup> и витронектина при мезодермальном толчке и оценка роста клеток

[159] В данном примере представлено сравнение индукции чЭМКП в присутствии Matrigel<sup>®</sup> или витронектина. Для исследования эффекта удаления Matrigel<sup>®</sup>, неопределенного продукта, продуцированного клетками саркомы мыши, из процесса индукции чЭМКП, проводили эксперименты по мезодермальному толчку.

[160] Отдельные клетки высевали при конфлюэнтности 5% или 40% в 6-луночные планшеты, сенсibilизированные Matrigel<sup>®</sup> (планшет, обработанный культурой ткани) или рекомбинантным витронектином человека (планшет, не обработанный культурой ткани). Клетки выращивали в течение 3 дней, и часть клеток пересевали и повторно высевали при плотности 5% или 40% на свежие сенсibilизированные планшеты и выращивали в течение еще 3 дней. Клетки собирали и оценивали применительно к экспрессии CD326 и CD56. Краткое описание дизайна эксперимента представлено в таблице 4.

**Таблица 4**

Высевание (д0)	Пересев (д3)	Сбор (д6)
5%	Нет	Да
	до 5%	Да
	до 40%	н/п
40%	Нет	Да
	до 5%	Да
	до 40%	Да

[161] Как представлено на фигуре 4, во всех исследованных экспериментальных условиях наблюдался эквивалентный фенотип чЭМКП в случае поверхностей, покрытых Matrigel<sup>®</sup> и витронектином. Рекомбинантный витронектин человека по меньшей мере эквивалентен Matrigel<sup>®</sup> в качестве субстрата, на котором можно дифференцировать чЭМКП из ЭСК. Интересно отметить, что, как обобщено в таблице 5 и таблице 6, исходная плотность высевания 40%, разбавленная в д3 до плотности 5%, обеспечила приблизительно 10-кратный (13,31) рост чЭМКП по сравнению с числом

исходных ЭСК. Иллюстративный процесс получения чЭМКП, включая этап высевания, представлен на фигуре 5.

**Таблица 5**

Matrigel	Кратность роста	чЭМКП /ЭСК
5% постоянная	7,67	1,05
40% постоянная	3,63	2,52
От 5% до 5%	15,41	4,30
От 40% до 5%	16,63	12,97
От 40% до 40%	12,24	9,97

**Таблица 6**

Витронектин	Кратность роста	чЭМКП /ЭСК
5% постоянная	7,67	1,76
40% постоянная	3,64	2,41
От 5% до 5%	13,35	5,16
От 40% до 5%	17,24	13,31
От 40% до 40%	10,08	6,98

### **Пример 3: Дифференцировка чЭМКП в Т-клетки**

[162] чЭМКП в соответствии с подходом на основе некластеризованных клеток согласно настоящему изобретению можно применять для увеличения эффективности дифференцировки Т-клеток в системах *in vitro* (например, системе АТО). чЭМКП индуцировали, как описано, и сортировали на приборе FACS Aria Fusion (BD). Чистота после сортировки, как было определено, составила >95% для клеток, отличных от чЭМКП, и чЭМКП (фигуре 6). Дифференцировку Т-клеток индуцировали с применением бессывороточной культуральной среды для АТО («RB27»), которая состояла из RPMI 1640 (Corning, Манассас, Виргиния), 2% XenoFree B27 (ThermoFisher Scientific, Гранд Айленд, Нью-Йорк), 30 мкМ L-аскорбиновой кислоты 2-фосфат магниевой соли сесквигидрата (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури), восстановленного в ФБР, 1% пенициллина/стрептомицина (Gemini Bio-Products, Вест-Сакраменто, Калифорния), 1% GlutaMax (ThermoFisher Scientific, Гранд Айленд, Нью-Йорк), 5 нг/мл рекомбинантного FLT3L человека, 5 нг/мл рекомбинантного ИЛ-7 человека и 50 нг/мл ФСК (фактор роста стволовых клеток, Peprotech, Роки Хилл, Нью-Джерси). B27 заменили на 2% XenoFree B27.

[163] 0,5 x 10<sup>6</sup> клеток MS5-hDL4 объединяли с 1 x 10<sup>4</sup> очищенных чЭМКП на АТО в конических колбах объемом 50 мл и центрифугировали при 500 g в течение 5 мин. в центрифуге с бакет-ротором. Супернатанты осторожно удаляли, и осадок клеток

ресуспендировали путем кратковременного встряхивания на вортексе. Для каждой АТО в 6-луночный планшет, содержащий 1 мл RB27 на лунку, помещали вкладку трансвел размером 0,4 мкм Millicell (EMD Millipore, Биллерика, Массачусетс; кат. № PICM0RG50). Для высевания АТО вкладки удаляли и оставляли на краю планшета, чтобы слить избыток среды. Кашицу клеток доводили до объема 5 мкл на АТО, отсасывали с помощью кончика пипетки объемом 20 мкл и высевали путем образования капли на конце кончика пипетки, которую аккуратно помещали на вкладку для клеток. Вкладку для клеток помещали назад в лунку, содержащую 1 мл RB27. Среду полностью меняли каждые 3 – 4 дня путем аспирации из находящихся рядом вкладок для клеток, после чего заменяли на 1 мл среды со свежими RB27/цитокинами. АТО культивировали таким образом в течение 8 недель. Клетки АТО собирали с помощью добавления буфера для FACS (ФБР/0,5% бычий сывороточный альбумин/2 мМ ЭДТА) в каждую лунку и кратковременно разъединяли АТО с помощью пипетирования, после чего пропускали через нейлоновое сито с размером ячеек 70 мкм.

**[164]** Собранные клетки окрашивали антителами в отношении следующих антигенов: CD45, CD56, CD3, CD4, CD8, ТКР $\alpha\beta$  (Biolegend) в течение 30 минут при температуре 4 °С в темноте. Клетки промывали ФБР и анализировали на приборе Fortessa X20 (BD) для анализа развития Т-клеток. Пример клеток в неделю 4 представлен на фигуре 7.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

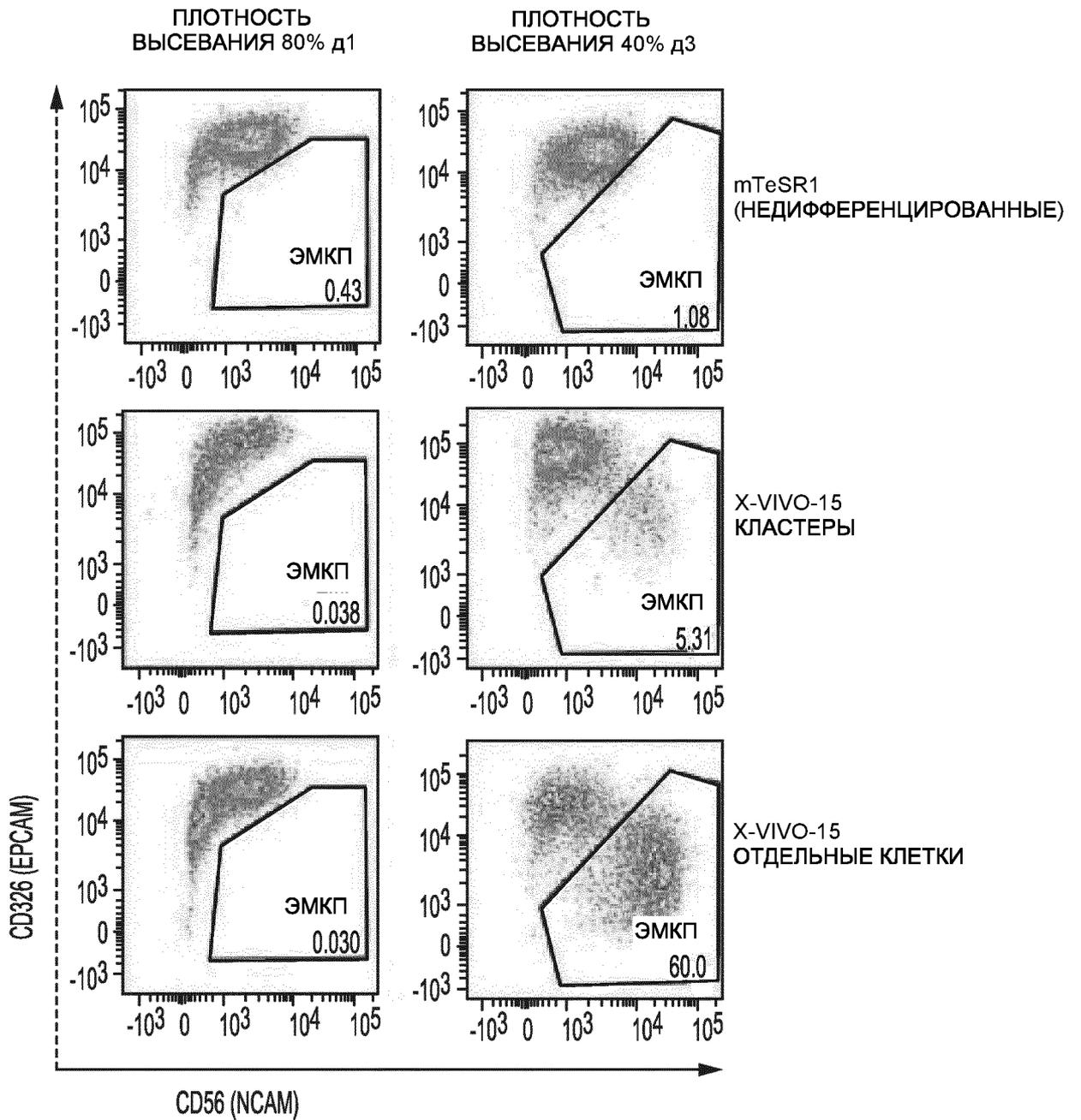
1. Способ получения эмбриональных мезенхимальных клеток-предшественников человека (чЭМКП), включающий этапы:
  - (а) осуществления контакта некластеризованных стволовых клеток с субстратом при заданной плотности отдельных клеток;
  - (б) культивирования стволовых клеток в условиях культивирования, способствующих росту клеток, до желаемой конфлюэнтности; и
  - (с) модификации условий культивирования для индукции дифференцировки стволовых клеток в чЭМКП в течение желаемого времени инкубации;с получением посредством этого чЭМКП.
2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанные стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) человека.
3. Способ по п. 2, характеризующийся тем, что указанные ЭСК или иПСК по происхождению являются клетками человека.
4. Способ по п. 3, характеризующийся тем, что указанные ЭСК или иПСК представляют собой клетки H1, клетки H9, клетки HES3, клетки HSF1, клетки HSF6, клетки ESI-017, клетки CS02iCTR-NTn1, клетки CS03iCTR-NTn1, клетки CS80iCTR-Tn3, клетки CS179iCTR-NTn1, клетки CS201iCTR-NTn4, клетки CS202iCTR-NTn2 или клетки CS206iCTR-Tn5.
5. Способ по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что указанная заданная плотность отдельных клеток составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^5$  до приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>.
6. Способ по п. 5, характеризующийся тем, что указанная заданная плотность отдельных клеток составляет приблизительно  $1,89 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,6 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,79 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $7,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> или приблизительно  $7,58 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что указанный субстрат покрывают матриксом Matrigel® или рекомбинантным витронектином человека, но не эмбриональными фибробластами мыши (ЭФМ).
8. Способ по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что указанный субстрат представляет собой луночный планшет, чашку для клеточных культур, мембрану, мешок, культуральный флакон, инвертированный опал, полимерную сетку, суспензию статичных клеток, суспензию перемешиваемых клеток или обработанный плазмой полимер.
9. Способ по п. 8, характеризующийся тем, что указанный субстрат содержит мембрану.
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что указанные условия культивирования, способствующие росту клеток, включают культивирование стволовых клеток в среде mTeSR1.
11. Способ по п. 10, характеризующийся тем, что указанная среда mTeSR1 содержит ингибитор ROCK Y27632.
12. Способ по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что указанная желаемая конфлюэнтность составляет от приблизительно 20% до приблизительно 80%.
13. Способ по п. 12, характеризующийся тем, что указанная конфлюэнтность составляет приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70% или приблизительно 80%.
14. Способ по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что этап изменения условий культивирования включает добавление X-VIVO™ 15.
15. Способ по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что время инкубации составляет от приблизительно 2 до приблизительно 4 дней.
16. Способ по п. 15, характеризующийся тем, что время инкубации составляет приблизительно 2,0, приблизительно 2,5, приблизительно 3,0, приблизительно 3,5 или приблизительно 4,0 дня.
17. Способ по п. 16, характеризующийся тем, что время инкубации составляет приблизительно 3,5 дня.

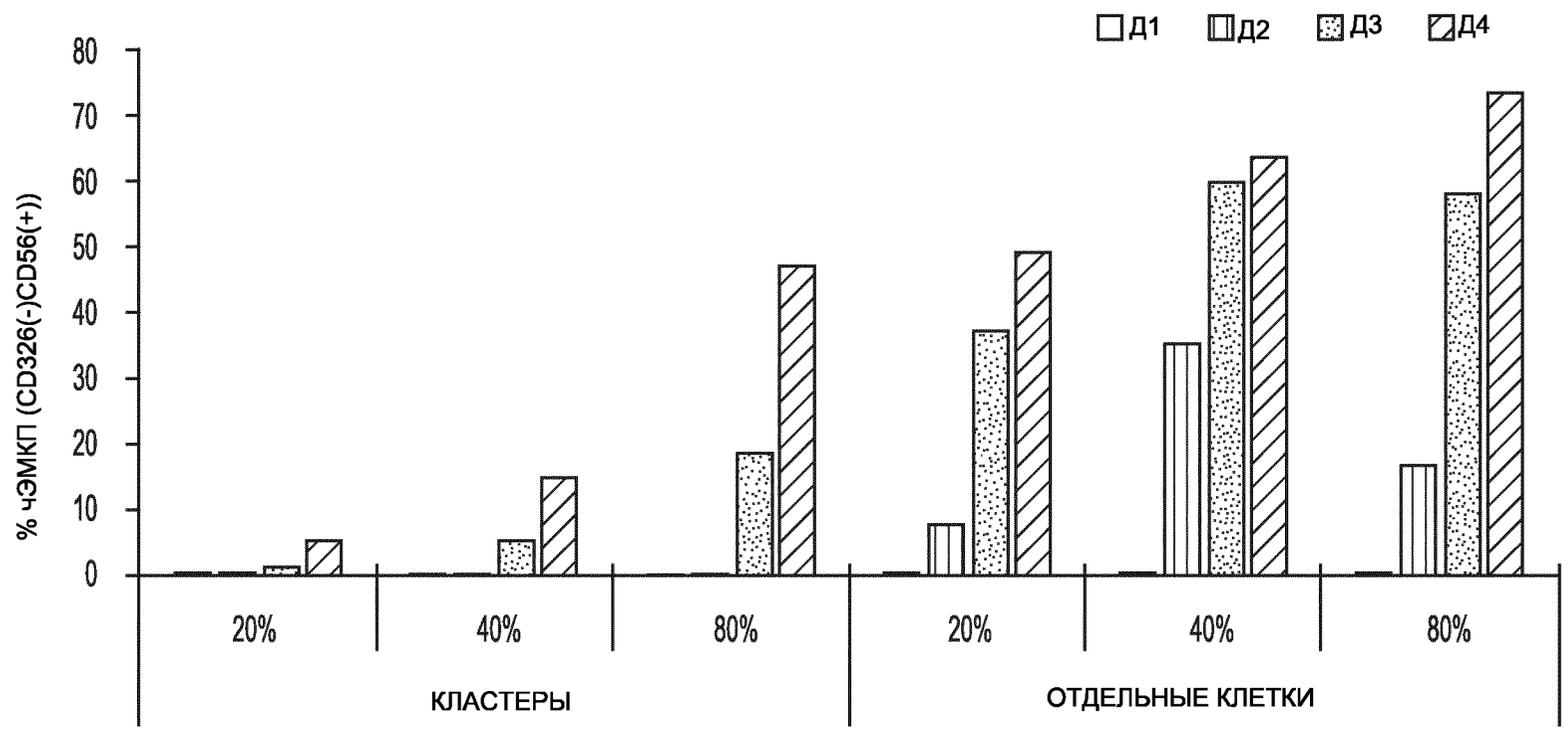
18. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий этап дифференцировки чЭМКП в Т-клетки.
19. Способ по любому из предшествующих пунктов, характеризующийся тем, что указанный способ дополнительно включает этап разрушения кластеров стволовых клеток для получения некластеризованных стволовых клеток.
20. Способ по п. 19, характеризующийся тем, что указанные кластеры стволовых клеток разрушают путем механического или химического разрушения.
21. Способ по п. 20, характеризующийся тем, что указанное химическое разрушение включает инкубацию с трипсиноподобным ферментом.
22. Способ по п. 21, характеризующийся тем, что указанный трипсиноподобный фермент представляет собой трипсин, TrypLE Express, TrypLE Select, коллагеназу, диспазу, трипсин-ЭДТА.
23. Эмбриональные мезенхимальные клетки-предшественники человека (чЭМКП), полученные в соответствии со способом по любому из предшествующих пунктов.
24. Композиция, содержащая популяцию эмбриональных мезенхимальных клеток-предшественников человека (чЭМКП), полученных в соответствии со способом по любому из пп. 1-22.
25. Способ получения Т-клеток, включающий этапы:
  - (a) осуществления контакта некластеризованных стволовых клеток с субстратом при заданной плотности отдельных клеток, причем указанные стволовые клетки не содержат эмбриональные фибробласты мыши (ЭФМ);
  - (b) культивирования стволовых клеток в условиях культивирования, способствующих росту клеток, до желаемой конфлюэнтности; и
  - (c) модификации условий культивирования для индукции дифференцировки стволовых клеток в Т-клетки в течение желаемого времени инкубации;с получением посредством этого Т-клеток из стволовых клеток.
26. Способ по п. 25, характеризующийся тем, что указанные стволовые клетки представляют собой чеговеческие эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК).

27. Способ по п. 26, характеризующийся тем, что указанные ЭСК или iPСК по происхождению являются клетками человека.
28. Способ по п. 26 или 27, характеризующийся тем, что указанные ЭСК или iPСК представляют собой клетки H1, клетки H9, клетки HES3, клетки HSF1, клетки HSF6, клетки ESI-017, клетки CS02iCTR-NTn1, клетки CS03iCTR-NTn1, клетки CS80iCTR-Tn3, клетки CS179iCTR-NTn1, клетки CS201iCTR-NTn4, клетки CS202iCTR-NTn2 или клетки CS206iCTR-Tn5.
29. Способ по любому из пп. 25 – 28, характеризующийся тем, что указанная заданная плотность отдельных клеток составляет от приблизительно  $1,5 \times 10^5$  до приблизительно  $8 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>.
30. Способ по любому из пп. 25 – 29, характеризующийся тем, что указанная заданная плотность отдельных клеток составляет приблизительно  $1,89 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,4 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,6 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $3,79 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, приблизительно  $7,2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> или приблизительно  $7,58 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>.
31. Способ по любому из пп. 25 – 30, характеризующийся тем, что указанный субстрат покрывают матриксом Matrigel® или рекомбинантным витронектином человека, но не эмбриональными фибробластами мыши (ЭФМ).
32. Способ по любому из пп. 25 – 31, характеризующийся тем, что указанный субстрат представляет собой луночный планшет, чашку для клеточных культур, мембрану, мешок, культуральный флакон, инвертированный опал, полимерную сетку, суспензию статичных клеток, суспензию перемешиваемых клеток или обработанный плазмой полимер.
33. Способ по п. 32, характеризующийся тем, что указанный субстрат содержит мембрану.
34. Способ по любому из пп. 25 – 33, характеризующийся тем, что указанные условия культивирования, способствующие росту клеток, включают культивирование стволовых клеток в среде mTeSR1.
35. Способ по п. 34, характеризующийся тем, что указанная среда mTeSR1 содержит ингибитор ROCK Y27632.

36. Способ по любому из пп. 25 – 35, характеризующийся тем, что указанная желаемая конfluence составляет от приблизительно 20% до приблизительно 80%.
37. Способ по п. 36, характеризующийся тем, что указанная конfluence составляет приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70% или приблизительно 80%.
38. Способ по любому из пп. 25 – 37, характеризующийся тем, что этап изменения условий культивирования включает добавление X-VIVO™ 15.
39. Способ по любому из пп. 25 – 38, характеризующийся тем, что время инкубации составляет от приблизительно 2 до приблизительно 4 дней.
40. Способ по п. 39, характеризующийся тем, что время инкубации составляет приблизительно 2,0, приблизительно 2,5, приблизительно 3,0, приблизительно 3,5 или приблизительно 4,0 дня.
41. Способ по п. 40, характеризующийся тем, что время инкубации составляет приблизительно 3,5 дня.
42. Способ по любому из пп. 25 – 41, характеризующийся тем, что указанный способ дополнительно включает этап разрушения кластеров стволовых клеток для получения некластеризованных стволовых клеток.
43. Способ по п. 42, характеризующийся тем, что указанные кластеры стволовых клеток разрушают путем механического или химического разрушения.
44. Способ по п. 43, характеризующийся тем, что указанное химическое разрушение включает инкубацию с трипсиноподобным ферментом.
45. Способ по п. 44, характеризующийся тем, что указанный трипсиноподобный фермент представляет собой трипсин, TrypLE Express, TrypLE Select, коллагеназу, диспазу, трипсин-ЭДТА.
46. Т-клетка, полученная в соответствии со способом по любому из пп. 25 – 45.
47. Композиция, содержащая популяцию Т-клеток, полученных в соответствии со способом по любому из пп. 25 – 45.



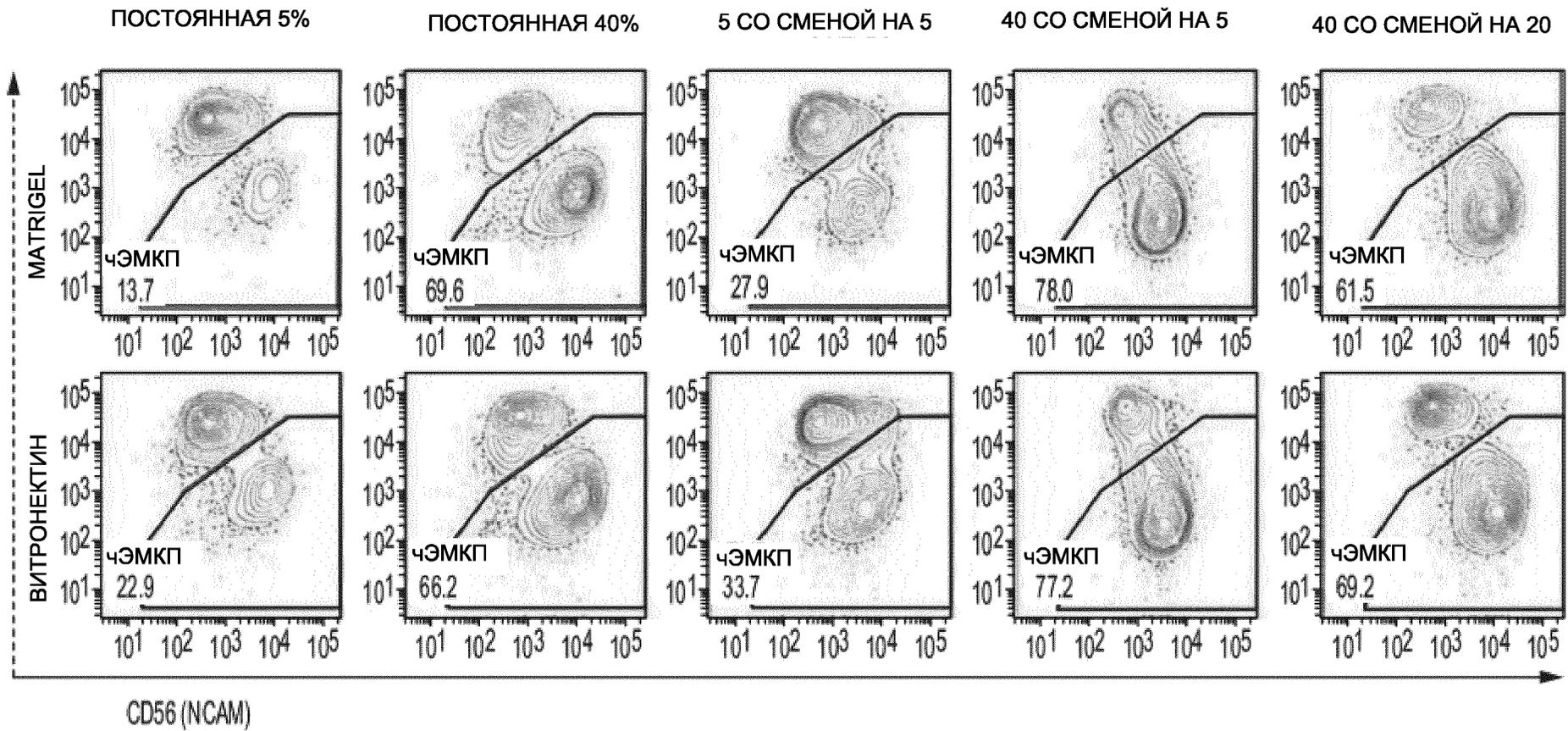
ФИГ. 1



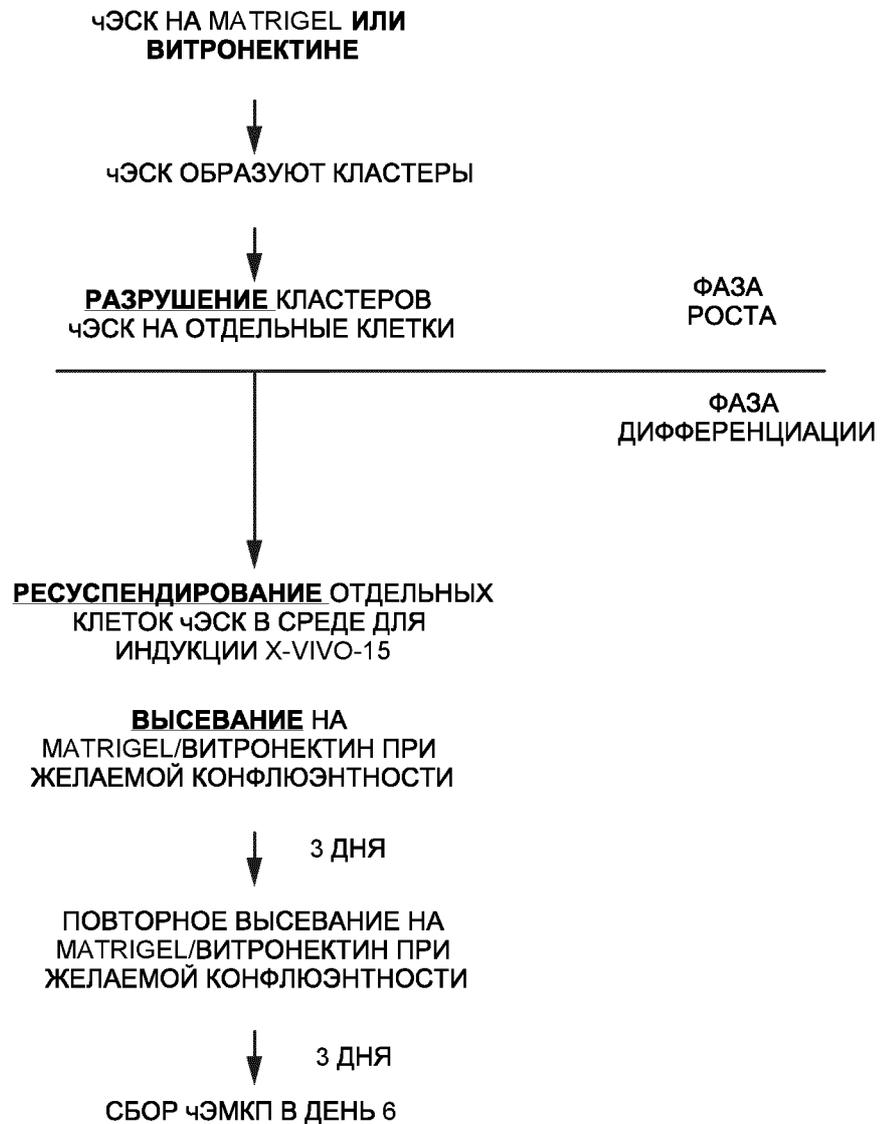
ФИГ. 2



ФИГ. 3



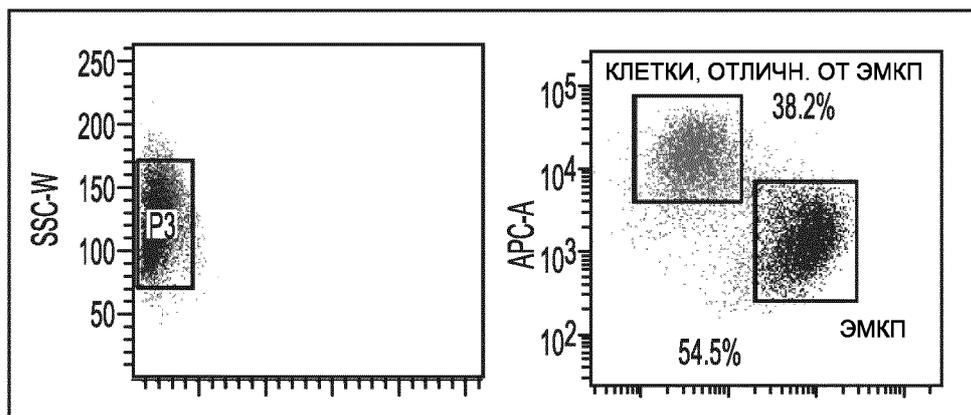
ФИГ. 4



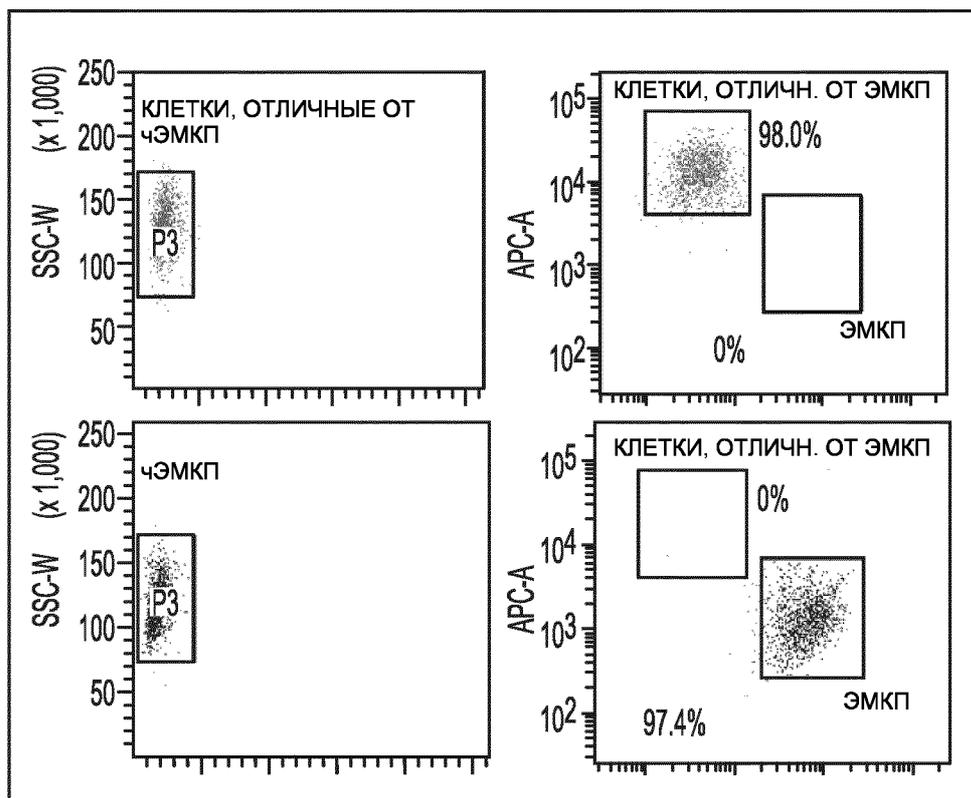
**ФИГ. 5**

## СОРТИРОВКА ЭМКП ОТ КЛЕТОК, ОТЛИЧНЫХ ОТ ЭМКП

НА ВХОДЕ



ПОСЛЕ СОРТИРОВКИ



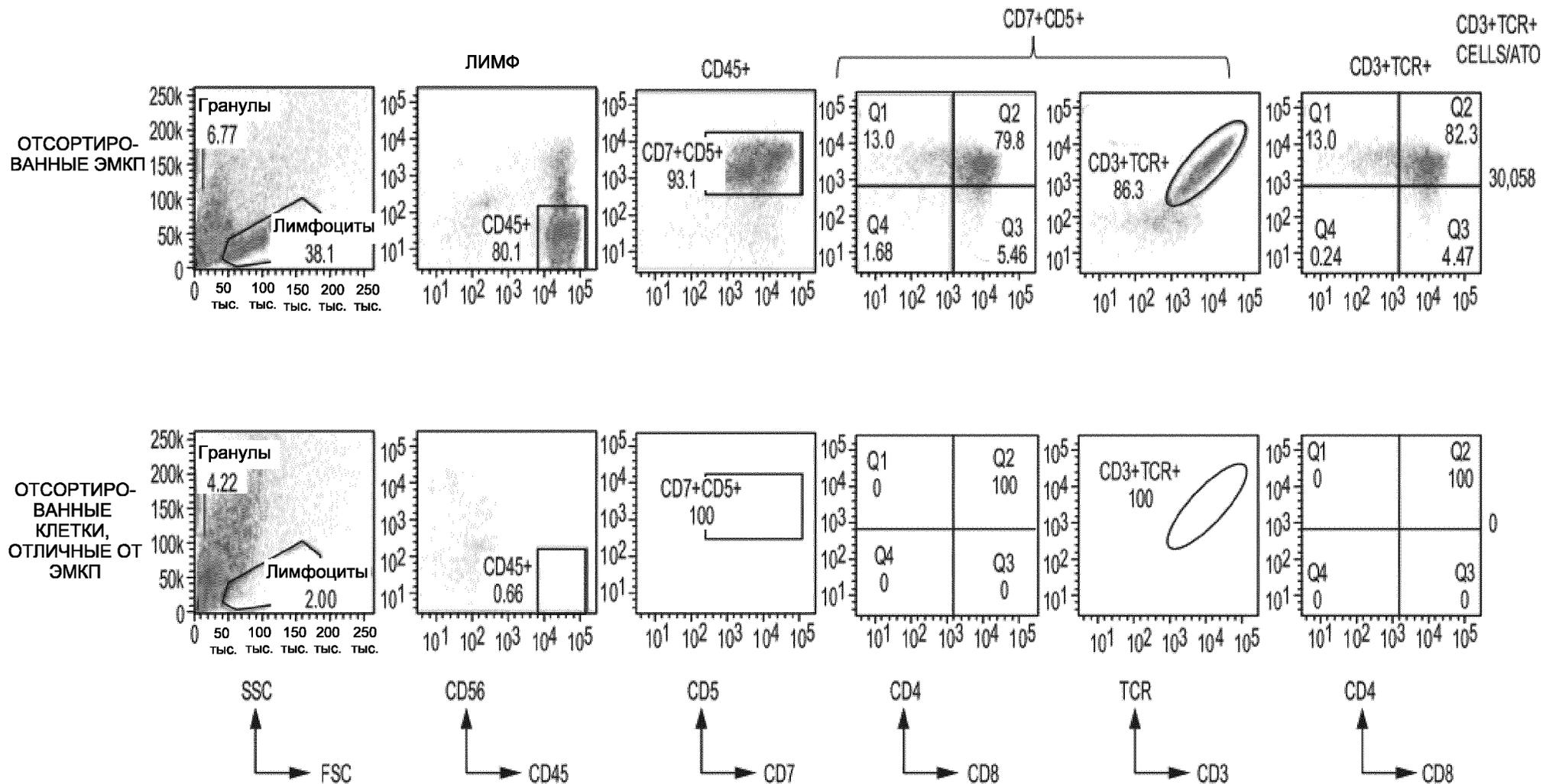
SSC-W

SSC-H

CD326

CD56

ФИГ. 6



ФИГ. 7