(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992469 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.27

(22) Дата подачи заявки
2018.04.18

(51) Int. Cl. ***C07K 14/725*** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 35/545 (2015.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИММУННЫЕ ЭФФЕКТОРНЫЕ КЛЕТКИ

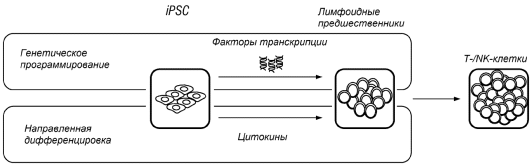
(31) **62/486,875**
(32) **2017.04.18**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/028133**
(87) **WO 2018/195175 2018.10.25**

(71) Заявитель:
ФУДЖИФИЛМ СЕЛЛЬЮЛАР ДАЙНАМИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Водяник Максим А., Чжан Синь, Брэндл Эндрю Дж., Раджеш Дипика, Свонсон Брэдли, Манн Кристи, Бертон Сара, Ван Вэнь Бо, Маклауд Итан (US)

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

(57) В настоящей заявке предложены способы получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и NK-клеток из плюрипотентных стволовых клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR). Кроме того, в настоящей заявке предложены способы адоптивной клеточной терапии путем введения эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, предложенных в настоящей заявке.



201992469 A1

201992469 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-559146EA/032

АНТИГЕНСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИММУННЫЕ ЭФФЕКТОРНЫЕ КЛЕТКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/486,875, поданной 18 апреля 2017 года, полное содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

1. Область техники

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к области молекулярной биологии. Более конкретно, оно касается способов и композиций, касающихся антигенспецифических иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки и NK-клетки.

2. Описание предшествующего уровня техники

[0003] Несмотря на технологические достижения в области диагностики и вариантов лечения, доступных для пациентов, у которых был диагностирован рак, часто прогноз все еще остается плохим, и многие пациенты не могут быть вылечены. Иммунотерапия дает надежду на эффективное, и при этом направленное лечение для пациентов, у которых были диагностированы различные опухоли, обладающее потенциалом уничтожения злокачественных опухолевых клеток без повреждения нормальных тканей. Теоретически, Т-клетки иммунной системы способны распознавать наборы белков, специфичные для опухолевых клеток, и опосредовать их разрушение с помощью различных эффекторных механизмов. Адоптивная Т-клеточная терапия представляет собой попытку использовать и усилить способность собственных Т-клеток пациента уничтожать опухоли, а затем вернуть эти эффекторы пациенту в состоянии, в котором они эффективно устраняют остаточную опухоль, не повреждая при этом здоровую ткань. Хотя этот подход не является новым в области онкоиммунологии, многие недостатки клинического применения адоптивной Т-клеточной терапии препятствуют полноценному применению этого подхода при лечении рака.

[0004] Существующие виды адоптивной Т-клеточной терапии ограничены отсутствием пациентов и опухолеспецифическими Т-клетками, включая их малую распространенность в организме, их неспособность преодолеть ряд механизмов уклонения опухоли от иммунной системы и их короткую продолжительность жизни. Трудно выделить и размножить обычно низкие количества Т-клеток, реагирующих на желаемый антиген. Следовательно, существует неудовлетворенная потребность в терапевтически удовлетворительных и функциональных антигенспецифических иммунных клетках для эффективного применения в иммунотерапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В первом варианте осуществления настоящего изобретения предложен способ получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, включающий конструирование плюрипотентных стволовых клеток (PSC) для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) с получением таким образом CAR-PSC;

дифференцировку или прямое перепрограммирование CAR-PSC в $CD34^+$ гемопоэтические клетки-предшественники (HPC); дальнейшую дифференцировку $CD34^+$ HPC в Т-клетки и/или NK-клетки; и размножение Т-клеток и/или NK-клеток. В некоторых аспектах размножение включает совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями с получением таким образом антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток.

[0006] В отдельных аспектах PSC, сконструированные для экспрессии CAR, представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) или эмбриональные стволовые клетки (ESC). В частных аспектах iPSC перепрограммированы из соматических клеток, таких как Т-клетки.

[0007] В некоторых аспектах стадия дифференцировки CAR-PSC в $CD34^+$ HPC включает проведение направленной дифференцировки. В отдельных аспектах направленная дифференцировка включает образование эмбриоидных телец (EB) в присутствии блеббистатина, ингибитора GSK-3, FGF2 и VEGF; приведение EB в контакт с BMP4, VEGF и FGF2 для стимуляции индукции мезодермы; и дифференцировку EB в присутствии лиганда Flt-3, IL-3, SCF и TPO с получением таким образом HPC. В некоторых аспектах дифференцировку проводят в средах, по существу не содержащих или не содержащих BMP4. В других аспектах дифференцировку проводят в присутствии BMP4. В частных аспектах ингибитор GSK-3 представляет собой CHIR99021. В некоторых аспектах дифференцировка дополнительно включает присутствие IL-11, цАМФ и/или VEGF.

[0008] В некоторых аспектах направленная дифференцировка включает культивирование одиночных PSC на поверхности, покрытой амином, в присутствии блеббистатина, BMP4, VEGF и bFGF; инициирование дифференцировки путем приведения PSC в контакт с BMP4, VEGF и FGF2; и дальнейшую дифференцировку PSC в присутствии лиганда Flt-3, IL-3, IL-6, SCF, TPO и гепарина с получением таким образом HPC, где способ не включает образование EB.

[0009] В частных аспектах способ включает культивирование клеток в определенных условиях без фидера, например, на протяжении всего способа. В некоторых аспектах PSC по существу не содержат трансгенов или не содержат трансгенов. В частных аспектах PSC являются человеческими. В отдельных аспектах Т-клетки представляют собой $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, регуляторные Т-клетки, естественные киллерные Т-клетки, наивные Т-клетки, Т-клетки памяти и/или гамма-дельта Т-клетки.

[0010] В отдельных аспектах PSC, сконструированные для экспрессии CAR, дополнительно сконструированы для экспрессии ERG/ETV2, GATA2 и HOXA9, например, под контролем одного индуцибельного промотора. В некоторых аспектах способ дополнительно включает конструирование PSC для экспрессии HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 и/или HOXA4. Таким образом, в некоторых аспектах стадия дифференцировки CAR-PSC в $CD34^+$ HPC включает индукцию экспрессии

ERG/ETV2, GATA2 и HOXA9 в течение периода времени, достаточного для получения HPC, и прекращение индукции экспрессии перед дальнейшей дифференцировкой HPC в Т-клетки и/или NK-клетки.

[0011] В конкретных аспектах стадия дифференцировки CAR-PSC в $CD34^+$ HPC дополнительно включает отбор клеток, экспрессирующих CD34 и/или CD43, перед дифференцировкой в антигенспецифические Т-клетки и/или NK-клетки. В частных аспектах отбор включает проведение магнитно-активированной сортировки клеток (MACS). В некоторых аспектах клетки, экспрессирующие CD34 и/или CD43, составляют по меньшей мере 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 процентов или более от общей популяции клеток. В некоторых аспектах стадию проведения MAC для отбора CD34 и/или CD43-положительных клеток не проводят.

[0012] В частных аспектах по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или более процентов HPC экспрессируют CAR. В некоторых аспектах по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или более процентов HPC экспрессируют CAR.

[0013] В некоторых аспектах дифференцировка HPC в Т-клетки и/или NK-клетки включает культивирование HPC на поверхности, покрытой ретронектином и Notch DLL-4, в присутствии аскорбиновой кислоты и никотинамида в условиях гипоксии. В некоторых аспектах культура дополнительно содержит SCF, лиганд FLT-3, TPO и IL-7, и, необязательно, содержит ингибитор GSK (например, CHIR99021), IL-2 и/или IL-12. В отдельных аспектах стадия размножения дополнительно включает культивирование антигенспецифических Т-клеток в присутствии антитела к CD3 и IL-2. В дополнительных аспектах стадия размножения дополнительно включает культивирование антигенспецифических Т-клеток в присутствии антитела к CD3, IL-2, IL-15 и IL-21. В некоторых аспектах стадия размножения включает культивирование антигенспецифических Т-клеток в присутствии антитела к CD3, лиганда FLT3, IL-7, IL-2 и/или IL-15 и, необязательно, дополнительно включает SCF, TPO и/или IL-21. В частных аспектах по меньшей мере 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более процентов дифференцированных $CD34^+$ HPC представляют собой $CD3^+CAR^+$ Т-клетки. В некоторых аспектах по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 или более процентов дифференцированных $CD34^+$ HPC представляют собой $CD3^-$ CAR^+ NK-клетки. В некоторых аспектах по меньшей мере 2 процента размноженных $CD34^+$ HPC представляют собой $CD3^+CAR^+$ Т-клетки. В частных аспектах по меньшей мере 10 процентов размноженных $CD34^+$ HPC представляют собой $CD3^-CAR^+$ NK-клетки.

[0014] В отдельных аспектах CAR и антигенспецифические клетки-мишени нацелены на один и тот же антиген. В одном конкретном аспекте антиген представляет собой CD19. В частных аспектах антигенспецифические клетки-мишени представляют собой опухолевые клетки. В некоторых аспектах антигенспецифические клетки-мишени являются человеческими. В частных аспектах антигенспецифические клетки-мишени являются отрицательными по HLA I класса. В некоторых аспектах по меньшей мере 5,

например, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 или более, процентов антигенспецифических эффекторных Т-клеток проявляют цитотоксическую активность против клеток-мишеней. В отдельных аспектах по меньшей мере 10, например, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более, процентов антигенспецифических эффекторных NK-клеток проявляют цитотоксическую активность против клеток-мишеней.

[0015] В некоторых аспектах CAR кодируется ДНК, интегрированной в геном PSC. В отдельных аспектах CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающую область. В конкретных аспектах внутриклеточные сигнальные домены содержат CD3ζ и CD28. В некоторых аспектах антигенсвязывающая область представляет собой F(ab')2, Fab', Fab, Fv или scFv.

[0016] В отдельных аспектах PSC являются HLA-гомозиготными. В некоторых аспектах HLA-гомозиготные PSC являются гомозиготными по одному или более из аллелей локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP или HLA-DQ. В отдельных аспектах HLA-гомозиготные PSC являются гомозиготными по двум из аллелей локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP или HLA-DQ. В частных аспектах HLA-гомозиготные PSC являются гомозиготными по HLA-A и HLA-B. В отдельных аспектах HLA-гомозиготные PSC являются гомозиготными по HLA-A, HLA-B и HLA-C.

[0017] В еще одном варианте осуществления предложен способ получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, включающий конструирование PSC для экспрессии CAR с получением таким образом CAR-PSC; культивирование CAR-PSC в присутствии блеббистатина, ингибитора GSK-3, FGF2 и VEGF с получением таким образом EB; приведение EB в контакт с BMP4, VEGF и FGF2для стимуляции индукции мезодермы; дифференцировку EB в присутствии лиганда Flt-3, BMP4, IL-3, SCF и TPO с получением таким образом $CD34^+$ HPC; дальнейшую дифференцировку $CD34^+$ HPC в Т-клетки и/или NK-клетки; и размножение Т-клеток и/или NK-клеток, где размножение включает совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями с получением таким образом антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток. В частных аспектах ингибитор GSK-3 представляет собой CHIR99021.

[0018] В еще одном варианте осуществления предложен способ получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, включающий конструирование PSC для экспрессии CAR с получением таким образом CAR-PSC; культивирование одиночных CAR-PSC на поверхности, покрытой амином, в присутствии блеббистатина, BMP4, VEGF, и инициирование дифференцировки путем приведения CAR-PSC в контакт с BMP4, VEGF и FGF2; дальнейшую дифференцировку CAR-PSC в присутствии лиганда Flt-3, IL-3, IL-6, SCF, TPO и гепарина с получением таким образом $CD34^+$ HPC; дифференцировку $CD34^+$ HPC в Т-клетки и/или NK-клетки; и размножение Т-клеток и/или NK-клеток, где размножение включает совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями с получением таким образом

антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, где способ не включает образование EB.

[0019] В дополнительном варианте осуществления предложен способ получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, включающий конструирование PSC для экспрессии CAR с получением таким образом CAR-PSC; дифференцировку CAR-PSC в $CD34^+$ HPC; отбор $CD34^+CD43^+$ HPC; дальнейшую дифференцировку $CD34^+CD43^+$ HPC в Т-клетки и/или NK-клетки; и размножение Т-клеток и/или NK-клеток, где размножение включает совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями с получением таким образом антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток.

[0020] В еще одном варианте осуществления предложена популяция антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, полученных в соответствии с вариантами осуществления, описанными выше. В настоящей заявке также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенспецифические эффекторные Т-клетки и/или NK-клетки, полученные в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящей заявке. Кроме того, в настоящей заявке предложена композиция, содержащая антигенспецифические эффекторные Т-клетки и/или NK-клетки, полученные в соответствии с вариантами осуществления, для лечения рака у субъекта. В настоящей заявке также предложено применение антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, полученных в соответствии с вариантами осуществления, для лечения рака.

[0021] В еще одном варианте осуществления предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, полученных в соответствии с вариантами осуществления, описанными в настоящей заявке. В некоторых аспектах рак экспрессирует опухолевый антиген, и антигенспецифические эффекторные Т-клетки и/или NK-клетки нацелены на указанный опухолевый антиген. В частных аспектах субъект представляет собой человека.

[0022] Другие объекты, признаки и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующего подробного описания изобретения. Однако следует понимать, что подробное описание изобретения и конкретные примеры, указывающие предпочтительные варианты осуществления изобретения, одновременно приведены только в иллюстративных целях, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники из этого подробного описания изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0023] Приведенные ниже графические материалы являются частью настоящего описания и включены для дополнительной иллюстрации отдельных аспектов настоящего изобретения. Изобретение может быть лучше понято со ссылкой на один или более из

этих графических материалов в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов его осуществления, представленных в настоящей заявке.

[0024] ФИГ. 1A-1G: (ФИГ. 1A) Схематическое изображение способов получения Т-клеток и NK-клеток из PSC, включая методы прямого программирования и методы направленной дифференцировки. (ФИГ. 1B) Диаграмма, представляющая дифференцировку hPCS в Т- и NK-клетки в отсутствие фидера и сыворотки. Сокращения: CHIR - ингибитор GSK-3 CHIR99021; HDM, бессывороточная среда для гемопоэтической дифференцировки; TCDM, среда для Т-клеточной дифференцировки; TCEM, среда для размножения Т-клеток; HPC, гемопоэтические клетки-предшественники; звездочкой (*) помечены необязательные стимулирующие компоненты. (ФИГ. 1C) Эффективность получения $CD34^{+}CD43^{+}$ HPC из PSC посредством направленной дифференцировки или прямого программирования. (ФИГ. 1D) Проточный цитометрический анализ культур для дифференцировки в T/NK. (ФИГ. 1E) Выход различных популяций клеток в течение дифференцировки. (ФИГ. 1F) Фенотип Т-клеток, полученных из PSC. (ФИГ. 1G) Размножение Т-клеток, полученных из PSC. Иммобилизованные антитела к CD3 (iCD3) предназначены для размножения Т-клеток, полученных из PSC (гистограмма). Т-клетки, пролиферирующие в культуре для размножения, приобретают характерную морфологию лимфобластов неправильной формы (фотография). Т-клетки через 2 недели размножения приобретают экспрессию CD56 и CD8 (точечные диаграммы проточной цитометрии).

[0025] ФИГ. 2: экспрессия CAR в T/NK-клетках, полученных из PSC. Экспрессию CAR на стадиях дифференцировки оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием окрашивания белком L. $CD3^{+}$ Т-клетки совместно окрашивали лямбда-цепью мышиного mAb к человеческому CD3 (клон SP34-2). Показана экспрессия CAR E11 PSC и полученными из E11 HPC и Т-клетками.

[0026] ФИГ. 3A-B: Цитотоксичность in vitro, опосредованная CAR к CD19, в T/NK-клетках, полученных из PSC. (ФИГ. 3A) Анализ цитотоксичности in vitro с использованием экспрессирующих люциферазу $CD19^{+}$ клеток-мишеней Daudi и Raji,. (ФИГ. 3B) Цитолитический потенциал CAR-Т-клеток путем подсчета клеток-мишеней в реальном времени с использованием системы анализа живых клеток Incucyte S3 (Essen Bioscience).

[0027] ФИГ. 4: В ызванная CAR к CD19 продукция цитокинов in vitro в T/NK-клетках, полученных из PSC.

[0028] ФИГ. 5A-5B: Онколитический потенциал in vivo клеток CAR-T/NK, полученных из PSC. (ФИГ. 5A). За прогрессированием опухолей у мышей наблюдали с помощью биолюминесцентной визуализации in vivo. (ФИГ. 5B) Кривые выживания у разных групп мышей, получавших либо Т- (1C), либо NK- (A16) клетки, полученные из PSC.

Описание иллюстративных вариантов осуществления

[0029] В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены высокоэффективные способы получения антигенспецифических иммунных

эффекторных клеток из человеческих плюрипотентных стволовых клеток (PSC), сконструированных для экспрессии антигенного рецептора, такого как химерный антигенный рецептор (CAR), обозначаемых в настоящей заявке как CAR-PSC. Иммунные эффекторные клетки, получаемые настоящими способами, могут включать, не ограничиваясь перечисленным, Т-клетки, NK-клетки и iNKT-клетки.

[0030] PSC могут быть получены путем перепрограммирования (например, ретровирусными или эписомальными методами) исходной популяции Т-клеток с получением iPSC, полученных из Т-клеток (TiPSC). Т-клетки могут быть выделены из различных источников, таких как образец крови. Исходная популяция Т-клеток может сохранять характерные перестройки генов Т-клеточного рецептора (TCR) и может представлять собой HLA-гомозиготные клетки (то есть, гомозиготные по генам ГКГС I и II класса). Соответственно, iPSC могут быть получены из клеток, выделенных из HLA-гомозиготных субъектов, называемых в настоящей заявке супердонорами HLA.

[0031] CAR-PSC затем могут быть дифференцированы или запрограммированы для получения $CD34^+$ гемопоэтических клеток-предшественников (HPC). Это может быть достигнуто путем направленной дифференцировки с использованием комбинации цитокинов (например, SCF, TPO, FLT-3, IL-6, IL-3 и гепарина) (например, описанных в заявке PCT/US2016/057899, полностью включенной в настоящую заявку посредством ссылки). В альтернативном способе CAR-PSC могут быть дифференцированы в $CD34^+$ HPC с использованием прямого программирования с использованием конструкции экспрессии, кодирующей ETV2/ERG, GATA2 и HOXA9 (то есть, EGH) (например, описанной в заявке PCT/US2016/057893, полностью включенной в настоящую заявку посредством ссылки). Эти EGH-PSC могут быть дополнительно сконструированы для экспрессии HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 и/или HOXA4 для долгосрочной способности к пересадке.

[0032] Наконец, $CD34^+$ CAR-HPC могут быть дифференцированы в $CD3^+$ Т-клетки или $CD56^+CD3^-$ NK-клетки. Оптимальный срок в ходе дифференцировки HPC (например, дни с 7 по 11) для лимфоидного потенциала может составлять дни с 7 по 11, что идентифицируют по экспрессии CD34 и CD43. Например, HPC с повышенным лимфоидным потенциалом могут быть выделены путем сортировки фракций клеток, положительных по двум или более из маркеров CD144, CD34, CD45 и CD7.

[0033] Иллюстративный способ дифференцировки Т-клеток включает использование RetroNectin и DLL-4 в качестве матрицы без фидера. Дифференцировка Т-клеток может быть дополнительно усилена путем использования аскорбиновой кислоты для повышения эффективности и созревания, а также путем культивирования в условиях гипоксии.

[0034] Кроме того, Т-клетки и/или NK-клетки могут быть размножены путем совместного культивирования с антигенспецифическими клетками-мишенями (например, опухолевыми клетками) в ходе процесса дифференцировки. Было обнаружено, что этот способ увеличивает цитотоксическую активность Т-клеток и NK-клеток против клеток-

мишеней, что, в частности, проявляется как уменьшение роста опухоли и увеличение выживаемости мышей, которым инъецировали опухолевые клетки.

[0035] Таким образом, способы согласно настоящему изобретению могут обеспечить неограниченное количество антигенспецифических иммунных эффекторных клеток, таких как Т-клетки и NK-клетки, для широкого диапазона применений, таких как стабильная трансплантация in vivo, скрининг соединений in vitro, а также изучение механизмов гематологических заболеваний и повреждений.

Определения

[0036] В контексте настоящей заявки термин «по существу не содержащий» в отношении определенного компонента используется для обозначения того, что ни один из указанных компонентов не был целенаправленно включен в состав в композиции и/или присутствует только в качестве загрязняющей примеси или в следовых количествах. Таким образом, общее количество указанного компонента, обусловленное любым непреднамеренным загрязнением композиции, составляет значительно ниже 0,05%, предпочтительно ниже 0,01%. Наиболее предпочтительной является композиция, в которой не может быть обнаружено никакое количество указанного компонента стандартными аналитическими методами.

[0037] В контексте нестоящего описания употребление единственного числа может означать один или несколько. В пункте(ах) формулы изобретения в составе настоящей заявки, при использовании в сочетании со словом «содержащий», единственное число может означать один или более чем один.

[0038] Термин «или» в формуле изобретения употребляется в значении «и/или», если явно не указано, что он относится только к альтернативам, или альтернативы являются взаимоисключающими, хотя раскрытие поддерживает определение, относящееся только к альтернативам и «и/или». В контексте настоящей заявки термин «другой» может означать по меньшей мере второй или более.

[0039] Во всей настоящей заявке термин «приблизительно» используется для указания на то, что значение включает неотъемлемую вариацию ошибки, обусловленную прибором, способом, используемым для определения значения, или вариацию, которая существует среди субъектов исследования.

[0040] Термин «экзогенный» при использовании в отношении белка, гена, нуклеиновой кислоты или полинуклеотида в клетке или организме относится к белку, гену, нуклеиновой кислоте или полинуклеотиду, который был введен в клетку или организм искусственными или природными средствами; или в отношении клетки указанный термин относится к клетке, которая была выделена и впоследствии введена в другие клетки или в организм искусственными или природными средствами. Экзогенная нуклеиновая кислота может происходить из другого организма или клетки, или она может представлять собой одну или несколько дополнительных копий нуклеиновой кислоты, которая естественным образом присутствует в организме или клетке. Экзогенная клетка может происходить из другого организма или из этого же организма. В качестве

неограничивающего примера экзогенная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая находится в месте в хромосоме, отличном от того, где она находилась бы в природных клетках, или иным образом фланкирована последовательностью нуклеиновой кислоты, отличной от той, которая встречается в природе.

[0041] Под «конструкцией экспрессии» или «кассетой экспрессии» подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, способная направлять транскрипцию. Конструкция включает, как минимум, один или более элементов контроля транскрипции (таких как промоторы, энхансеры или функционально эквивалентные им структуры), которые направляют экспрессию генов в одном или нескольких желаемых типах клеток, тканях или органах. Также могут быть включены дополнительные элементы, такие как сигнал терминации транскрипции.

[0042] «Вектор» или «конструкция» (иногда называемая системой доставки генов или «носителем» для переноса генов) относится к макромолекуле или комплексу молекул, содержащим полинуклеотид, подлежащий доставке в клетку-хозяина in vitro или in vivo.

[0043] «Плазмида», распространенный тип вектора, представляет собой внехромосомную молекулу ДНК, отдельную от хромосомной ДНК, способную реплицироваться независимо от хромосомной ДНК. В некоторых случаях она является круглой и двухцепочечной.

[0044] «Точка начала репликации» («ori») или «начало репликации» представляет собой последовательность ДНК, например, в лимфотропном вирусе герпеса, которая в случае присутствия в плазмиде в клетке способна поддерживать связанные последовательности в плазмиде и/или сайте в месте или вблизи места, где начинается синтез ДНК. В качестве примера, ori для EBV (вирус Эпштейна-Барр) включает последовательности FR (20 несовершенных копий повтора 30 п.н.) и предпочтительно DS (двухцепочечные) последовательности; однако другие сайты в EBV связывают EBNA-1, например, последовательности Rep* могут заменять DS в качестве точки начала репликации (Kirshmaier and Sugden, 1998). Таким образом, точка начала репликации EBV включает последовательности FR, DS или Rep*, или любые функционально эквивалентные последовательности, получаемые из них посредством модификаций нуклеиновых кислот или синтетических комбинаций. Например, в настоящем изобретении может также быть использована генетически сконструированная точка начала репликации EBV, например, сконструированная путем инсерции или мутации отдельных элементов, как конкретно описано в источнике Lindner et al., 2008.

[0045] «Ген», «полинуклеотид», «кодирующая область», «последовательность», «сегмент», «фрагмент» или «трансген», который «кодирует» конкретный белок, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется и, необязательно, также транслируется в продукт гена, например, полипептид, in vitro или in vivo, будучи помещенной под контроль соответствующих регуляторных последовательностей. Кодирующая область может присутствовать в форме кДНК,

геномной ДНК или РНК. Когда она присутствует в форме ДНК, молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной (то есть, смысловой цепью) или двухцепочечной. Границы кодирующей области определяются стартовым кодоном на 5'- (амино) конце и стоп-кодоном трансляции на 3'- (карбокси) конце. Ген может включать, не ограничиваясь перечисленным, кДНК из прокариотической или эукариотической мРНК, последовательности геномной ДНК из прокариотической или эукариотической ДНК, и синтетические последовательности ДНК. Последовательность терминации транскрипции, как правило, является 3'-концевой относительно последовательности гена.

[0046] Термин «элементы контроля» в совокупности относится к промоторным областям, сигналам полиаденилирования, последовательностям терминации транскрипции, вышерасположенным регуляторным доменам, точкам начала репликации, участкам внутренней посадки рибосомы (IRES), энхансерам, границам сплайсинга и тому подобному, которые в совокупности обеспечивают репликацию. транскрипцию, посттранскрипционный процессинг и трансляцию кодирующей последовательности в клетке-реципиенте. Присутствие всех этих элементов контроля не обязательно при условии, что выбранная кодирующая последовательность способна к репликации, транскрибированию и трансляции в соответствующей клетке-хозяине.

[0047] Термин «промотор» в настоящей заявке используется в его обычном смысле для обозначения нуклеотидной области, содержащей регуляторную последовательность ДНК, где регуляторная последовательность происходит от гена, способного связывать РНК-полимеразу и инициировать транскрипцию нижерасположенной (в 3'-направлении) кодирующей последовательности. Он может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции, чтобы инициировать специфическую транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты. Фразы «функционально расположенный», «функционально связанный», «под контролем» и «под трнаскрипционным контролем транскрипции» означают, что промотор находится в правильном функциональном положении и/или ориентации относительно последовательности нуклеиновой кислоты для контроля инициации транскрипции и/или экспрессии этой последовательности.

[0048] Под «энхансером» подразумевается последовательность нуклеиновой кислоты, которая, будучи расположенной вблизи промотора, придает повышенную транскрипционную активность по сравнению с транскрипционной активностью, обусловленной только промотором, в отсутствие энхансерного домена.

[0049] Под «функционально связанным» или «совместно экспрессируемым» по отношению к молекулам нуклеиновой кислоты подразумевается, что две или более молекулы нуклеиновой кислоты (например, молекула нуклеиновой кислоты, подлежащая транскрипции, промотор и энхансерный элемент) связаны так, чтобы разрешить транскрипцию молекулы нуклеиновой кислоты. «Функционально связанный» или «совместно экспрессируемый» по отношению к молекулам пептидов и/или полипептидов означает, что две или более молекулы пептида и/или полипептида связаны таким образом,

что образуется одна полипептидная цепь, то есть, слитый полипептид, имеющий по меньшей мере одно свойство каждого пептидного и/или полипептидного компонента слитой молекулы. Слитый полипептид предпочтительно является химерным, то есть, состоит из гетерологичных молекул.

[0050] «Гомология» относится к проценту идентичности двух полинуклеотидов или двух полипептидов. Соответствие между одной и второй последовательностью может быть определено методами, известными в данной области техники. Например, гомология может быть определена путем прямого сравнения информации о последовательности двух молекул полипептидов путем выравнивания информации о последовательности и использования доступных компьютерных программ. В качестве альтернативы, гомология может быть определена путем гибридизации полинуклеотидов в условиях, способствующих образованию стабильных дуплексов между гомологичными областями, с последующим расщеплением нуклеазой(ами), специфичной к одноцепочечным участкам, и определением размера расщепленных фрагментов. Две последовательности ДНК или две полипептидные последовательности являются «по существу гомологичными» друг другу, когда по меньшей мере приблизительно 80%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95% нуклеотидов или аминокислот, соответственно, совпадают на определенном участке длины молекул, как определено с использованием вышеописанных способов.

[0051] Термин «клетка» в настоящей заявке используется в самом широком смысле в данной области техники и относится к живому организму, который является структурной единицей ткани многоклеточного организма, окружен мембранной структурой, которая изолирует его от окружающей среды, обладает способностью самовоспроизводиться и имеет генетическую информацию и механизм ее экспрессии. Клетки, используемые в настоящей заявке, могут быть природными клетками или искусственно модифицированными клетками (например, слитыми клетками, генетически модифицированными клетками и т. д.).

[0052] Термин «стволовая клетка» в настоящей заявке относится к клетке, которая в подходящих условиях способна дифференцироваться в широкий спектр специализированных типов клеток, а в других подходящих условиях способна к самообновлению и сохранению в практически недифференцированном плюрипотентном состоянии. Термин «стволовая клетка» также охватывает плюрипотентную клетку, мультипотентную клетку, клетку-прекурсор и клетку-предшественника. Иллюстративные человеческие стволовые клетки могут быть получены из гемопоэтических или мезенхимальных стволовых клеток, полученных из ткани костного мозга, эмбриональных стволовых клеток, полученных из эмбриональной ткани, или эмбриональных зародышевых клеток, полученных из генитальной ткани плода. Иллюстративные плюрипотентные стволовые клетки также могут быть получены из соматических клеток путем перепрограммирования их в плюрипотентное состояние посредством экспрессии определенных факторов транскрипции, связанных с плюрипотентностью; эти клетки

называются «индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками» или «клетками iPSC или iPS».

[0053] «Эмбриональная стволовая (ES) клетка» представляет собой недифференцированную плюрипотентную клетку, получаемую из эмбриона на ранней стадии развития, такую как внутренняя клеточная масса на стадии бластоцисты, или полученную искусственными средствами (например, с помощью ядерного переноса), способную давать начало любому типу дифференцированных клеток эмбриона или взрослого организма, включая зародышевые клетки (например, сперму и яйцеклетки).

[0054] «Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (клетки iPSC или iPS)» представляют собой клетки, полученные путем перепрограммирования соматической клетки путем экспрессии или индукции экспрессии комбинации факторов (в настоящей заявке называемых факторами перепрограммирования). Клетки iPS могут быть получены с использованием соматических клеток плода, постнатального, новорожденного, ювенильного или взрослого организма. В отдельных вариантах осуществления факторы, которые могут применяться для перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки, включают, например, Oct4 (иногда называемый Oct 3/4), Sox2, c-Myc, Klf4, Nanog и Lin28. В некоторых вариантах осуществления соматические клетки перепрограммируют путем экспрессии по меньшей мере двух факторов перепрограммирования, по меньшей мере трех факторов перепрограммирования, по меньшей мере четырех факторов перепрограммирования, по меньшей мере пяти факторов перепрограммирования, по меньшей мере шести факторов перепрограммирования или по меньшей мере семи факторов перепрограммирования, чтобы перепрограммировать соматическую клетку в плюрипотентную стволовую клетку.

[0055] «Гемопоэтические клетки-предшественники» или «гемопоэтические клетки-прекурсоры» относятся к клеткам, которые относятся к гемопоэтической линии, но способны к дальнейшей гемопоэтической дифференцировке и включают гемопоэтические стволовые клетки, мультипотенциальные гемопоэтические стволовые клетки, общие миелоидные предшественники, предшественники мегакариоцитов, предшественники эритроцитов и лимфоидные предшественники. Гемопоэтические стволовые клетки (HSC) представляют собой мультипотентные стволовые клетки, дающие начало всем типам клеток крови, включая миелоидные (моноциты и макрофаги, гранулоциты (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы и тучные клетки), эритроциты, мегакариоциты/тромбоциты, дендритные клетки) и лимфоидные линии (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки) (см., например, Doulatov et al., 2012; Notta et al., 2015). Термин «мультилимфоидный предшественник» (MLP) описывает любого предшественника, который дает начало всем лимфоидным линиям (В-, Т- и NK-клетки), но может иметь или не иметь другие (миелоидные) потенциалы (Doulatov et al., 2010) и является $CD45RA^{+}/CD10^{+}/CD7^{-}$. Любой предшественник В-, Т- и NK-клеток может называться MLP. «Общий миелоидный предшественник» (CMP) относится к общему миелоидному предшественнику, определяемому экспрессией CD45+/$CD31^{+}/CD43^{+}/CD34^{-}$ клеток, которые могут давать

начало гранулоцитам, моноцитам, мегакариоцитам и эритроцитам. Гемопоэтические клетки-предшественники могут экспрессировать CD34. Гемопоэтические клетки-предшественники могут совместно экспрессировать CD133 и быть отрицательными по экспрессии CD38. Гемопоэтические клетки-предшественники включают $CD34^+$ / $CD45^+$ гемопоэтические клетки-предшественники и $CD34^+$ / $CD45^+$ / $CD43^+$ гемопоэтические клетки-предшественники. $CD34^+$ / $CD43^+$ / $CD45^+$ гемопоэтические клетки-предшественники могут быть в высокой степени обогащены миелоидными предшественниками. Гемопоэтические клетки также включают различные субпопуляции примитивных гемопоэтических клеток, в том числе: $CD34^-/CD133^+/CD38^-$ (примитивные гемопоэтические клетки-предшественники), CD43(+)CD235a(+)CD41a(+/-) (эритро-мегакариопоэтические), lin(-)CD34(+)CD43(+)CD45(-) (мультипотентные) и lin(-)CD34(+)CD43(+)CD45(+) (миелоидные-деформированные) клетки, CD133+/ALDH+ (альдегиддегидрогеназа). Предполагается, что любой из этих типов примитивных гемопоэтических клеток или гемопоэтических клеток-предшественников может быть превращен в клетки iPS, как описано в настоящей заявке. В некоторых аспектах клетки могут включать тучные клетки, клетки Лангерганса, остеокласты, NK-клетки, Т-клетки, CIK-Т-клетки или другие подтипы Т-клеток, NK-клеток и В-клеток.

[0056] В контексте настоящей заявки термин «иммунная(ые) клетка(и)» относится к клеткам иммунной системы, включая, не ограничиваясь перечисленным, Т-клетки, NK-клетки, T/NK-клетки, дендритные клетки, макрофаги, В-клетки, нейтрофилы, эритроциты, моноциты, базофилы, нейтрофилы, тучные клетки, эозинфилы и любую их комбинацию.

[0057] «Активатор» Т-клетки или состояние, которое активирует Т-клетку, относится к стимулу, который активирует Т-клетки и включает антигены, которые могут быть презентированы на антигенпрезентирующих клетках или на других поверхностях; поликлональные активаторы, которые связываются со многими комплексами Т-клеточных рецепторов (TCR) независимо от специфичности и включают лектины, например, конканавалин А (Con-A) и фитогемагглютинин (PHA), и агенты, такие как антитела, которые специфически связываются с инвариантными каркасными эпитопами на белках TCR или CD3; и суперантигены, которые стимулируют значительное количество Т-клеток и включают, например, энтеротоксины, такие как стафилококковые энтеротоксины.

[0058] Термины «Т-лимфоцит» и «Т-клетка» используются взаимозаменяемо и относятся к клетке, которая экспрессирует TCR, способный распознавать антиген при отображении на поверхности антигенпрезентирующих клеток или матрицы вместе с одной или более молекулами ГКГС или одной или более неклассическими молекулами ГКГС.

[0059] Термин «Т-клетка» относится к Т-лимфоцитам, как определено в данной области техники, и подразумевается, что он включает тимоциты, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, покоящиеся Т-лимфоциты или активированные Т-лимфоциты. Т-клетки могут представлять собой $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, $CD4^+CD8^+$ Т-клетки или клетки $CD4^-CD8^-$. Т-клетки также могут представлять собой Т-хелперные клетки, такие

как Т-хелперные 1 (TH1) или Т-хелперные 2 (TH2) клетки, или TH17-клетки, а также цитотоксические Т-клетки, регуляторные Т-клетки, естественные киллерные Т-клетки, наивные Т-клетки, Т-клетки памяти или гамма-дельта-Т-клетки (Wilson et al., 2009; Wynn, 2005; Ladi et al., 2006). Т-клетки, которые отличаются друг от друга по меньшей мере одним маркером, таким как CD4, называются в настоящей заявке «субпопуляциями» Т-клеток.

[0060] «$CD4^+$ Т-клетки» относятся к субпопуляции Т-клеток, экспрессирующих CD4 на своей поверхности и связанных с клеточно-опосредованным иммунным ответом. Они характеризуются профилями секреции после стимуляции, которые могут включать секрецию цитокинов, таких как IFN-гамма, TNF-альфа, IL-2, IL-4 и IL-10. «CD4» представляют собой гликопротеины массой 55 кДа, первоначально определяемые как дифференцировочные антигены на Т-лимфоцитах, но также обнаруженные на других клетках, включая моноциты/макрофаги. Антигены CD4 являются членами семейства супергенов иммуноглобулинов и участвуют в качестве ассоциативных распознающих элементов в иммунных ответах, рестриктированных по ГКГС (главный комплекс гистосовместимости) II класса. На Т-лимфоцитах они определяют субпопуляцию хелперов/индукторов.

[0061] «$CD8^+$ Т-клетки» относятся к субпопуляции Т-клеток, которые экспрессируют CD8 на своей поверхности, рестриктированы по ГКГС I класса и выполняют функцию цитотоксических Т-клеток. Молекулы «CD8» представляют собой дифференцировочные антигены, находящиеся на тимоцитах и цитотоксических и супрессорных Т-лимфоцитах. Антигены CD8 являются членами семейства супергенов иммуноглобулинов и являются ассоциативными распознающими элементами во взаимодействиях, рестриктированных по главному комплексу гистосовместимости I класса.

[0062] «Плюрипотентная стволовая клетка» относится к стволовой клетке, которая потенциально может дифференцироваться во все клетки, составляющие одну или более тканей или органов, или, предпочтительно, в любой из трех зародышевых листков: энтодерму (эпителий желудка, желудочно-кишечного тракта, легких), мезодерму (мышцы, кости, кровь, мочеполовая система) или эктодерму (эпидермальные ткани и нервная система).

[0063] В контексте настоящей заявки термин «соматическая клетка» относится к любой клетке, отличной от зародышевых клеток, такой как яйцеклетка, сперма или тому подобное, которая напрямую не передает свою ДНК следующему поколению. Как правило, соматические клетки имеют ограниченную плюрипотентность или не имеют ее. Соматические клетки, используемые в настоящей заявке, могут быть природными или генетически модифицированными.

[0064] «Программирование» представляет собой процесс, изменяющий тип потомства, которое может производить клетка. Например, клетка является запрограммированной, если она была изменена так, чтобы она могла образовать

потомство по крайней мере одного нового типа клеток, либо в культуре, либо in vivo, по сравнению с тем, что она могла бы образовать в тех же условиях без программирования. Это означает, что после достаточной пролиферации наблюдается измеримая доля потомства, имеющая фенотипические характеристики нового типа клеток, если такое потомство по существу не могло быть образовано до программирования; в качестве альтернативы, доля, имеющая характеристики нового типа клеток, заметно больше, чем до программирования. Этот процесс включает дифференцровку, дедифференцировку и трансдифференцировку.

[0065] «Дифференцировка» представляет собой процесс, посредством которого менее специализированная клетка становится более специализированным типом клетки. «Дедифференцировка» представляет собой клеточный процесс, при котором частично или полностью дифференцированная клетка возвращается к более ранней стадии развития, такой как плюрипотентность или мультипотентность. «Трансдифференцировка» представляет собой процесс преобразования одного дифференцированного типа клеток в другой дифференцированный тип клеток. Как правило, трансдифференцировка посредством программирования происходит без прохождения клеток через промежуточную стадию плюрипотентности, то есть, клетки программируются непосредственно из одного дифференцированного типа клеток в другой дифференцированный тип клеток. При определенных условиях доля потомства с характеристиками нового типа клеток может составлять по меньшей мере приблизительно 1%, 5%, 25% или более в порядке возрастания предпочтения.

[0066] «Перепрограммирование» представляет собой процесс, придающий клетке заметно повышенную способность образовывать потомство по меньшей мере одного нового типа клеток, как в культуре, так и in vivo, по сравнению со способностью, которую она имела бы при тех же условиях без перепрограммирования. В частности, перепрограммирование представляет собой процесс, который наделяет соматическую клетку плюрипотентным потенциалом. Это означает, что после достаточной пролиферации наблюдается измеримая доля потомства, имеющая фенотипические характеристики нового типа клеток, если такое потомство по существу не могло быть образовано до перепрограммирования; или же доля, имеющая характеристики нового типа клеток, заметно больше, чем до перепрограммирования. При определенных условиях доля потомства с характеристиками нового типа клеток может составлять по меньшей мере приблизительно 1%, 5%, 25% или более в порядке возрастания предпочтения.

[0067] Термин «прямое программирование» относится к программированию мультипотентной или плюрипотентной клетки, в отличие от дифференцированной соматической клетки, которая не имеет плюрипотентности, путем предоставления мультипотентной или плюрипотентной клетке одного или более специфических генов, определяющих линию, или продуктов генов. Например, прямое программирование может описывать процесс программирования ESC или iPSC в гемопоэтические клетки-

предшественники или другие клетки-предшественники, или в гемопоэтические клетки или другие дифференцированные соматические клетки.

[0068] В контексте настоящей заявки термин «субъект» или «субъект, нуждающийся в этом» относится к млекопитающему, предпочтительно человеку, мужчине или женщине в любом возрасте, нуждающимся в трансплантации клетки или ткани. Обычно субъект (также называемый в настоящей заявке реципиентом) нуждается в трансплантации клетки или ткани из-за расстройства или патологического или нежелательного состояния, процесса, или синдрома, или физического, морфологического или физиологического отклонения, которое поддается лечению посредством трансплантации клетки или ткани.

[0069] В контексте настоящей заявки «нарушение» гена относится к устранению или уменьшению экспрессии одного или более продуктов гена, кодируемых указанным геном в клетке, по сравнению с уровнем экспрессии продукта гена в отсутствие нарушения. Примеры продуктов генов включают мРНК и белковые продукты, кодируемые геном. Нарушение в некоторых случаях является временным или обратимым, а в других случаях является постоянным. Нарушение в некоторых случаях относится к функциональному или полноразмерному белку или мРНК, несмотря на тот факт, что может быть получен усеченный или нефункциональный продукт. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке нарушена активность или функция гена, в отличие от экспрессии. Нарушение гена обычно вызывают искусственными методами, то есть, добавлением или введением соединения, молекулы, комплекса или композиции, и/или нарушением нуклеиновой кислоты гена или связанной с геном, например, на уровне ДНК. Примеры способов нарушения генов включают методы сайленсинга генов, нокдауна, нокаута и/или такие методы нарушения генов, как редактирование генов. Примеры включают антисмысловые технологии, такие как РНКи, миРНК, малые РНК, образующие шпильки, и/или рибозимы, которые обычно приводят к временному снижению экспрессии, а также методы редактирования генов, которые приводят к инактивации или нарушению гена-мишени, например, путем индукции разрывов и/или или гомологичной рекомбинации. Примеры включают инсерции, мутации и делеции. Нарушения обычно приводят к подавлению и/или полному отсутствию экспрессии нормального продукта или продукта «дикого типа», кодируемого геном. Примерами таких нарушений генов являются инсерции, мутации со сдвигом рамки считывания и миссенс-мутации, делеции, нокин и нокаут гена или части гена, включая делеции всего гена. Такие нарушения могут возникать в кодирующей области, например, в одном или более экзонах, что приводит к неспособности произвести полноразмерный продукт, функциональный продукт или любой продукт, например, путем инсерции стоп-кодона. Такие нарушения могут также возникать вследствие нарушений в промоторе или энхансере, или другой области, влияющих на активацию транскрипции, чтобы предотвратить транскрипцию гена. Нарушения генов включает направленное воздействие на гены, включая направленную инактивацию генов путем гомологичной рекомбинации.

[0070] «Лиганд Notch» представляет собой белок, способный связываться с полипептидом Notch-рецептора, присутствующим в мембране ряда различных клеток млекопитающих, таких как гемопоэтические стволовые клетки. Notch-рецепторы, которые были идентифицированы в клетках человека, включают Notch-1, Notch-2, Notch-3 и Notch-4. Лиганды Notch обычно имеют домен DSL (D-Delta, S-Serrate и L-Lag2), содержащий от 20 до 22 аминокислот на аминоконце и от 3 до 8 EGF-подобных повторов (Furie and Furie, 1988; Knust et al., 1987; Suzuki et al., 1987) на внеклеточной поверхности.

[0071] «Супердоноры» в настоящей заявке относятся к индивидуумам, гомозиготным по определенным генам ГКГС I и II класса. Эти гомозиготные индивидуумы могут служить в качестве супердоноров, и их клетки, включая ткани и другие материалы, содержащие их клетки, могут быть трансплантированы индивидуумам, гомозиготным либо гетерозиготным по данному гаплотипу. Супердонор может быть гомозиготным по локусу/аллелям локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP или HLA-DQ, соответственно.

[0072] В контексте настоящей заявки термин «химерные антигенные рецепторы (CAR)» может относиться, например, к искусственным Т-клеточным рецепторам, химерным Т-клеточным рецепторам или химерным иммунорецепторам, и включает сконструированные рецепторы, которые прививают искусственную специфичность конкретной иммунной эффекторной клетке. CAR могут применяться для придания специфичности моноклонального антитела Т-клетке, что позволяет генерировать большое количество специфических Т-клеток, например, для применения в адоптивной клеточной терапии. В конкретных вариантах осуществления CAR направляют специфичность клетки, например, на опухоль-ассоциированный антиген. В некоторых вариантах осуществления CAR содержат внутриклеточный домен активации, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий опухолеассоциированную антигенсвязывающую область. В частных аспектах CAR включают слияния одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), полученных из моноклональных антител, слитых с CD3-дзета трансмембранным доменом и эндодоменом. Специфичность других конструкций CAR может происходить из лигандов рецепторов (например, пептидов) или из образ-распознающих рецепторов, таких как дектины. В некоторых случаях расположение антигенраспознающего домена может быть модифицировано для уменьшения вызванной активацией гибели клеток. В отдельных случаях CAR содержат домены для дополнительной костимулирующей передачи сигналов, такие как CD3ζ, FcR, CD27, CD28, CD137, DAP10 и/или OX40. В некоторых случаях совместно с CAR могут быть экспрессированы молекулы, включая костимулирующие молекулы, репортерные гены для визуализации (например, для позитронно-эмиссионной томографии), продукты генов, которые удаляют Т-клетки при условии добавления пролекарства, хоминговые рецепторы, хемокины, рецепторы хемокинов, цитокины и рецепторы цитокинов.

[0073] Термин «антигенпрезентирующие клетки (APC)» относится к классу клеток, способных представлять один или более антигенов в форме комплекса пептид-ГКГС,

распознаваемого специфическими эффекторными клетками иммунной системы, и, таким образом, вызывать эффективный клеточный иммунный ответ против представляемого антигена или антигенов. APC могут представлять собой интактные целые клетки, такие как макрофаги, В-клетки, эндотелиальные клетки, активированные Т-клетки и дендритные клетки; или другие молекулы природного или синтетического происхождения, такие как очищенные молекулы ГКГС I класса в комплексе с β2-микроглобулином. Хотя многие типы клеток могут быть способны представлять антигены на своей клеточной поверхности для распознавания Т-клетками, только дендритные клетки обладают способностью представлять антигены в количестве, эффективном для активации наивных Т-клеток для ответов цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL).

Плюрипотентные стволовые клетки

[0074] В отдельных вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки сконструированы для экспрессии антигенного рецептора, такого как CAR. Плюрипотентные стволовые клетки могут представлять собой стволовые клетки, включая, не ограничиваясь перечисленным, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и эмбриональные стволовые клетки. В частных аспектах плюрипотентные стволовые клетки, применяемые в настоящей заявке, представляют собой человеческие эмбриональные стволовые клетки (ESC) или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), способные к длительной пролиферации in vitro, сохраняя при этом способность дифференцироваться во все типы клеток организма, включая гемопоэтические клетки-предшественники согласно настоящему изобретению.

Эмбриональные стволовые клетки

[0075] В отдельных аспектах плюрипотентные стволовые клетки представляют собой ESC. ES клетки получают из внутренней клеточной массы бластоцист, и они обладают высокой способностью к дифференцировке in vitro. ES клетки могут быть выделены путем удаления внешнего слоя трофэктодермы развивающегося эмбриона, а затем культивирования клеток внутренней массы на питающем слое нерастущих клеток. Пересеянные клетки могут продолжать пролиферировать и производить новые колонии ES клеток, которые могут быть удалены, диссоциированы, снова пересеяны и оставлены для роста. Этот процесс «субкультивирования» недифференцированных ES клеток может быть повторен несколько раз для получения линий клеток, содержащих недифференцированные ES клетки (патенты США №№ 5843780; 6200806; 7029913). ES клетки имеют потенциал к пролиферации при сохранении своей плюрипотентности. Например, ES клетки пригодны для исследований на клетках и на генах, контролирующих дифференцировку клеток. Плюрипотентность ES клеток в сочетании с генетическими манипуляциями и отбором может быть использована для генных аналитических исследований in vivo посредством получения трансгенных, химерных и нокаутированных мышей.

[0076] Способы получения мышиных ES клеток хорошо известны. В одном из способов предимплантационную бластоцисту из мышиной линии 129 обрабатывают

мышиной антисывороткой для удаления трофоэктодермы, и внутреннюю клеточную массу культивируют на питающем клеточном слое химически инактивированных мышиных эмбриональных фибробластов в среде, содержащей фетальную телячью сыворотку. Развивающиеся колонии недифференцированных ES клеток субкультивируют на питающих слоях мышиных эмбриональных фибробластов в присутствии фетальной телячьей сыворотки с получением популяций ES клеток. В некоторых способах мышиные ES клетки могут быть выращены в отсутствие питающего слоя путем добавления цитокина лейкоз-ингибирующего фактора (LIF) в культуральную среду, содержащую сыворотку. В других способах мышиные ES клетки могут быть выращены в бессывороточной среде в присутствии костного морфогенетического белка и LIF.

[0077] Человеческие ES клетки могут быть получены или происходить из эмбриона млекопитающих на стадии зиготы или бластоцисты, полученного путем слияния спермы и яйцеклетки, ядерного переноса, патогенеза или перепрограммирования хроматина и последующего включения перепрограммированного хроматина в плазматическую мембрану с получением эмбриональной клетки ранее описанными методами (Thomson and Marshall, 1998; Reubinoff et al., 2000). В одном из способов человеческие бластоцисты подвергают воздействию античеловеческой сыворотки, и клетки трофэктодермы лизируют и удаляют из внутренней клеточной массы, культивируемой на питающем слое мышиных эмбриональных фибробластов. Кроме того, скопления клеток, происходящих из внутренней клеточной массы, химически или механически диссоциируют, пересеивают, и колонии с недифференцированной морфологией отбирают микропипеткой, диссоциируют и пересеивают. В некоторых способах человеческие ES клетки могут быть выращены без сыворотки путем культивирования ES клеток на питающем слое фибробластов в присутствии основного фактора роста фибробластов. В других способах человеческие ES клетки могут быть выращены без питающего клеточного слоя путем культивирования клеток на белковой матрице, такой как MATRIGELTM или ламинин, в присутствии «кондиционированной» среды, содержащей основной фактор роста фибробластов (Xu et al., 2001).

[0078] ES клетки также могут происходить из других организмов, включая макака-резуса и мартышку, посредством ранее описанных способов (Thomson, and Marshall, 1998; Thomson et al., 1995; Thomson and Odorico, 2000; патент США № 5843780), а также из иммортализованных мышиных и человеческих линий клеток. Например, иммортализованные линии человеческих ES клеток включают MAOI, MA09, ACT-4, HI, H7, H9, H13, H14 и ACT30. В качестве дополнительного примера, иммортализованные линии мышиных ES клеток включают линию клеток CGR8, иммортализованную из внутренней клеточной массы эмбрионов мышиной линии 129, и культуры клеток CGR8 могут быть выращены в присутствии LIF без питающих слоев.

[0079] Стволовые клетки ES могут быть обнаружены с помощью белковых маркеров, включая транскрипционный фактор Oct4, щелочную фосфатазу (AP), стадиеспецифичный эмбриональный антиген SSEA-1, стадиеспецифичный

эмбриональный антиген SSEA-3, стадиеспецифичный эмбриональный антиген SSEA-4, фактор транскрипции NANOG, антиген отторжения опухолей 1-60 (TRA-1-60), антиген отторжения опухолей 1-81 (TRA-1-81), SOX2 или REX1.

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

[0080] В других аспектах плюрипотентные стволовые клетки, используемые в настоящей заявке, представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS), обычно сокращенно называемые iPS клетками или iPSC. Индукция плюрипотентности была первоначально осуществлена в 2006 году с использованием мышиных клеток (Yamanaka et al. 2006) и в 2007 году с использованием человеческих клеток (Yu et al. 2007; Takahashi et al. 2007) путем перепрограммирования соматических клеток посредством введения факторов транскрипции, связанных с плюрипотентностью. Применение iPSC позволяет обойти большинство этических и практических проблем, связанных с широкомасштабным клиническим применением ES клеток, и пациентам с аутологичными трансплантатами, полученными из iPSC, может не потребоваться пожизненное иммуносупрессивное лечение для предотвращения отторжения трансплантата.

[0081] За исключением зародышевых клеток, любая клетка может быть использована в качестве исходной точки для получения iPSC. Например, типы клеток могут представлять собой кератиноциты, фибробласты, гемопоэтические клетки, мезенхимальные клетки, клетки печени или клетки желудка. Т-клетки также могут быть использованы в качестве источника соматических клеток для перепрограммирования (патент США № 8741648). Нет ограничений по степени дифференцировки клеток или по возрасту животного, от которого получают клетки; даже недифференцированные клетки-предшественники (включая соматические стволовые клетки) и, наконец, дифференцированные зрелые клетки могут быть использованы в качестве источников соматических клеток в способах, раскрытых в настоящей заявке.

[0082] Соматические клетки могут быть перепрограммированы для получения iPSC с использованием способов, известных специалисту в данной области техники. Специалист в данной области может легко получить индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, см., например, опубликованную заявку на патент США № 20090246875, опубликованную заявку на патент США № 2010/0210014; опубликованную заявку на патент США № 20120276636; патент США № 8058065; патент США № 8129187; патент США № 8268620; публикация заявки PCT № WO 2007/069666 A1 и патент США № 8268620, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки. Как правило, для получения плюрипотентных стволовых клеток из соматической клетки используют факторы ядерного перепрограммирования. В некоторых вариантах осуществления используют по меньшей мере три или по меньшей мере четыре из Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nanog и Lin28. В других вариантах осуществления используют Oct3/4, Sox2, c-Myc и Klf4.

[0083] Последовательности мышиной и человеческой кДНК этих веществ для ядерного перепрограммирования доступны со ссылкой на идентификационные номера NCBI, упомянутые в WO 2007/069666 и патенте США № 8183038, включенных в настоящую заявку посредством ссылки. Способы введения одного или более веществ для перепрограммирования или нуклеиновых кислот, кодирующих эти вещества для перепрограммирования, известны в данной области техники и раскрыты, например, в патентах США №№ 8268620, 8691574, 8741648, 8546140, в опубликованном патенте США № 8900871 и патенте США № 8071369, оба из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

[0084] После получения iPSC могут быть культивированы в среде, достаточной для поддержания плюрипотентности. iPSC могут быть использованы с различными средами и методиками, разработанными для культивирования плюрипотентных стволовых клеток, более конкретно, эмбриональных стволовых клеток, как описано в патенте США № 7442548 и опубликованной заявке на патент США № 2003/0211603. В случае мышиных клеток культивирование осуществляют с добавлением в обычную среду фактора ингибирования лейкемии (LIF) в качестве фактора подавления дифференцировки. В случае человеческих клеток желательно добавление основного фактора роста фибробластов (bFGF) вместо LIF. Другие способы культивирования и поддержания iPSC, как известно специалисту в данной области техники, могут быть использованы с настоящими способами.

[0085] В отдельных вариантах осуществления могут быть использованы неопределенные условия; например, плюрипотентные клетки могут быть культивированы на питающих клетках фибробластов или среде, которая была подвергнута воздействию питающих клеток фибробластов, для поддержания стволовых клеток в недифференцированном состоянии. В некоторых вариантах осуществления клетку культивируют при одновременном присутствии мышиных эмбриональных фибробластов, обработанных радиационным излучением или антибиотиком для прекращения деления клеток, в качестве питающих клеток. В качестве альтернативы, плюрипотентные клетки могут быть культивированы и могут поддерживаться в практически недифференцированном состоянии с использованием независимой от фидера культуральной системы с определенным химическим составом, такой как среда TESR™ (Ludwig et al., 2006a; Ludwig et al., 2006b) или среда E8™/Essential 8™ (Chen et al., 2011).

[0086] Плазмиды были разработаны с учетом ряда целей, таких как достижение регулируемого большого числа копий и предотвращение потенциальных причин нестабильности плазмид у бактерий, и обеспечение средств для отбора плазмид, совместимых с применением в клетках млекопитающих, включая человеческие клетки. Особое внимание было уделено двойным требованиям в отношении плазмид для применения в человеческих клетках. Во-первых, они подходят для поддержания и ферментации в E. coli, так что могут быть получены и очищены большие количества ДНК. Во-вторых, они безопасны и подходят для применения у людей и животных. Первое

требование требует наличия плазмид с большим числом копий, которые можно относительно легко отбирать и стабильно поддерживать во время бактериальной ферментации. Второе требование требует внимания к таким элементам, как селектируемые маркеры и другие кодирующие последовательности. В некоторых вариантах осуществления плазмиды, кодирующие маркер, состоят из: (1) точки начала репликации с высоким числом копий, (2) селектируемого маркера, такого как, не ограничиваясь перечисленным, ген neo для отбора по чувствительности к антибиотику с помощью канамицина, (3) последовательности терминации транскрипции, включая энхансер тирозиназы, и (4) сайта мультиклонирования для включения различных кассет нуклеиновых кислот; и (5) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей маркер, функционально связанный с промотором тирозиназы. Существует множество плазмидных векторов, известных в данной области техники, подходящих для индукции нуклеиновой кислоты, кодирующей белок. Они включают, не ограничиваясь перечисленным, векторы, раскрытые в патенте США № 6103470; патенте США № 7598364; патенте США № 7989425 и патенте США № 6416998, включенных в настоящую заявку посредством ссылки.

[0087] Эписомальная система доставки генов может представлять собой плазмиду, эписомальный вектор на основе вируса Эпштейна-Барр (EBV) (патент США 8546140), вектор на основе дрожжей, вектор на основе аденовируса, эписомальный вектор на основе вируса обезьян 40 (SV40), вектор на основе вируса папилломы быков (BPV) или лентивирусный вектор. Вирусная система доставки генов может представлять собой вирусный вектор на основе РНК или ДНК.

1. Клетки для получения iPSC

[0088] Отдельные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к исходной популяции соматических клеток (например, клеток крови или клеток кожи), перепрограммированых в iPSC. Популяция клеток крови может включать мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), цельную кровь или ее фракции, содержащие смешанные популяции, клетки селезенки, клетки костного мозга, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, клетки, полученные путем лейкафереза, биоптат и лимфатические узлы, например, лимфатические узлы, дренирующие опухоль. Подходящие доноры включают иммунизированных доноров, неиммунизированных (наивных) доноров, получивших или не получивших лечение доноров. «Получивший лечение» донор представляет собой донора, подвергшегося воздействию одного или более модификаторов биологического ответа. «Не получивший лечение» донор не подвергался воздействию одного или более модификаторов биологического ответа.

[0089] В некоторых аспектах популяция клеток крови включает Т-клетки. Т-клетки могут представлять собой очищенную популяцию Т-клеток или, в качестве альтернативы, Т-клетки могут присутствовать в популяции с клетками другого типа, такими как В-клетки и/или другие клетки периферической крови. Т-клетки могут представлять собой очищенную популяцию субпопуляции Т-клеток, таких как $CD4^+$ Т-клетки, или они могут

представлять собой популяцию Т-клеток, включающую различные субпопуляции Т-клеток. В еще одном варианте осуществления Т-клетки представляют собой клоны Т-клеток, которые поддерживались в культуре в течение длительных периодов времени. Клоны Т-клеток могут быть трансформированы в разной степени. В конкретном варианте осуществления Т-клетки представляют собой клон Т-клеток, неограниченно пролиферирующий в культуре.

[0090] В некоторых аспектах Т-клетки представляют собой первичные Т-клетки. Подразумевается, что термин «первичные Т-клетки» включает Т-клетки, полученные от индивидуума, в отличие от Т-клеток, которые поддерживались в культуре в течение длительных периодов времени. Таким образом, первичные Т-клетки представляют собой, в частности, Т-клетки периферической крови, полученные от субъекта. Популяция первичных Т-клеток может состоять в основном из одной субпопуляции Т-клеток. В качестве альтернативы, популяция первичных Т-клеток может состоять из разных субпопуляций Т-клеток.

[0091] Т-клетки могут быть взяты ранее сохраненных образцов крови, от здорового индивидуума или, в качестве альтернативы, от индивидуума, страдающего от какого-либо состояния. Состояние может представлять собой инфекционное заболевание, такое как состояние, возникающее в результате вирусной инфекции, бактериальной инфекции или инфекции любым другим микроорганизмом, или гиперпролиферативное заболевание, такое как рак, например, меланома. В конкретном варианте осуществления Т-клетки происходят от индивидуума, инфицированного вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ). В еще одном варианте осуществления Т-клетки происходят от субъекта, страдающего или подверженного аутоиммунному заболеванию или Т-клеточным патологиям. Т-клетки могут быть человеческого происхождения, мышиного происхождения или происходить от любых других видов млекопитающих.

[0092] Способы получения популяций клеток, включающих Т-клетки, хорошо известны в данной области техники. Например, мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) могут быть получены в соответствии со способами, известными в данной области техники. Примеры таких способов изложены в разделе примеров и обсуждаются Kim et al. (1992); Biswas et al. (1990); Biswas et al. (1991).

[0093] В некоторых аспектах исходная популяция клеток крови включает гемопоэтические стволовые клетки (HSC). HSC обычно находятся в костном мозге, но может быть вызвано их проникновение в кровь, что представляет собой процесс, называемый мобилизацией, используемый клинически для сбора большого количества HSC из периферической крови. Одним из предпочитетльных мобилизующих агентов является гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ). CD34+ гемопоэтические стволовые клетки или предшественники, циркулирующие в периферической крови, могут быть собраны с помощью техник афереза либо в немобилизованном состоянии, либо после мобилизации после введения извне гемопоэтических факторов роста, таких как К-ГСФ. Количество стволовых клеток или

клеток-предшественников, собранных после мобилизации, больше, чем количество, полученное после афереза в немобилизованном состоянии. В некоторых аспектах источником популяции клеток является субъект, чьи клетки не были мобилизованы факторами, применяемыми извне, поскольку нет необходимости обогащать гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники.

[0094] Способы получения гемопоэтических клеток-предшественников из популяций клеток также хорошо известны в данной области техники. Гемопоэтические клетки-предшественники могут быть размножены с использованием различных цитокинов, таких как hSCF, hFLT3 и/или IL-3 (Akkina et al., 1996), или клетки $CD34^+$ могут быть обогащены с использованием MACS или FACS. Как упомянуто выше, для обогащения клеток $CD34^+$ также могут быть использованы методы отрицательного отбора.

[0095] Популяции клеток для применения в способах, описанных в настоящей заявке, могут представлять собой клетки млекопитающих, такие как человеческие клетки, клетки приматов, отличных от человека, клетки грызунов (например, мышиные или крысиные), бычьи клетки, овечьи клетки, свиные клетки, лошадиные клетки, клетки овцы, собачьи клетки и кошачьи клетки, или их смесь. Клетки приматов, отличных от человека, включают клетки макака-резуса. Клетки могут быть получены от животного, например, от человека, или они могут быть взяты из линий клеток. Если клетки получены от животного, их можно использовать как таковые, например, в качестве неразделенных клеток (то есть, смешанной популяции); они могли быть сначала иммортализованы в культуре, например, путем трансформации; или они могли быть подвергнуты предварительным методам очистки. Например, популяция клеток может быть модифицирована путем положительного или отрицательного отбора на основе экспрессии маркеров клеточной поверхности; стимулирована одним или более антигенами in vitro или in vivo; обработана одним или более модификаторами биологического ответа in vitro или in vivo; или подвергнута комбинации любого или всего из перечисленного. В иллюстративном варианте осуществления популяцию клеток подвергают отрицательному отбору для истощения клеток, не являющихся Т-клетками, и/или конкретных субпопуляций Т-клеток. Отрицательный отбор может быть проведен на основе экспрессии на клеточной поверхности различных молекул, включая маркеры В-клеток, такие как CD19 и CD20; маркер моноцитов CD14; маркер NK-клеток CD56. В качестве альтернативы, популяция клеток может быть подвергнута отрицательному отбору для истощения клеток, не являющихся $CD34^+$ гемопоэтическими клетками, и/или конкретных субпопуляций гемопоэтических клеток. Отрицательный отбор может быть проведен на основе экспрессии на клеточной поверхности различных молекул, таких как смесь антител (например, CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, CD235a и CD41 (например, для клеток линии мегакариоцитов), которые могут быть использованы для отделения других типов клеток, например, посредством MACS или колоночного разделения.

[0096] Также возможно получение образца клеток у субъекта, а затем его обогащение желаемым типом клеток. Например, МНПК и/или $CD34^+$ гемопоэтические клетки могут быть выделены из крови, как описано в настоящей заявке. Для обогащения Т-клетками из МНПК может быть использовано противоточное центрифугирование (элютриация). Клетки также могут быть выделены из других клеток с использованием различных методов, таких как выделение и/или активация антителом, связывающимся с эпитопом на клеточной поверхности желаемого типа клеток, например, в некоторых наборах для выделения Т-клеток используются гранулы с конъюгированными антителами, чтобы активировать клетки, а затем обеспечить возможность колоночного разделения с теми же гранулами. Еще один подходящий способ включает отрицательный отбор с использованием антител к маркерам клеточной поверхности для селективного обогащения определенным типом клеток без активации клетки путем взаимодействия с рецептором.

[0097] Клетки костного мозга могут быть получены из гребня подвздошной кости, бедренной кости, большеберцовой кости, позвоночника, ребра или других костномозговых полостей. Костный мозг может быть извлечен из пациента и выделен с помощью различных техник разделения и отмывки. Известная процедура выделения клеток костного мозга включает следующие стадии: a) разделение центрифугированием суспензии костного мозга на три фракции и сбор промежуточной фракции или лейкотромбоцитарного слоя; b) центрифугирование фракции лейкотромбоцитарного слоя со стадии (a) еще раз в разделительной жидкости, обычно Ficoll (торговая марка Pharmacia Fine Chemicals AB), и сбор промежуточной фракции, содержащей клетки костного мозга; и c) отмывка собранной фракции со стадии (b) для выделения подходящих для обратной трансплантации клеток костного мозга.

[0098] Если необходимо использовать популяцию клеток, обогащенную Т-клетками, такие популяции клеток могут быть получены из смешанной популяции клеток путем лейкафереза и механического афереза с использованием клеточного сепаратора с непрерывным потоком. Например, Т-клетки могут быть выделены из лейкотромбоцитарного слоя любым известным способом, включая разделение в градиенте Ficoll-Hypaque™, разделение в градиенте Перколла или элютриации.

[0099] В отдельных аспектах Т-клетки активируют агентами, которые связываются с Т-клеточными рецепторами, запуская сигнальный каскад для активации Т-клеток. Например, может быть использовано антитело к CD3. Для размножения Т-клеток до значительного количества и пролиферирующего состояния для перепрограммирования также может быть использован цитокин, такой как IL-2. В отдельном аспекте для активации Т-клеток с помощью костимуляции может быть использовано антитело как к CD3, так и к CD28. В альтернативном аспекте может применяться поперечное сшивание антитела к CD3, например, антитело к CD3, связанное с планшетом. Если для активации Т-клеток в МНПК используют растворимое антитело к CD3, оно может связываться с APC в МНПК, которые затем представляет антитело Т-клеткам. Если в популяции очищенных Т-клеток используют растворимое антитело к CD3 по отдельности, по вышеуказанным

причинам будет достигнута анергия. Отдельный вариант осуществления включает культивирование Т-клеток в присутствии антитела к CD3 (OKT3) и IL-2, что обеспечивает преимущества и является удобным, поскольку нет необходимости использовать дорогостоящие и сложные в использовании гранулы или связанное с планшетом антитело; после добавления OKT3 и IL-2 клеточное окружение МНПК способствует активации Т-клеток. Затем количество Т-клеток превышает другие типы клеток в культуре МНПК из-за избирательного размножения.

[00100] В отдельных аспектах исходная популяция клеток крови включает лимфобластоидные клетки, такие как лимфобластоидные клеточные линии (LCL). Получение LCL известно в данной области, например, оно осуществляется путем инфицирования В-клеток вирусом Эпштейна-Барр (EBV) (Frisan et al., 2001).

2. Перепрограммирование соматических клеток

[00101] В некоторых вариантах осуществления исходную популяцию клеток (например, Т-клеток) перепрограммируют в iPSC, например, способами, описанными в публикации заявки на патент США № 2014/0315304, полностью включенной в настоящую заявку посредством ссылки. В отдельных аспектах настоящего изобретения факторы перепрограммирования экспрессируются из кассет экспрессии, содержащихся в одном или более векторах, таких как интегрирующий вектор или эписомальный вектор. В дополнительном аспекте белки для перепрограммирования могут быть введены непосредственно в соматические клетки путем белковой трансдукции.

[00102] Специалист в данной области техники обладает достаточными знаниями для конструирования вектора с помощью стандартных рекомбинантных технологий (см., например, источники Sambrook et al., 2001 и Ausubel et al., 1996, оба из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки). Векторы включают, не ограничиваясь перечисленным, плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаг, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC), такие как ретровирусные векторы (например, полученные из векторов вируса мышиного лейкоза Молони (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV и т. д.), лентивирусные векторы (например, полученные из ВИЧ-1, ВИЧ-2, SIV, BIV, FIV и т. д.), аденовирусные (Ad) векторы, включая формы, компетентные к репликации, формы, дефектные по репликации, и выпотрошенные формы, аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы, векторы вируса обезьян 40 (SV-40), векторы вируса папилломы быков, векторы вируса Эпштейна-Барр, векторы вируса герпеса, векторы вируса осповакцины, векторы вируса мышиной саркомы Харви, векторы вируса опухоли молочной железы мышей, векторы вируса саркомы Рауса.

Вирусные векторы

[00103] В отдельных аспектах настоящего изобретения могут быть предложены вирусные векторы. При создании рекомбинантных вирусных векторов несущественные гены обычно заменяют геном или кодирующей последовательностью для гетерологичного (или ненативного) белка. Вирусный вектор представляет собой разновидность

конструкции экспрессии, в которой используются вирусные последовательности для введения нуклеиновой кислоты и, возможно, белков в клетку. Способность отдельных вирусов инфицировать клетки или проникать в клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, и интегрироваться в геномы клеток-хозяев и стабильно и эффективно экспрессировать вирусные гены, сделали их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных нуклеиновых кислот в клетки (например, клетки млекопитающих). Неограничивающие примеры вирусных векторов, которые могут быть использованы для доставки нуклеиновой кислоты согласно отдельным аспектам настоящего изобретения, описаны ниже.

[00104] Ретровирусы перспективны в качестве векторов для доставки генов благодаря их способности интегрировать свои гены в геном хозяина, переносить большое количество чужеродного генетического материала, инфицировать широкий спектр видов и типов клеток и быть упакованными в специальные линии клеток (Miller, 1992).

[00105] Для конструирования ретровирусного вектора нуклеиновую кислоту вставляют в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей, чтобы получить вирус, дефектный по репликации. Для получения вирионов конструируют пакующую линию клеток, содержащую гены gag, pol и env, но не содержащую LTR и пакующих компонентов (Mann et al., 1983). Когда рекомбинантная плазмида, содержащая кДНК, вместе с ретровирусными LTR и пакующими последовательностями вводится в специальную линию клеток (например, путем осаждения фосфатом кальция), пакующая последовательность позволяет упаковывать РНК-транскрипт рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем секретируются в культуральную среду (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, затем собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Ретровирусные векторы способны инфицировать широкий спектр типов клеток. Однако интеграция и стабильная экспрессия требуют деления клеток-хозяев (Paskind et al., 1975).

[00106] Лентивирусы являются сложными ретровирусами, которые помимо обычных ретровирусных генов gag, pol и env содержат другие гены с регуляторной или структурной функцией. Лентивирусные векторы хорошо известны в данной области техники (см., например, Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; патенты США №№ 6013516 и 5994136).

[00107] Рекомбинантные лентивирусные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки и могут использоваться для переноса генов как in vivo, так и ex vivo и экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. Например, рекомбинантный лентивирус, способный инфицировать неделящуюся клетку, где подходящую клетку-хозяина трансфицируют двумя или более векторами, несущими пакующие функции, а именно, gag, pol и env, а также rev и tat, описан в патенте США № 5994136, включенном в настоящую заявку посредством ссылки.

Эписомальные векторы

[00108] В отдельных аспектах настоящего изобретения также может быть предложено применение внехромосомных (то есть, эписомальных) векторов на основе плазмиды или липосомы. Такие эписомальные векторы могут включать, например, векторы на основе oriP и/или векторы, кодирующие производное EBNA-1. Эти векторы могут позволить введение в клетку и поддержание вне хромосом больших фрагментов ДНК, репликацию один раз за клеточный цикл, эффективное деление на дочерние клетки, и практически не вызывают иммунного ответа.

[00109] В частности, EBNA-1, единственный вирусный белок, необходимый для репликации вектора экспрессии на основе oriP, не вызывает клеточного иммунного ответа, поскольку он выработал эффективный механизм, позволяющий обойти процессинг, необходимый для представления его антигенов на молекулах ГКГС I класса (Levitskaya et al., 1997). Кроме того, EBNA-1 может оказывать *транс*-действие для усиления экспрессии клонированного гена, индуцируя повышение экспрессии клонированного гена вплоть до 100 раз в некоторых линиях клеток (Langle-Rouault et al., 1998; Evans et al., 1997). Наконец, изготовление таких векторов экспрессии на основе oriP является недорогим.

[00110] Другие внехромосомные векторы включают другие векторы, основанные на лимфотропном вирусе герпеса. Лимфотропный вирус герпеса представляет собой вирус герпеса, который реплицируется в лимфобласте (например, человеческом B-лимфобласте) и становится плазмидой на протяжении части своего естественного жизненного цикла. Вирус простого герпеса (HSV) не является «лимфотропным» вирусом герпеса. Примеры лимфотропных вирусов герпеса включают, не ограничиваясь перечисленным, EBV, вирус саркомы Капоши (KSHV); вирус герпеса обезьян саймири (HS) и вирус болезни Марека (MDV). Также рассматриваются другие источники векторов на основе эписом, такие как ARS (автономно реплицирующаяся последовательность) дрожжей, аденовирус, SV40 или BPV.

[00111] Специалист в данной области техники обладает достаточными знаниями для конструирования вектора с помощью стандартных рекомбинантных технологий (см., например, источники Maniatis et al., 1988 и Ausubel et al., 1994, оба из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки).

[00112] Векторы также могут содержать другие компоненты или функциональные свойства, которые дополнительно модулируют доставку генов и/или экспрессию генов, или которые иным образом обеспечивают полезные свойства для клеток-мишеней. Такие другие компоненты включают, например, компоненты, влияющие на связывание или нацеливание на клетки (включая компоненты, опосредующие связывание, специфическое к типу клеток или ткани); компоненты, влияющие на поглощение нуклеиновой кислоты вектора клеткой; компоненты, влияющие на локализацию полинуклеотида в клетке после поглощения (такие как агенты, опосредующие ядерную локализацию); и компоненты, влияющие на экспрессию полинуклеотида.

[00113] Такие компоненты также могут включать маркеры, такие как детектируемые и/или селектируемые маркеры, которые можно использовать для обнаружения или отбора клеток, захвативших и экспрессирующих нуклеиновую кислоту, доставляемую вектором. Такие компоненты могут быть предоставлены как естественная особенность вектора (например, при использовании определенных вирусных векторов, имеющих компоненты или функциональные свойства, обеспечивающие связывание и поглощение), или векторы могут быть модифицированы для обеспечения таких функциональных свойств. В данной области известно и обычно доступно большое количество таких векторов. Когда вектор поддерживается в клетке-хозяине, он может стабильно реплицироваться клетками во время митоза в виде автономной структуры, быть включен в геном клетки-хозяина, либо поддерживаться в ядре или цитоплазме клетки-хозяина.

Система на основе транспозонов

[00114] В отдельных аспектах для доставки факторов программирования может быть использована система транспозон-транспозаза. Например, система транспозон-транспозаза может представлять собой хорошо известную Sleeping Beauty, систему транспозон-транспозаза Frog Prince (описание последней см., например, в EP1507865) или TTAA-специфическую систему транспозона PiggyBac.

[00115] Транспозоны представляют собой последовательности ДНК, которые могут перемещаться в разные положения в геноме отдельной клетки; этот процесс называется транспозицией. В процессе они могут вызывать мутации и изменять количество ДНК в геноме. Транспозоны также были известны как «прыгающие гены», и они являются примерами мобильных генетических элементов.

[00116] Существует множество мобильных генетических элементов, и они могут быть классифицированы зависимости от механизма их транспозиции. Мобильные генетические элементы I класса, или ретротранспозоны, копируют себя, сначала транскрибируясь в РНК, затем транскрибируясь обратно в ДНК с помощью обратной транскриптазы, а затем вставляясь в другое положение в геноме. Мобильные генетические элементы II класса перемещаются непосредственно из одного положения в другое, используя транспозазу для «вырезания и вставки» себя в геном.

[00117] В частных вариантах осуществления в конструкциях (например, многолинейной конструкции), предложенных в настоящем изобретении, используется система экспрессии PiggyBac. ДНК-транспозоны PiggyBac (PB) мобилизуются по механизму «вырезания и вставки», посредством которого фермент транспозаза (PB транспозаза), кодируемый самим транспозоном, вырезает и реинтегрирует транспозон в другие сайты в геноме. PB транспозаза специфически распознает инвертированные терминальные повторы (ITR) PB, фланкирующие транспозон; она связывается с этими последовательностями и катализирует вырезание транспозона. Затем PB относительно случайным образом интегрируется в сайты TTAA по всему геному. Для создания мутаций с генной ловушкой (или адаптированных для получения трансгенных животных)

транспозазу доставляют в транс-положении на одной плазмиде и трансфицируют совместно с плазмидой, содержащей донорный транспозон, рекомбинантный транспозон, содержащий генную ловушку, фланкированную сайтами связывания для транспозазы (ITR). Транспозаза будет катализировать вырезание транспозона из плазмиды и его последующую интеграцию в геном. Интеграция в кодирующей области будет захватывать элементы, необходимые для экспрессии генной ловушки. PB обладает несколькими идеальными свойствами: (1) он избирательно вставляется в гены (от 50 до 67% инсерций затрагивают гены) (2) он не проявляет локального скачкообразного изменения (широкий охват генома) (3) он не чувствителен к ингибированию сверхпродукции, при которой повышенные уровни транспозазы вызывают снижение транспозиции 4) он аккуратно вырезается из донорского сайта, не оставляя «следа», в отличие от Sleeping Beauty.

Регуляторные элементы

[00118] Кассеты экспрессии, включенные в векторы перепрограммирования, используемые в настоящем изобретении, предпочтительно содержат (в направлении 5'-3') эукариотический транскрипционный промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей белок, сигналы сплайсинга, включая интроны, и последовательность терминации транскрипции/полиаденилирования.

(i) Промотор/энхансеры

[00119] Предложенные в настоящей заявке конструкции экспрессии содержат промотор для управления экспрессией генов программирования. Промотор обычно содержит последовательность, выполняющую функцию расположения сайта, инициирующего синтез РНК. Его наиболее известным примером является ТАТА-бокс, но у некоторых промоторов, у которых отсутствует ТАТА-бокс, например, промотора для гена терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы млекопитающих и промотора для поздних генов SV40, закрепить место инициации помогает дискретный элемент, перекрывающий сайт инициации. Дополнительные промоторные элементы регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области 30-110 п.н. в 3'-5'-направлении от сайта инициации, хотя было показано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы и в 5'-3'-направлении от сайта инициации. Чтобы привести кодирующую последовательность «под контроль» промотора, 5'-конец сайта инициации транскрипции транскрипционной рамки считывания располагают в 5'-3'-направлении (т. е. 3'-) выбранного промотора. Расположенный в 3'-5'-направлении промотор стимулирует транскрипцию ДНК и способствует экспрессии кодируемой РНК.

[00120] Интервал между элементами промотора часто является гибким, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертированы или перемещены друг относительно друга. В промоторе tk расстояние между промоторными элементами может быть увеличено до 50 п. н., прежде чем активность начнет снижаться. По-видимому, в зависимости от промотора отдельные элементы могут функционировать совместно или независимо для активации транскрипции. Промотор может быть или может не быть использован вместе с «энхансером», который относится к цис-действующей регуляторной

последовательности, участвующей в транскрипционной активации последовательности нуклеиновой кислоты.

[00121] Промотор может представлять собой промотор, естественным образом ассоциированный с последовательностью нуклеиновой кислоты, что может быть достигнуто путем выделения 5'-некодирующих последовательностей, расположенных в 3'-5'-направлении от кодирующего сегмента и/или экзона. Такой промотор можно назвать «эндогенным». Аналогичным образом, энхансер может представлять собой энхансер, естественным образом ассоциированный с последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенной в 5'-3'- или 3'-5'-направлении от этой последовательности. В качестве альтернативы, определенные преимущества будут получены при помещении сегмента кодирующей нуклеиновой кислоты под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который обычно не ассоциирован с последовательностью нуклеиновой кислоты в его естественной среде. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, обычно не ассоциированному с последовательностью нуклеиновой кислоты в его естественной среде. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов, а также промоторы или энхансеры, выделенные из любого другого вируса, или прокариотической или эукариотической клетки, и промоторы или энхансеры, не встречающиеся в природе, то есть содержащие разные элементы разных областей регуляции транскрипции, и/или мутации, изменяющие экспрессию. Например, промоторы, чаще всего используемые в конструкциях рекомбинантных ДНК, включают промоторные системы β-лактамазы (пенициллиназы), лактозы и триптофана (trp). Помимо синтетического пути получения последовательностей нуклеиновых кислот промоторов и энхансеров, последовательности могут быть получены с использованием технологии рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая PCR™, в связи с композициями, раскрытыми в настоящей заявке (см. патенты США №№ 4683202 и 5928906, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки). Кроме того, предполагается, что также могут быть использованы последовательности контроля, управляющие транскрипцией и/или экспрессией последовательностей внутри органелл, не имеющих ядер, таких как митохондрии, хлоропласты и тому подобное.

[00122] Естественно, важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно управляет экспрессией сегмента ДНК в органелле, типе клетки, ткани, органе или организме, выбранных для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии обычно известны используемые комбинации промоторов, энхансеров и типов клеток для экспрессии белка (см., например, источник Sambrook et al. 1989, включенный в настоящую заявку посредством ссылки). Используемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифическими, индуцибельными и/или подходящими в соответствующих условиях для направления высокого уровня экспрессии введенного сегмента ДНК, что является преимуществом в крупномасштабном производстве

рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть гетерологичным или эндогенным.

[00123] Кроме того, для управления экспрессией также может быть использована любая комбинация промотора/энхансера (например, согласно базе данных эукариотических промоторов EPDB). Еще один возможный вариант осуществления относится к применению системы цитоплазматической экспрессии T3, T7 или SP6. Эукариотические клетки могут поддерживать цитоплазматическую транскрипцию отдельных бактериальных промоторов, если обеспечивается соответствующая бактериальная полимераза, либо в составе комплекса доставки, либо в качестве дополнительной генетической конструкции экспрессии.

[00124] Неограничивающие примеры промоторов включают ранние или поздние вирусные промоторы, такие как ранние или поздние промоторы SV40, немедленные ранние промоторы цитомегаловируса (CMV), ранние промоторы вируса саркомы Рауса (RSV); промоторы эукариотических клеток, такие как, например, промотор бета-актина (Ng, 1989; Quitsche et al., 1989), промотор GADPH (Alexander et al., 1988, Ercolani et al., 1988), промотор металлотионеина (Karin et al., 1989; Richards et al., 1984); и промоторы конкатенированных элементов ответа, такие как промоторы элемента ответа циклического АМФ (cre), промотор сывороточного элемента ответа (sre), промотор сложного эфира форбола (TPA) и промоторы элемента ответа (tre) вблизи минимального TATA-бокса. Также возможно применение последовательностей промотора человеческого гормона роста (например, минимальный промотор человеческого гормона роста, описанный в Genbank, идентификационный номер X05244, нуклеотид 283-341) или промотор опухоли молочной железы мышей (доступен от ATCC, номер по каталогу ATCC 45007).

[00125] Тканеспецифическая экспрессия трансгенов может быть желательной в качестве способа идентификации полученных гемопоэтических клеток и предшественников, особенно для экспрессии репортерного гена в гемопоэтических клетках и предшественниках гемопоэтических клеток, полученных в результате программирования. Чтобы повысить как специфичность, так и активность, предусмотрено применение цис-действующих регуляторных элементов. Например, может быть использован специфичный для гемопоэтических клеток промотор. Многие такие специфичные для гемопоэтических клеток промоторы известны в данной области техники, например, промоторы гемопоэтических генов, представленные в таблице 1.

[00126] В отдельных аспектах способы согласно настоящему изобретению также касаются энхансерных последовательностей, то есть, последовательностей нуклеиновых кислот, повышающих активность промотора и способных к цис-активности, и независимо от их ориентации, даже на относительно больших расстояниях (до нескольких килобаз) от целевого промотора). Однако функция энхансера не обязательно ограничена такими большими расстояниями, поскольку они также могут функционировать в непосредственной близости от данного промотора.

[00127] Были установлены многие последовательности промоторов и энхансеров гемопоэтических клеток, которые могут быть пригодны для использования в настоящих способах. См., например, патент США № 5556954; заявку на патент США № 20020055144; заявку на патент США 20090148425.

(ii) Сигналы инициации и связанная экспрессия

[00128] Конкретный сигнал инициации также может быть использован в конструкциях экспрессии, предложенных в настоящем изобретении, для эффективной трансляции кодирующих последовательностей. Эти сигналы включают инициирующий кодон ATG или смежные последовательности. Может потребоваться предоставление экзогенных сигналов контроля трансляции, включая инициирующий кодон ATG. Специалист в данной области техники легко сможет это определить и предоставить необходимые сигналы. Хорошо известно, что инициирующий кодон должен быть синхронизирован с рамкой считывания желаемой кодирующей последовательности для обеспечения трансляции всей вставленной последовательности. Экзогенные сигналы контроля трансляции и инициирующие кодоны могут быть природными или синтетическими. Эффективность экспрессии может быть повышена путем включения подходящих элементов усиления транскрипции.

[00129] В отдельных вариантах осуществления для создания мультигенных или полицистронных мРНК используют элементы участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Элементы IRES способны обойти модель сканирования рибосом зависимой от 5'-концевого метилированного кэпа трансляции и начать трансляцию на внутренних сайтах (Pelletier and Sonenberg, 1988). Были описаны элементы IRES из двух членов семейства пикорнавирусов (полиомиелита и энцефаломиокардита) (Pelletier and Sonenberg, 1988), а также IRES из мРНК млекопитающих (Macejak and Sarnow, 1991). Элементы IRES могут быть связаны с гетерологичными открытыми рамками считывания. Несколько открытых рамок считывания могут быть транскрибированы вместе, при этом каждая из них отделена IRES, создавая полицистронные мРНК. Благодаря элементу IRES каждая открытая рамка считывания доступна рибосомам для осуществления эффективной трансляции. Множество генов могут быть эффективно экспрессированы с использованием одного промотора/энхансера для транскрибирования одной мРНК (см. патенты США № 5925565 и 5935819, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки).

[00130] Кроме того, некоторые элементы последовательности 2A могут быть использованы для создания связанной или совместной экспрессии генов программирования в конструкциях, предложенных в настоящем изобретении. Например, последовательности расщепления могут быть использованы для совместной экспрессии генов путем связывания открытых рамок считывания с образованием единого цистрона. Примером последовательности расщепления является последовательность F2A (вирус ящура 2A) или последовательность, «подобная 2A» (например, вирус Thosea asigna 2A;

T2A). В частных вариантах осуществления пептид расщепления F2A используют для связывания экспрессии генов в многолинейной конструкции.

Точки начала репликации

[00131] Для размножения вектора в клетке-хозяине он может содержать одну или более точек начала репликации (часто называемых «ori»), например, последовательность нуклеиновой кислоты, соответствующую oriP EBV, как описано выше, или генетически сконструированную oriP с аналогичной или повышенной функцией программирования, которая представляет собой специфическую последовательность нуклеиновой кислоты, при которой начинается репликация. В качестве альтернативы, может быть использована точка начала репликации другого внехромосомно реплицирующегося вируса, как описано выше, или автономно реплицирующаяся последовательность (ARS).

Селектируемые маркеры и маркеры для скрининга

[00132] В отдельных вариантах осуществления клетки, содержащие конструкцию нуклеиновой кислоты, могут быть идентифицированы in vitro или in vivo путем включения маркера в вектор экспрессии. Такие маркеры придают идентифицируемое изменение клетке, позволяя легко идентифицировать клетки, содержащие вектор экспрессии. Как правило, селектируемый маркер является маркером, придающим свойство, позволяющее проводить отбор. Маркер положительного отбора представляет собой маркер, наличие которого позволяет проводить отбор, а маркер отрицательного отбора представляет собой маркер, наличие которого препятствует отбору. Примером маркера положительного отбора является маркер лекарственной устойчивости.

[00133] Обычно включение селектируемого маркера для отбора по чувствительности к лекарственному средству помогает в клонировании и идентификации трансформантов, например, полезными селектируемыми маркерами являются гены, придающие устойчивость к неомицину, пуромицину, гигромицину, DHFR, GPT, зеоцину и гистидинолу. Помимо маркеров, придающих фенотип, позволяющий различать трансформанты на основе реализации определенных условий, также рассматриваются другие типы маркеров, включая маркеры для скрининга, такие как GFP (зеленый флуоресцентный белок), основой для которых является колориметрический анализ. В качестве альтернативы, в качестве маркеров отрицательного отбора могут быть использованы ферменты для скрининга, такие как тимидинкиназа вируса простого герпеса (tk) или хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Специалисту в данной области техники также известно, как использовать иммунологические маркеры, возможно, в сочетании с анализом FACS. Считается, что маркер не является важным при условии, что он способен экспрессироваться с нуклеиновой кислотой, кодирующей продукт гена. Дополнительные примеры селектируемых маркеров и маркеров для скрининга хорошо известны специалисту в данной области техники.

[00134] Для введения нуклеиновой кислоты, такой как ДНК или РНК, в плюрипотентные стволовые клетки, подлежащие программированию в гемопоэтические клетки-предшественники согласно настоящему изобретению, могут быть использованы

любые подходящие способы доставки нуклеиновой кислоты для трансформации клетки, как описано в настоящей заявке или как известно специалисту в данной области техники. Такие способы включают, не ограничиваясь перечисленным, прямую доставку ДНК, например, путем трансфекции ex vivo (Wilson et al., 1989, Nabel et al, 1989), путем инъекции (патенты США №№ 5994624, 5981274, 5945100, 5780448, 5736524, 5702932, 5656610, 5589466 и 5580859, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки), включая микроинъекцию (Harland and Weintraub, 1985; патент США № 5789215, включенный в настоящую заявку посредством ссылки); путем электропорации (патент США № 5384253, включенный в настоящую заявку посредством ссылки;Tur-Kaspa et al., 1986; Potter et al., 1984); путем осаждения фосфата кальция (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); с использованием ДЭАЭ-декстрана, а затем полиэтиленгликоля (Gopal, 1985); путем прямой звуковой нагрузки (Fechheimer et al., 1987); путем опосредованной липосомами трансфекции (Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991) и рецептор-опосредованную трансфекцию (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988); путем бомбардировки микрочастицами (заявка PCT № WO 94/09699 и 95/06128; патенты США №№ 5610042; 5322783 5563055, 5550318, 5538877 и 5538880, включенные в настоящую заявку посредством ссылки); путем перемешивания с волокнами карбида кремния (Kaeppler et al., 1990; патенты США №№ 5302523 и 5464765, включенные в настоящую заявку посредством ссылки); путем Agrobacterium-опосредованной трансформации (патенты США №№ 5591616 и 5563055, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки); путем поглощения ДНК, опосредованного высушиванием/ингибированием (Potrykus et al., 1985), и любую комбинацию таких способов. Благодаря применению подобных технологий, органелла(ы), клетка(и), ткань(и) или организм(ы) могут быть стабильно или временно трансформированы.

Подбор гаплотипа ГКГС

[00135] Главный комплекс гистосовместимости (ГКГС) является основной причиной отторжения иммунной системой аллогенных трансплантатов органов. Существует три основных гаплотипа ГКГС I класса (A, B и C) и три основных гаплотипа ГКГС II класса (DR, DP и DQ). Локусы HLA являются высоко полиморфными и распределены по 4 Мб на 6-й хромосоме. Способность гаплотипировать гены HLA в этой области является клинически важной, поскольку эта область связана с аутоиммунными и инфекционными заболеваниями, а совместимость гаплотипов HLA донора и реципиента может влиять на клинические результаты трансплантации. HLA, соответствующие ГКГС I класса, представляют пептиды изнутри клетки, а HLA, соответствующие URUC II класса, представляют антигены снаружи клетки Т-лимфоцитам. Несовместимость гаплотипов ГКГС трансплантата и хозяина вызывает иммунный ответ против трансплантата и приводит к его отторжению. Таким образом, пациент может получать лечение

иммунодепрессантом для предотвращения отторжения. Линии стволовых клеток, подобранные по HLA, могут позволить преодолеть риск отторжения иммунной системой.

[00136] Из-за важности HLA в трансплантации локусы HLA обычно типируют с помощью серологии и ПЦР для выявления благоприятных пар донор-реципиент. Серологическое обнаружение антигенов HLA I и II класса может быть выполнено с помощью теста на лимфоцитотоксичность, опосредованную комплементом, с очищенными Т- или В-лимфоцитами. Эта процедура преимущественно используется для подбора локусов HLA-A и -B. Молекулярное типирование тканей часто может быть более точным, чем серологическое тестирование. Молекулярные методы с низким разрешением, такие как методы и использованием SSOP (сиквенс-специфических олигонуклеотидных зондов), в которых продукты ПЦР тестируются против серии олигонуклеотидных зондов, могут быть использованы для идентификации антигенов HLA, и в настоящее время эти методы являются наиболее распространенными методами, используемыми для типирования HLA II класса. Методы с высоким разрешением, такие как методы с использованием SSP (сиквенс-специфическиого праймера), где используются аллель-специфические праймеры для амплификации ПЦР, позволяют идентифицировать специфические аллели ГКГС.

[00137] Совместимость ГКГС донора и реципиента значительно возрастает, если донорские клетки являются HLA-гомозиготными, то есть содержат идентичные аллели для каждого антигенпрезентирующего белка. Большинство индивидуумов являются гетерозиготными по генам ГКГС I и II класса, но некоторые индивидуумы гомозиготны по этим генам. Эти гомозиготные индивидуумы могут служить в качестве супердоноров, и трансплантаты, полученные из их клеток, могут быть трансплантированы всем индивидуумам, гомозиготным либо гетерозиготным по данному гаплотипу. Кроме того, если гомозиготные донорские клетки имеют гаплотип, часто встречающийся в популяции, эти клетки могут найти применение в трансплантационной терапии для большого числа индивидуумов.

[00138] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления PSC, используемые в настоящих способах, могут быть получены из соматических клеток субъекта, подлежащего лечению, или другого субъекта с таким же или по существу таким же типом HLA, что и у пациента. В одном случае основные HLA (например, три основных локуса HLA-A, HLA-B и HLA-DR) донора идентичны основным HLA реципиента. В некоторых случаях донор соматических клеток может представлять собой супердонора; таким образом, PSC, полученные от гомозиготного супердонора МНС, могут быть использованы для получения HPC, а затем иммунных клеток, таких как Т-клетки. Таким образом, иммунные эффекторные клетки, полученные от супердонора, могут быть трансплантированы субъектам, гомозиготным либо гетерозиготным по данному гаплотипу. Например, иммунные клетки могут быть гомозиготными по двум аллелям HLA, таким как HLA-A и HLA-B. Как таковые, иммунные клетки, полученные от супердоноров, могут быть использованы в способах, раскрытых в настоящей заявке, для

получения иммунных клеток, которые потенциально могут «соответствовать» большому числу потенциальных реципиентов.

Генетически сконструированные антигенные рецепторы

[00139] PSC могут быть генетически сконструированы для экспрессии антигенных рецепторов, таких как сконструированные TCR или CAR. Например, PSC (например, аутологичные или аллогенные) модифицируют для экспрессии TCR или CAR, обладающих антигенной специфичностью в отношении ракового антигена.

[00140] Подходящие способы модификации известны в данной области техники. См. например, источник Sambrook and Ausubel, упомянутый выше. Например, клетки могут быть трансдуцированы для экспрессии TCR, обладающего антигенной специфичностью в отношении ракового антигена, с использованием методов трансдукции, описанных в источниках Heemskerk et al. Hum Gene Ther. 19:496-510 (2008) и Johnson et al. Blood 114:535-46 (2009).

[00141] Электропорация РНК, кодирующей полноразмерные α- и β- (или γ- и δ-) цепи TCR, может быть использована в качестве альтернативы для преодоления долгосрочных проблем, связанных с аутореактивностью, вызванных спариванием трансдуцированных с помощью ретровируса и эндогенных цепей TCR. Даже если такое альтернативное спаривание имеет место в стратегии временной трансфекции, аутореактивные Т-клетки, которые, возможно, могут быть получены таким путем, через некоторое время утратят эту аутореактивность, поскольку введенные α- и β-цепи TCR экспрессируются только временно. Когда экспрессия введенной α- и β-цепи TCR уменьшается, остаются только нормальные аутологичные Т-клетки. Тогда как в случае, когда полноразмерные цепи TCR вводят путем стабильной трансдукции с помощью ретровирусов, введенные цепи TCR никогда не исчезнут, вызывая постоянную аутореактивность у пациента.

[00142] В некоторых вариантах осуществления клетки содержат одну или более нуклеиновых кислот, введенных посредством генной инженерии, которые кодируют один или более антигенных рецепторов, и генетически сконструированные продукты таких нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты являются гетерологичными, то есть, обычно не присутствующими в клетке или образце, полученном из клетки, например, они получены из другого организма или клетки, которая, например, обычно не присутствует в конструируемой клетке и/или или организме, из которого получена такая клетка. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты не встречаются в природе, например, нуклеиновая кислота, не встречающаяся в природе (например, химерная).

[00143] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенраспознающий домен, который специфически связывается с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой белок, экспрессируемый на поверхности клеток. В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой TCR-подобный CAR, а антиген представляет собой процессированный пептидный

антиген, такой как пептидный антиген внутриклеточного белка, который, подобно TCR, распознается на поверхности клетки в контексте молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС).

[00144] Примеры антигенных рецепторов, включая CAR и рекомбинантные TCR, а также способы конструирования и введения рецепторов в клетки включают описанные, например, в публикациях международных патентных заявок №№ WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, публикации заявок на патент США №№ US2002131960, US2013287748, US20130149337, патенты США №№ 6451995, 7446190, 8252592, 8339645, 8398282, 7446179, 6410319, 7070995, 7265209, 7354762, 7446191, 8324353 и 8479118, и европейская патентная заявка № EP2537416, и/или описанные в источниках Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75. В некоторых аспектах генетически сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, как описано в патенте США № 7446190, и описанные в публикации международной патентной заявки № WO/2014055668 Al.

1. Химерные антигенные рецепторы

[00145] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит: a) внутриклеточный сигнальный домен, b) трансмембранный домен и c) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающую область.

[00146] В некоторых вариантах осуществления сконструированные антигенные рецепторы включают CAR, включая активирующие или стимулирующие CAR, костимулирующие CAR (см. WO2014/055668) и/или ингибирующие CAR (iCAR, см. Fedorov et al., 2013). CAR обычно включают внеклеточный антиген- (или лиганд-) связывающий домен, связанный с одним или более внутриклеточными сигнальными компонентами, в некоторых аспектах посредством линкеров и/или трансмембранного(ых) домена(ов). Такие молекулы обычно имитируют или практически имитируют сигнал через природный антигенный рецептор, сигнал через такой рецептор в комбинации с костимулирующим рецептором, и/или сигнал только через костимулирующий рецептор.

[00147] Отдельные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к применению нуклеиновых кислот, включая нуклеиновые кислоты, кодирующие антигенспецифический полипептид CAR, включая CAR, который был гуманизирован для снижения иммуногенности (hCAR), содержащий внутриклеточный сигнальный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий один или более сигнальных мотивов. В отдельных вариантах осуществления CAR может распознавать эпитоп, содержащий область, общую для одного или более антигенов. В отдельных вариантах осуществления область связывания может содержать определяющие комплементарность области моноклонального антитела, вариабельные области моноклонального антитела и/или его антигенсвязывающие фрагменты. В еще одном варианте осуществления эта

специфичность происходит от пептида (например, цитокина), связывающегося с рецептором.

[00148] Предполагается, что нуклеиновые кислоты человеческого CAR могут представлять собой человеческие гены, используемые для усиления клеточной иммунотерапии у людей. В конкретном варианте осуществления изобретение включает полноразмерную кДНК CAR или кодирующую область. Антигенсвязывающие области или домен могут содержать фрагмент области V_H и V_L цепей одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), полученного из конкретного человеческого моноклонального антитела, такого как описанные в патенте США 7109304, включенном в настоящую заявку посредством ссылки. Фрагмент также может представлять собой любое количество различных антигенсвязывающих доменов человеческого антигенспецифического антитела. В более конкретном варианте осуществления фрагмент представляет собой антигенспецифический scFv, кодируемый последовательностью, оптимизированной для использования человеческого кодона для экспрессии в человеческих клетках.

[00149] Конфигурация может быть мультимерной, такой как диатело или мультимеры. Скорее всего, мультимеры образуются путем перекрестного спаривания вариабельной части легкой и тяжелой цепей в диатело. Шарнирная часть конструкции может иметь несколько альтернатив, от будучи полностью удаленной до сохраняющей первый цистеин, до замещения пролина, а не серина, до усечения вплоть до первого цистеина. Fc-часть может быть удалена. Для этой цели может служить любой белок, который является стабильным и/или димеризуется. Можно использовать только один из Fc-доменов, например, домен CH2 или CH3 из человеческого иммуноглобулина. Можно также использовать шарнир, область CH2 и CH3 человеческого иммуноглобулина, модифицированную для улучшения димеризации. Можно также использовать только шарнирную часть иммуноглобулина. Можно также использовать части CD8-альфа.

[00150] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота CAR содержит последовательность, кодирующую другие костимулирующие рецепторы, такую как трансмембранный домен и модифицированный внутриклеточный сигнальный домен CD28. Другие костимулирующие рецепторы включают, не ограничиваясь перечисленным, один или более из CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10 и 4-1BB (CD137). Помимо первичного сигнала, инициируемого CD3ζ, дополнительный сигнал, обеспечиваемый человеческим костимулирующим рецептором, вставленным в человеческий CAR, важен для полной активации NK-клеток и может помочь улучшить устойчивость in vivo и терапевтический успех адоптивной иммунотерапии.

[00151] В некоторых вариантах осуществления CAR конструируют со специфичностью к конкретному антигену (или маркеру или лиганду), такому как антиген, экспрессируемый в конкретном типе клеток, на который должна быть нацелена адоптивная терапия, например, маркеру рака, и/или антигену, предназначенному для индукции смягчающего ответа, такому как антиген, экспрессируемый на клетках

нормального или незлокачественного типа. Таким образом, CAR в своей внеклеточной части обычно содержит одну или более антигенсвязывающих молекул, таких как один или более антигенсвязывающих фрагментов, доменов или частей, или один или более вариабельных доменов антител и/или молекул антител. В некоторых вариантах осуществления CAR включает антигенсвязывающую часть или части молекулы антитела, такие как одноцепочечный фрагмент антитела (scFv), полученный из вариабельной области тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей моноклонального антитела (mAb).

[00152] В отдельных вариантах осуществления химерного антигенного рецептора антигенспецифическая часть рецептора (которая может называться внеклеточным доменом, содержащим антигенсвязывающую область) содержит опухолеассоциированный антиген или патогенспецифический антигенсвязывающий домен. Антигены включают углеводные антигены, распознаваемые образ-распознающими рецепторами, такими как дектин-1. Опухолеассоциированный антиген может быть любого вида при условии, что он экспрессируется на клеточной поверхности опухолевых клеток. Примеры вариантов осуществления опухолеассоциированных антигенов включают CD19, CD20, карциноэмбриональный антиген, альфа-фетопротеин, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, эпителиальный опухолевый антиген, меланома-ассоциированный антиген, мутированный p53, мутированный ras и так далее.

[00153] Последовательность открытой рамки считывания, кодирующей химерный рецептор, может быть получена из источника геномной ДНК, источника кДНК или может быть синтезирована (например, посредством ПЦР), или получена с помощью их комбинаций. В зависимости от размера геномной ДНК и количества интронов может быть желательно использовать кДНК или их комбинацию, поскольку обнаружено, что интроны стабилизируют мРНК. Кроме того, может быть также выгодно использовать эндогенные или экзогенные некодирующие области для стабилизации мРНК.

[00154] Предполагается, что химерная конструкция может быть введена в иммунные клетки в виде голой ДНК или в подходящем векторе. Способы стабильной трансфекции клеток путем электропорации с использованием голой ДНК известны в данной области техники. См., например, патент США № 6410319. Голая ДНК в общем относится к ДНК, кодирующей химерный рецептор, содержащийся в плазмидном экспрессирующем векторе в правильной ориентации для экспрессии.

[00155] В качестве альтернативы для введения химерной конструкции в иммунные клетки может быть использован вирусный вектор (например, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор или лентивирусный вектор). Подходящие векторы для применения в соответствии со способом согласно настоящему изобретению не реплицируются в иммунных клетках. Известно большое количество векторов на основе вирусов, где число копий вируса, сохраняемого в клетке, является достаточно низким для поддержания жизнеспособности клетки, таких как, например, векторы на основе ВИЧ, SV40, EBV, HSV или BPV.

[00156] В некоторых аспектах компонент, отвечающий за антигенспецифическое связывание или распознавание, связан с одним или более трансмембранными и внутриклеточными сигнальными доменами. В некоторых вариантах осуществления CAR включает трансмембранный домен, слитый с внеклеточным доменом CAR. В одном из вариантов осуществления используют трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из доменов в CAR. В некоторых случаях трансмембранный домен выбран или модифицирован путем замены аминокислот так, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами этого же или других поверхностных мембранных белков, чтобы минимизировать взаимодействия с другими членами рецепторного комплекса.

[00157] Трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления получен либо из природного, либо из синтетического источника. Если источник является природным, домен в некоторых аспектах получен от любого мембраносвязанного или трансмембранного белка. Трансмембранные области включают полученные из (то есть включают по меньшей мере трансмембранную область (области)) альфа-, бета- или дзета-цепи Т-клеточного рецептора, молекул CD28, CD3 дзета, CD3 эпсилон, CD3 гамма, CD3-дельта, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D и DAP. В качестве альтернативы трансмембранный домен в некоторых вариантах осуществления является синтетическим. В некоторых аспектах синтетический трансмембранный домен содержит преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин. В некоторых аспектах на каждом конце синтетического трансмембранного домена находится триплет фенилаланина, триптофана и валина.

[00158] В отдельных вариантах осуществления платформенные технологии, раскрытые в настоящей заявке для генетической модификации иммунных клеток, таких как NK-клетки, включают (i) невирусный перенос гена с использованием устройства для электропорации (например, нуклеофектора), (ii) CAR, передающие сигналы через эндодомены (например, CD28/CD3-ζ, CD137/CD3-ζ или другие комбинации), (iii) CAR с различной длиной внеклеточных доменов, соединяющих антигенраспознающий домен с поверхностью клетки, и, в некоторых случаях, (iv) искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPC), полученные из K562, чтобы иметь возможность надежно и в количественном отношении размножать CAR^+ иммунные клетки (Singh et al., 2008; Singh et al., 2011).

2. Т-клеточный рецептор (TCR)

[00159] **В** некоторых вариантах осуществления генетически сконструированные антигенные рецепторы включают рекомбинантные TCR и/или TCR, клонированные из природных Т-клеток. «Т-клеточный рецептор» или «TCR» относится к молекуле, содержащей вариабельные области а- и β-цепи (также известные как TCRα и TCRβ, соответственно) или вариабельные области γ и δ-цепи (также известные как TCRγ и TCRδ, соответственно), и способной специфически связываться с антигенным пептидом,

связанным с рецептором ГКГС. В некоторых вариантах осуществления TCR находится в форме αβ.

[00160] Как правило, TCR, существующие в формах αβ и γδ, обычно структурно схожи, но экспрессирующие их Т-клетки могут иметь различные анатомические локализации или функции. TCR может присутствовать на поверхности клетки или в растворимой форме. Как правило, TCR присутствует на поверхности Т-клеток (или Т-лимфоцитов), где он обычно отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС). В некоторых вариантах осуществления TCR также может содержать константный домен, трансмембранный домен и/или короткий цитоплазматический хвост (см., например, источник Janeway et al, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997). Например, в некоторых аспектах каждая цепь TCR может иметь один N-концевой вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранную область и короткий цитоплазматический хвост на С-конце. В некоторых вариантах осуществления TCR связан с инвариантными белками комплекса CD3, участвующими в опосредовании передачи сигнала. Если не указано иное, термин «TCR» следует понимать как охватывающий его функциональные фрагменты. Термин также охватывает интактные или полноразмерные TCR, включая TCR в форме αβ или в форме γδ.

[00161] Таким образом, для целей настоящей заявки ссылка на TCR включает любой TCR или функциональный фрагмент, такой как антигенсвязывающая часть TCR, которая связывается со специфическим антигенным пептидом, связанным с молекулой ГКГС, то есть с комплексом ГКГС-пептид. Термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» TCR, которые можно использовать взаимозаменяемо, относятся к молекуле, содержащей область структурных доменов TCR, но связывающей антиген (например, комплекс ГКГС-пептид), с которым связывается полноразмерный TCR. В некоторых случаях антигенсвязывающая часть содержит вариабельные домены TCR, такие как вариабельный домен а-цепи и вариабельный домен β-цепи TCR, достаточные для образования сайта связывания для связывания с конкретным комплексом ГКГС-пептид, например, где обычно каждая цепь содержит три определяющие комплементарность области.

[00162] В некоторых вариантах осуществления вариабельные домены цепей TCR ассоциируют с образованием петель или определяющих комплементарность областей (CDR), аналогичных иммуноглобулинам, которые обеспечивают распознавание антигена и определяют специфичность пептида путем формирования сайта связывания молекулы TCR и определения специфичности пептида. Как правило, подобно иммуноглобулинам, CDR разделяются каркасными областями (FR) (см., например, источники Jores et al., 1990; Chothia et al., 1988; Lefranc et al., 2003). В некоторых вариантах осуществления CDR3 представляет собой основную CDR, ответственную за распознавание процессированного антигена, хотя было также показано, что CDR1 альфа-цепи взаимодействует с N-концевой

частью антигенного пептида, тогда как CDR1 бета-цепи взаимодействует с С-концевой частью пептида. Полагают, что CDR2 распознает молекулу ГКГС. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область β-цепи может содержать дополнительную область гипервариабельности (HV4).

[00163] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR содержат константный домен. Например, как у иммуноглобулинов, внеклеточная часть цепей TCR (например, а-цепи, β-цепи) может содержать два домена иммуноглобулина, вариабельный домен (например, V_a или Vp; обычно аминокислоты с 1 по 116 согласно системе нумерации по Kabat, см. Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.) на N-конце и один константный домен (например, константный домен а-цепи или C_a, обычно аминокислоты с 117 по 259 согласно Kabat, константный домен β-цепи или Cp, обычно аминокислоты с 117 по 295 согласно Kabat), смежный с клеточной мембраной. Например, в некоторых случаях внеклеточная часть TCR, образованная двумя цепями, содержит два мембранно-проксимальных константных домена и два мембранно-дистальных вариабельных домена, содержащих CDR. Константный домен домена TCR содержит короткие соединительные последовательности, в которых остаток цистеина образует дисульфидную связь, связывая две цепи. В некоторых вариантах осуществления TCR может иметь дополнительный остаток цистеина в каждой из α- и β-цепей, так что TCR содержит две дисульфидные связи в константных доменах.

[00164] В некоторых вариантах осуществления цепи TCR могут содержать трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является положительно заряженным. В некоторых случаях цепи TCR содержат цитоплазматический хвост. В некоторых случаях структура позволяет TCR ассоциировать с другими молекулами, такими как CD3. Например, TCR, содержащий константные домены с трансмембранной областью, может закреплять белок в клеточной мембране и связываться с инвариантными субъединицами сигнального аппарата или комплекса CD3.

[00165] Как правило, CD3 представляет собой многобелковый комплекс, который может иметь три различные цепи (γ, δ и ε) у млекопитающих и ζ-цепь. Например, у млекопитающих комплекс может содержать цепь CD3γ, цепь CD3δ, две цепи CD3ε и гомодимер цепей CD3ζ. Цепи CD3γ, CD3δ и CD3ε являются высоко родственными белками клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащими один домен иммуноглобулина. Трансмембранные области цепей CD3γ, CD3δ и CD3ε заряжены отрицательно, что является характеристикой, которая позволяет этим цепям ассоциировать с положительно заряженными цепями Т-клеточных рецепторов. Каждый из внутриклеточных хвостов цепей CD3γ, CD3δ и CD3ε содержит один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный активирующий мотив на основе тирозина или ITAM, тогда как каждая цепь CD3ζ имеет три. Как правило, ITAM участвуют в сигнальной способности комплекса TCR. Эти вспомогательные молекулы имеют отрицательно заряженные трансмембранные области и играют роль в распространении

сигнала от TCR в клетку. CD3- и ζ-цепи вместе с TCR образуют так называемый Т-клеточный рецепторный комплекс.

[00166] В некоторых вариантах осуществления TCR может представлять собой гетеродимер с двумя цепями α и β (или необязательно γ и δ), или он может представлять собой одноцепочечную конструкцию TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR представляет собой гетеродимер, содержащий две отдельные цепи (α- и β-цепи или γ- и δ-цепи), которые связаны, например, дисульфидной связью или дисульфидными связями. В некоторых вариантах осуществления TCR для антигена-мишени (например, ракового антигена) идентифицируют и вводят в клетки. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая TCR, может быть получена из различных источников, таких как амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) общедоступных последовательностей ДНК TCR. В некоторых вариантах осуществления TCR получают из биологического источника, такого как клетки, такие как Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), Т-клеточные гибридомы или другие общедоступные источники. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут быть получены из клеток, выделенных in vivo. В некоторых вариантах осуществления у пациента может быть выделен клон Т-клеток с высокой аффинностью, и может быть выделен TCR. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки могут представлять собой культивируемую Т-клеточную гибридому или клон. В некоторых вариантах осуществления клон TCR для антигена-мишени получен у трансгенных мышей, сконструированных с помощью человеческих генов иммунной системы (например, системы человеческого лейкоцитарного антигена или HLA). В некоторых вариантах осуществления для выделения TCR против антигена-мишени используют фаговый дисплей. В некоторых вариантах осуществления TCR или его антигенсвязывающая часть могут быть синтезированы с использованием знаний о последовательности TCR.

3. Антигенпрезентирующие клетки

[00167] APC, которые включают макрофаги, В-лимфоциты и дендритные клетки, различаются по экспрессии конкретной молекулы MHC. APC поглощают антиген и повторно экспрессируют часть этого антигена вместе с молекулой ГКГС на их внешней клеточной мембране. ГКГС представляет собой большой генетический комплекс с несколькими локусами. Локусы ГКГС кодируют два основных класса мембранных молекул ГКГС, называемых ГКГС I класса и II класса. Т-хелперные лимфоциты обычно распознают антиген, ассоциированный с молекулами ГКГС II класса, а Т-цитотоксические лимфоциты распознают антиген, ассоциированный с молекулами ГКГС I класса. У людей ГКГС называют комплексом HLA, а у мышей - комплексом H-2.

[00168] В некоторых случаях aAPC пригодны для получения терапевтических композиций и продуктов для клеточной терапии согласно вариантам осуществления. Общие рекомендации относительно получения и применения антигенпрезентирующих систем см., например, в патентах США №№ 6225042, 6355479, 6362001 и 6790662.

[00169] Системы aAPC могут содержать по меньшей мере одну экзогенную вспомогательную молекулу. Может использоваться любое подходящее количество и комбинация вспомогательных молекул. Вспомогательная молекула может быть выбрана из вспомогательных молекул, таких как костимулирующие молекулы и молекулы адгезии. Примеры костимулирующих молекул включают CD86, CD64 (FcγRI), лиганд 41BB и IL-21. Молекулы адгезии могут включать углеводсвязывающие гликопротеины, такие как селектины, трансмембранные связывающие гликопротеины, такие как интегрины, кальций-зависимые белки, такие как кадгерины, и белки надсемейства однопроходных трансмембранных иммуноглобулинов (Ig), такие как молекулы межклеточной адгезии (ICAM), которые способствуют например, контакту между клетками или между клеткой и матриксом. Примеры молекул адгезии включают LFA-3 и ICAM, такие как ICAM-1. Методы, способы и реагенты, подходящие для отбора, клонирования, получения и экспрессии иллюстративных вспомогательных молекул, включая костимулирующие молекулы и молекулы адгезии, приведены, например, в патентах США №№ 6225042, 6355479 и 6362001.

4. Антигены

[00170] К числу антигенов, на которые нацелены генетически сконструированные антигенные рецепторы, относятся антигены, экспрессируемые в контексте заболевания, состояния или типа клеток, на которые необходимо нацелить адоптивную клеточную терапию. К числу заболеваний и состояний относятся пролиферативные, неопластические и злокачественные заболевания и расстройства, включая раковые заболевания и опухоли, включая гематологические раковые заболевания, раковые заболевания иммунной системы, такие как лимфомы, лейкозы и/или миеломы, такие как B-клеточные, T-клеточные и миелоидные лейкозы, лимфомы и множественные миеломы. В некоторых вариантах осуществления антиген избирательно экспрессируется или сверхэкспрессируется на клетках заболевания или состояния, например, опухолевых или патогенных клетках, по сравнению с нормальными или нецелевыми клетками или тканями. В других вариантах осуществления антиген экспрессируется на нормальных клетках и/или экспрессируется на сконструированных клетках.

[00171] Любой подходящий антиген может найти применение в настоящем способе. Примеры антигенов включают, не ограничиваясь перечисленным, антигенные молекулы из инфекционных агентов, ауто-/самоантигены, опухоле-/ракоассоциированные антигены и опухолевые неоантигены (Linnemann et al., 2015).

[00172] Опухолеассоциированные антигены могут происходить от рака предстательной железы, молочной железы, ободочной и прямой кишки, легкого, поджелудочной железы, почки, мезотелиомы, рака яичника или меланомы. Примеры опухолеассоциированных антигенов или антигенов, происходящих из опухолевых клеток, включают MAGE 1, 3 и MAGE 4 (или другие антигены MAGE); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (также известный как NY-ESO-1); SAGE; и HAGE или GAGE. Эти неограничивающие примеры опухолевых антигенов экспрессируются в широком

диапазоне типов опухолей, таких как меланома, рак легкого, саркома и рак мочевого пузыря. См., например, патент США № 6544518. Антигены, ассоциированные с раком предстательной железы, включают, например, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), простатический специфический антиген (PSA), кислые фосфаты предстательной железы, NKX3.1 и шесть-трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы (STEAP).

[00173] Другие опухолеассоциированные антигены включают Plu-1, HASH-1, HasH-2, Cripto и криптин. Кроме того, опухолевый антиген может представлять собой собственный пептидный гормон, такой как полноразмерный гонадотропин-рилизинг-гормон (GnRH), короткий пептид длиной 10 аминокислот, пригодный для лечения многих видов рака.

[00174] Опухолевые антигены включают опухолевые антигены, происходящие от раковых заболеваний, характеризующихся экспрессией опухолеассоциированных антигенов, такой как экспрессия HER-/neu. Опухолеассоциированные антигены, представляющие интерес, включают специфические для линии опухолевые антигены, такие как антигены линии меланоцитов-меланомы MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, тирозиназа и родственный тирозиназе белок. Примеры опухолеассоциированных антигенов включают, не ограничиваясь перечисленным, опухолевые антигены, происходящие от или содержащие любой один или более из p53, Ras, c-Myc, цитоплазматические серин/треонин киназы (например, A-Raf, B-Raf и C-Raf, циклинзависимые киназы), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, тирозиназы, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, фосфоинозитид 3-киназ (PI3K), TRK-рецепторов, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, антигена опухоли Вильмса (WT1), AFP, -катенина/m, каспазы-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, миозина/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, аннексина II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, регуляторного фактора интерферона 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, опухолеассоциированного передатчика кальциевых сигналов 1 (TACSTD1) TACSTD2, рецепторных тирозинкиназ (например, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (в частности, EGFRvIII), рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), рецептора фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR)), цитоплазматических тирозинкиназ (например, src-семейства, семейства syk-ZAP70), интегрин-связанной киназы (ILK), передатчиков сигнала и активаторов транскрипции STAT3, STATS и STATE, факторов, индуцируемых гипоксией (например, HIF-1 и HIF-2), ядерного фактора «каппа би» (NF-B), рецепторов Notch (например, Notch1-4), c-Met, мишеней рапамицина млекопитающих (mTOR), WNT, киназ, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK) и их регуляторных субъединиц, PMSA, PR-3, MDM2, мезотелина, антигена почечно-клеточной карциномы 5T4, SM22-альфа, карбоангидразы I (CAI) и IX (CAIX) (также известная как G250), STEAD, TEL/AML1,

GD2, протеиназы-3, hTERT, точек разрыва транслокации при саркоме, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (гибридный ген TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, андрогенового рецептора, циклина-B1, полисиаловой кислоты, MYCN, RhoC, GD3, фукозила GM1, мезотелина, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGsS, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, белка спермы 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, легумаина, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, fos-родственного антигена 1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, LRRN1 и идиотипа.

[00175] Антигены могут включать эпитопные области или эпитопные пептиды, полученные из генов, мутированных в опухолевых клетках, или из генов, транскрибируемых в опухолевых клетках на иных уровнях по сравнению с нормальными клетками, таких как фермент теломераза, сурвивин, мезотелин, мутированный ras, перегруппировка bcr/abl, Her2/neu, мутированный или дикого типа p53, цитохром P450 1B1 и патологически экспрессируемые интронные последовательности, такие как N-ацетилглюкозаминилтрансфераза-V; клональные перестройки генов иммуноглобулинов, генерирующие уникальные идиотипы при миеломе и B-клеточных лимфомах; опухолевые антигены, включающие эпитопные области или эпитопные пептиды, полученные из онковирусных процессов, такие как белки вируса папилломы человека E6 и E7; белок вируса Эпштейна-Барр LMP2; немутированные онкофетальные белки с избирательной опухолевой экспрессией, такие как карциноэмбриональный антиген и альфа-фетопротеин.

[00176] В других вариантах осуществления антиген получен или происходит из патогенного микроорганизма или из условно-патогенного микроорганизма (также называемого в настоящей заявке микроорганизмом инфекционного заболевания), такого как вирус, грибок, паразит и бактерия. В отдельных вариантах осуществления антигены, происходящие из такого микроорганизма, включают полноразмерные белки.

Иммунные эффекторные клетки

Гемопоэтические клетки-предшественники

[00177] PSC согласно настоящему изобретению, сконструированные для экспрессии антигенного рецептора, такого как CAR, могут быть дифференцированы в HPC способами, известными в данной области техники. В одном из способов CAR-PSC дифференцируют в $CD34^+$ HPC посредством направленной дифференцировки. В еще одном способе CAR-PSC дифференцируют в $CD34^+$ HPC посредством прямого программирования.

1. Направленная дифференцировка

[00178] Отдельные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к дифференцировке CAR-PSC в HPC. CAR-PSC могут быть дифференцированы в HPC способами, известными в данной области техники, такими как описанные в патенте США № 8372642, включенном в настоящую заявку посредством ссылки. В одном из способов для стимуляции дифференцировки в гемопоэтические клетки могут быть использованы комбинации BMP4, VEGF, лиганда Flt3, IL-3 и ГМ-КСФ. В отдельных вариантах

осуществления последовательное воздействие на клеточные культуры первой среды для получения PSC для дифференцировки, второй среды, включающей BMP4, VEGF и FGF, с последующим культивированием в третьей среде, включающей лиганд Flt3, SCF, TPO, IL-3, и IL-6, может обеспечить дифференцировку плюрипотентных клеток в HPC и гемопоэтические клетки. Вторая среда с определенным химическим составом также может содержать гепарин. Кроме того, включение FGF-2 (50 нг/мл) в среду, содержащую BMP4 и VEGF, может повысить эффективность образования гемопоэтических клеток-предшественников из плюрипотентных клеток. Кроме того, включение ингибитора киназы гликогенсинтазы-3 (GSK3) (например, CHIR99021, BIO и SB-216763) в первую среду с определенным химическим составом может дополнительно усилить продукцию HPC.

[00179] Как правило, дифференцировка плюрипотентных клеток в гемопоэтические клетки-предшественники может быть проведена с использованием определенных или неопределенных условий. Понятно, что определенные условия, как правило, предпочтительнее в вариантах осуществления, где полученные клетки предназначены для введения человеку. Гемопоэтические стволовые клетки могут происходить от плюрипотентных стволовых клеток в определенных условиях (например, с использованием среды TeSR), и гемопоэтические клетки могут быть получены из эмбриоидных телец, происходящих от плюрипотентных клеток. В других вариантах осуществления плюрипотентные клетки могут быть совместно культивированы на клетках OP9 или мышиных эмбриональных фибробластах, а затем дифференцированы.

[00180] Плюрипотентным клеткам можно дать возможность образовать эмбриоидные тельца или агрегаты, как часть процесса дифференцировки. Образование «эмбриоидных телец» (EB) или кластеров растущих клеток для индукции дифференцировки обычно включает агрегацию in vitro человеческих плюрипотентных стволовых клеток в EB и позволяет спонтанно и случайным образом дифференцировать человеческие плюрипотентные стволовые клетки в различные типы тканей, образующих энтодерму, эктодерму и мезодерму. Таким образом, трехмерные EB могут быть использованы для получения некоторой фракции гемопоэтических клеток и эндотелиальных клеток.

[00181] EB могут быть образованы по следующей методике. Недифференцированные iPSC, адаптированные к росту без фидера на покрытых MATRIGEL™ планшетах, могут быть собраны после достижения конфлюэнтности с помощью обработки 0,5 М ЭДТА в течение приблизительно 8-10 минут при комнатной температуре. ЭДТА аспирируют после инкубации, и EB могут быть образованы путем сбора клеток в среде SFD, содержащей ингибитор rock или блеббистатин. Среда на следующий день может быть заменена на среду для дифференцировки EB1, содержащую различные составы цитокинов. Клетки высевают с плотностью 0,25-0,5 миллиона клеток на мл, чтобы способствовать образованию агрегатов.

[00182] Для стимуляции образования агрегатов клетки могут быть перенесены в планшеты с низким уровнем прикрепления для инкубации в течение ночи в бессывороточной среде для дифференцировки (SFD), состоящей из 75% IMDM (Gibco), 25% модифицированной среды Хэма F12 (Cellgro) с добавлением 0,05% N2 и B-27 без добавок RA (ретиноевой кислоты), 200 мМ 1-глутамина, 0,05 мг/мл магниевой соли аскорбиновой кислоты-2-фосфата (Asc 2-P) (WAKO) и $4{,}5\times10^{-4}$ MTG. На следующий день клетки могут быть собраны из каждой лунки и центрифугированы. Затем клетки могут быть повторно суспендированы в «среде для дифференцировки EB», состоящей из минимальной среды SFD с добавлением приблизительно 50 нг/мл костного морфогенетического фактора (BMP4), приблизительно 50 нг/мл фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и 50 нг/мл zb FGF в течение первых четырех дней дифференцировки. Клетки питают наполовину каждые 48 часов. На пятый день дифференцировки среду заменяют второй средой, состоящей из среды SFD с добавлением 50 нг/мл фактора стволовых клеток (SCF), приблизительно 50 нг/мл лиганда Flt-3 (Flt-3L), 50 нг/мл интерлейкина-6 (IL-6), 50 нг/мл интерлейкина-3 (IL-3), 50 нг/мл тромбопоэитина (TPO). Клетки питают наполовину каждые 48 часов свежими средами для дифференцировки. Смены сред проводят путем центрифугирования культур дифференцировки при 300 g в течение 5 минут и аспирации половины объема от культур дифференцировки и замены его свежей средой. В отдельных вариантах осуществления среда для дифференцировки EB может включать BMP4 (например, приблизительно 50 нг/мл), VEGF (например, приблизительно 50 нг/мл) и, необязательно, FGF-2 (например, приблизительно 25-75 нг/мл или приблизительно 50 нг/мл). Супернатант может быть аспирирован и заменен свежей средой для дифференцировки. В качестве альтернативы, клетки можно питать наполовину каждые два дня свежей средой. Клетки могут быть собраны в разные моменты времени в ходе дифференцировки.

[00183] HPC могут быть культивированы из плюрипотентных стволовых клеток с использованием среды с определенным химическим составом. Способы дифференцировки плюрипотентных клеток в гемопоэтические $CD34^+$ стволовые клетки с использованием сред с определенным химическим составом описаны, например, в заявке на патент США 12/715136, полностью включенной посредством ссылки. Подразумевается, что эти способы могут быть использованы в настоящем изобретении.

[00184] Например, среда с определенным химическим составом может быть использована для индукции дифференцировки в гемопоэтические $CD34^+$ клетки. Среда с определенным химическим составом может содержать факторы роста BMP4, VEGF, лиганд Flt3, IL-3 и/или ГМ-КСФ. Плюрипотентные клетки могут быть культивированы в первой среде с определенным химическим составом, содержащей BMP4, VEGF и, необязательно, FGF-2, с последующим культивированием во второй среде, содержащей либо (лиганд Flt3, IL-3 и ГМ-КСФ), либо (лиганд Flt3, IL-3, IL-6 и TPO). Первая и вторая среды также могут содержать один или более из SCF, IL-6, Г-КСФ, EPO, FGF-2 и/или

TPO. Условия значительной гипоксии (например, менее 20% O2) могут дополнительно способствовать гемопоэтической или эндотелиальной дифференцировке.

[00185] Клетки могут быть по существу отделены друг от друга с помощью механических или ферментативных средств (например, с использованием трипсина или TrypLE™). В среду также может быть включен ингибитор ROCK (например, H1152 или Y-27632). Подразумевается, что эти подходы могут быть автоматизированы с использованием, например, робототехнической автоматизации.

[00186] В отдельных вариантах осуществления условия значительной гипоксии могут быть использованы для стимуляции дифференцировки плюрипотентных клеток в гемопоэтические клетки-предшественники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, содержание кислорода в атмосфере менее приблизительно 20,8% будет считаться гипоксическим. Человеческие клетки в культуре могут расти в условиях атмосферы с пониженным содержанием кислорода по сравнению с окружающим воздухом. Эта относительная гипоксия может быть достигнута путем уменьшения содержания кислорода в атмосфере, контактирующей с культуральными средами. Эмбриональные клетки обычно развиваются in vivo в условиях пониженного содержания кислорода, обычно от приблизительно 1% до приблизительно 6% кислорода в атмосфере, с содержанием углекислого газа на уровне окружающей среды. Без привязки к какой-либо конкретной теории полагают, что условия гипоксии могут имитировать аспект определенных условий эмбрионального развития. Как показано в приведенных ниже примерах, условия гипоксии могут быть использованы в отдельных вариантах осуществления для стимуляции дополнительной дифференцировки плюрипотентных клеток, таких как iPSC или hESC, в более дифференцированный тип клеток, такой как HPC.

[00187] Следующие условия гипоксии могут быть использованы для стимуляции дифференцировки плюрипотентных клеток в гемопоэтические клетки-предшественники. В отдельных вариантах осуществления содержание кислорода в атмосфере, составляющее менее приблизительно 20%, менее приблизительно 19%, менее приблизительно 18%, менее приблизительно 17%, менее приблизительно 16%, менее приблизительно 15%, менее приблизительно 14% менее приблизительно 13%, менее приблизительно 12%, менее приблизительно 11%, менее приблизительно 10%, менее приблизительно 9%, менее приблизительно 8%, менее приблизительно 7%, менее приблизительно 6%, менее приблизительно 5%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%, может быть использовано для стимуляции дифференцировки в гемопоэтические клетки-предшественники. В отдельных вариантах гипоксическая атмосфера содержит приблизительно 5% газообразного кислорода.

[00188] Независимо от того, какая конкретная среда используется в любом данном размножении гемопоэтических клеток-предшественников, в используемую среду предпочтительно добавляют по меньшей мере один цитокин в концентрации от приблизительно 0,1 нг/мл до приблизительно 500 нг/мл, чаще от 10 нг/мл до 100 нг/мл.

Подходящие цитокины включают, не ограничиваясь перечисленным, лиганд c-kit (KL) (также называемый стальным фактором (StI), фактором роста тучных клеток (MGF) и фактором стволовых клеток (SCF)), IL-6, Г-КСФ, IL-3, ГМ-КСФ, IL-1α, IL-11 MIP-1α, LIF, лиганд c-mpl/TPO и лиганд flk2/flk3 (Flt2L или Flt3L). В частности, культура будет включать по меньшей мере один из SCF, Flt3L и TPO. Более конкретно, культура будет включать SCF, Flt3L и TPO.

[00189] В одном из вариантов осуществления цитокины содержатся в носителе и пополняются посредством перфузии среды. В качестве альтернативы, при использовании биореакторной системы цитокины могут быть добавлены отдельно, без перфузии среды, в виде концентрированного раствора через отдельные впускные отверстия. Когда цитокины добавляют без перфузии, их, как правило, добавляют в биореакторы в виде 10x-100x раствора в количестве, равном от одной десятой до 1/100 объема, со свежими цитокинами, добавляемыми приблизительно каждые 2-4 дня. Кроме того, свежие концентрированные цитокины также могут быть по отдельности добавлены в дополнение к цитокинам в перфузированной среде.

[00190] В некоторых вариантах осуществления HPC демонстрируют нарушение метил-CpG-связывающего белка 2 (MeCP2), и их культивируют в условиях, способствующих миелоидной дифференцировке или лимфоидной дифференцировке. В некоторых аспектах HPC экспрессируют нефункциональный MeCP2, который по существу не связывается с метилированной ДНК. В отдельных аспектах HPC не экспрессируют MeCP2 на уровнях, достаточных для воздействия на активность связывания ДНК MeCP2. В частных аспектах MeCP2 не функционирует вследствие усечения или мутации в гене MeCP2. В некоторых аспектах получение HPC, демонстрирующих нарушение MeCP2, включает приведение HPC в контакт с миРНК, малой РНК, образующей шпильки, или низкомолекулярным ингибитором MeCP2.

(i) Пример способа 3D дифференцировки

[00191] Пример способа дифференцировки PSC в HPC включает поддержание в условиях без фидера, например, на покрытых MATRIGEL™ или витронектином планшетах в среде Essential 8 (E8). Агрегаты получают из PSC, в частности, из субконфлюэнтных, например, при <80% конфлюэнтности), при плотности 0,5-1 миллиона клеток на мл в среде Essential 3 (E3) (например, содержащей только 3 из 8 компонентов среды E8: DMEM/минимальная среда F12, аскорбиновая кислота (например, 100-500 мкМ), 2-фосфат магния и селенит натрия) с добавлением 50 нг/мл FGF2, 50 нг/мл VEGF, 2 мкМ CHIR99021 (ингибитор GSK-3) и блеббистатина (ингибитор миозина-II) (например, 2-10 мкМ, например, 10 мкМ)). Образование агрегатов и последующие стадии проводят в течение 24-часового культивирования в колбах со сверхнизким прикреплением (ULA) при постоянном перемешивании.

[00192] Образовавшиеся клеточные агрегаты (т. е. EB) затем переносят в бессывороточную среду для дифференцировки (например, 50% IMDM, 50% среды Хэма F12, 100 мкг/мл поливинилового спирта, 100 мкг/мл рекомбинантного человеческого

сывороточного альбумина, 1x добавки заменимых аминокислот (Invitrogen), 0,1x добавки липидов определенного химического состава (Invitrogen), 125 мкМ магниевой соли аскорбиновой кислоты-2-фосфата, 0,25 мкМ линолевой кислоты, добавки микроэлементов A (0,3x), B (0,2x) и C (0,1x) (Corning), 5 мМ хлорида натрия, 100 мкМ монотиоглицерина, 20 мкМ этаноламина, 100 нг/мл гепарина и 10 нг/мл IGF1) с добавлением цитокинов, индуцирующих гемопоэтическую мезодерму: 25 нг/мл BMP4, 50 мг/мл VEGF и 50 нг/мл FGF2. Культивирование продолжают, например, в течение 4 дней, с полной сменой среды на второй день.

[00193] Для поддержания дифференцировки и размножения гемопоэтических $CD34^+$ предшественников клеточные агрегаты затем переносят в бессывороточную среду для дифференцировки (как указано выше) с добавлением гемопоэтических поддерживающих цитокинов, например, 50 нг/мл SCF, 20 мг/мл TPO, 10 нг/мл FLT3L, 20 нг/мл IL-3 и 25 нг/мл BMP4. Культивирование продолжают, например, в течение 4 дней, с полной сменой среды на второй день.

[00194] Культуры собирают после процесса дифференцировки, например, спустя 9 дней. Суспензию отдельных клеток получают путем расщепления дифференцированных клеточных агрегатов, например, аккутазой. Выделенные $CD34^+$ клетки, например, выделенные с помощью MACS, затем высевают в культуры для дифференцировки T/NK или криоконсервируют для последующего использования в течение 1 часа после выделения.

(i) Пример способа 2D дифференцировки

[00195] В альтернативном примере способа PSC подвергают методике 2D дифференцировки для получения HPC. Сначала PSC акклиматизируют к условиям гипоксии, например, на протяжении 5-10 пассажей, в отсутствие фидера, например, на покрытии MATRIGEL™ или витронектином в среде Essential 8 (E8). PSC отделяют друг от друга и высевают на 6-луночные планшеты, покрытые PureCoat Amine (Corning Inc.) при плотности 25000/см^2 в присутствии бессывороточной среды с определенным химическим составом (SFD) с добавлением 5 мкМ блеббистатина (например, 2-10 мкМ, например, 10 мкМ). Минимальная среда SFD может содержать 75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (с глутамином и 25 мМ HEPES+P/S), 25% среды Хэма F12 (Mediatech 10-080-CV), 0,5% добавки N2 (Invitrogen 17502-048), 1% добавки B27 без ретиноевой кислоты (Invitrogen 12587-010, 0,05% BSA, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 4,5 × 10-4 М монотиоглицерина с добавлением 50 нг/мл BMP-4, VEGF и bFGF.

[00196] Индукцию гемопоэтической дифференцировки начинают на 1-й день путем культивирования, например, в минимальной среде SFD, содержащей 75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (с глутамином и 25 мМ HEPES+P/S), 25% среды Хэма F12 (Mediatech 10-080-CV), 0,5% добавки N2 (Invitrogen 17502-048), 1% добавки B27 без ретиноевой кислоты (Invitrogen 12587-010), 0,05% BSA, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 4,5 × 10-4 М монотиоглицерина с добавлением 50 нг/мл BMP4, VEGF и bFGF. На 2 день среду аспирируют и клетки помещают в свежую среду EB1 (например, минимальную

среду SFD, содержащую 75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (с глутамином и 25 мМ HEPES+P/S), 25% среды Хэма F12 (Mediatech 10-080-CV), 0,5% добавки N2 (Invitrogen 17502-048), 1% добавки B27 без ретиноевой кислоты (Invitrogen 12587-010, 0,05% BSA, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 4,5 × 10-4 М монотиоглицерина с добавлением 50 нг/мл BMP-4, VEGF и bFGF, еще на 48 часов.

[00197] На 5-10 дни среды аспирируют и помещают клетки в среду EB2 на следующие 48 часов. Среда EB2 может содержать свежую минимальную среду SFD, содержащую 75% IMDM (Invitrogen 12200-069) (с глутамином и 25 мМ HEPES+P/S), 25% среды Хэма F12 (Mediatech 10-080-CV), 0,5% добавки N2 (Invitrogen 17502-048), 1% добавки B27 без ретиноевой кислоты (Invitrogen 12587-010, 0,05% BSA, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 4,5 × 10-4 М монотиоглицерина с добавлением 50 нг/мл лиганда Flt-3, IL-3, IL-6, SCF и TPO, каждый в концентрации 50 нг/мл, и 5000 ЕД/мл гепарина. Клетки собирают на 7, 8, 9, 10 день дифференцировки с использованием TrypLE и окрашивают на присутствие маркеров HPC и лимфоидных предшественников.

2. Прямое программирование

[00198] Отдельные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к получению HPC путем прямого программирования CAR-PSC посредством экспрессии комбинации генов программирования, важных для дифференцировки/функционирования гемопоэтических клеток. В одном из способов PSC модифицируют для экспрессии по меньшей мере трех генов программирования гемопоэтических предшественников, таких как ген ETS (например, ETC2 или ERG), ген гемопоэтического развития (например, GATA2) и ген гомеобокса (например, HOXA9), как описано в заявке PCT/US2016/057893, полностью включенной в настоящую заявку посредством ссылки. В частных аспектах гены ETV2/ERG, GATA2 и HOXA9 совместно экспрессируются одним вектором, таким как индуцибельный вектор PiggyBac, с использованием двунаправленного промотора Tight, который трансфицируют в CAR-PSC.

[00199] Кроме того, EGH-CAR-PSC могут быть дополнительно модифицированы для экспрессии дополнительных генов для потенциала долгосрочной трансплантации. Примеры генов включают HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1, HOXA4, ZNF414, KLF4, ZNF131, BCL2, ETV6, ZNF350 и/или RBAK. Например, PSC могут быть трансфицированы одним или более векторами для экспрессии HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 и HOXA4.

[00200] Предпочтительно гены ETV2/GAT2/HOXA9 экспрессируются только в течение периода времени, достаточного для прямого программирования PSC в гемопоэтические клетки-предшественники. Соответственно, гены программирования гемопоэтических предшественников могут находиться под контролем индуцибельного промотора. Таким образом, экспрессия генов программирования гемопоэтических предшественников может быть индуцирована в PSC в течение периода времени, достаточного для прямого программирования в многолинейные гемопоэтические клетки-предшественники. Период времени может составлять от приблизительно 1 дня до

приблизительно 20 дней, например, приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней. В качестве альтернативы, гены программирования гемопоэтических предшественников могут быть введены в PSC посредством эписомального вектора. Таким образом, гены программирования гемопоэтических предшественников могут быть временно экспрессированы в PSC.

Дифференцировка лимфоидных клеток

[00201] Затем HPC могут быть дополнительно дифференцированы в лимфоидные клетки, включая Т-клетки, NK-клетки и Т-/NK-клетки. В некоторых аспектах HPC в ходе дифференцировки выделяют на 7-12 день, например, на 8-11 день, для дифференцировки в лимфоидные клетки. HPC на этой стадии могут быть идентифицированы по экспрессии CD34 и CD43. Кроме того, HPC с лимфоидным потенциалом могут экспрессировать CD144, DLL4, CD7 и CD235 на низких уровнях, которые снижаются на 11-й день, что указывает на то, что определенный пороговый уровень экспрессии этих маркеров необходим для дифференцировки первичных клеток в лимфоидные клетки в присутствии DLL4.

[00202] В некоторых аспектах HPC, выделенные на 7-11 день, например, на 7 день, 8 день, 9 день, 10 день или 11 день процесса дифференцировки, могут быть дифференцированы в лимфоидные клетки, такие как Т- и NK-клетки. В некоторых аспектах сроки происхождения лимфоидных предшественников совпадают со снижением количества гемоэндотелиальных предшественников и появлением эритроидных предшественников в ходе дифференцировки HPC. В частных аспектах HPC на 9 день могут обладать повышенной эффективностью генерирования Т-клеток. HPC, способные к лимфоидной дифференцировке, могут быть выделены и/или идентифицированы по экспрессии определенных маркеров. Например, клетки с поверхностной экспрессией CD34 и/или CD43, в частности, экспрессирующие как CD34, так и CD43, могут быть отобраны для лимфоидной дифференцировки, например, с помощью сортировки MACS.

[00203] Дополнительные маркеры для обнаружения лимфоидных предшественников включают DLL4, CD144, CD31, CD34, $CD43^{lo}$, $CD45^{lo/-}$, CD235, CD7, Flk-1, APNLR. В частных аспектах для идентификации лимфоидных предшественников используют присутствие популяций, двойных положительных по CD34/CD7, CD235/CD7, DLL4/CD34, DLL4/CD31, DLL4/CD144 или $CD34/CD43^{lo}$. Экспрессия CD144 на HPC совмещается с CD31, CD34 и DLL4. Экспрессия CD7 на HPC совмещается с CD235, CD34 и CD43. Следовательно, HPC, совместно экспрессирующие CD144 и CD7, демонстрируют предшественники захвата с лимфоидным потенциалом, экспрессирующие мембраносвязанный лиганд notch (DLL4) вместе с гемоэндотелиальными маркерами, и создают фенотипическую сигнатуру для появляющихся лимфоидных предшественников, способных генерировать линии определяющего гемопоэза in vitro. В частных аспектах HPC могут быть дополнительно отсортированы на клетки с повышенным лимфоидным потенциалом путем сортировки поверхностных маркеров, включая CD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD6, CD335, Flk-1 и DLL4. В некоторых аспектах фракции HPC,

положительные на CCD31, CD34, CD144, CD43, CD45, CD6, CD335, Flk-1 и DLL4, дифференцируют в лимфоидные клетки. В частных аспектах CD144/CD7-положительные фракции HPC дифференцируют в лимфоидные клетки.

[00204] HPC могут быть культивированы в определенных условиях без фидера для лимфоидной дифференцировки. Культуральная среда может содержать один или более компонентов матрикса, таких как RetroNectin, фибронектин или пептид RGD. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что компонент матрикса может обеспечить твердую опору для роста эмбриональных стволовых клеток. В отдельных вариантах осуществления компонент матрикса может быть нанесен на поверхность для культивирования и находиться в контакте с культуральной средой перед посевом клеток в среду. Например, клетки могут быть культивированы в среде с определенным химическим составом (например, среде TeSR) на планшетах, покрытых фибронектином или MATRIGEL™, до механического разделения клеток на сгустки или одиночные клетки и индукции дифференцировки в гемопоэтические клетки-предшественники.

[00205] Различные компоненты матрикса могут быть использованы для культивирования плюрипотентных клеток, включая коллаген (например, коллаген IV), ламинин, витронектин, MATRIGEL™, желатин, полилизин, тромбоспондин (например, TSP-1, -2, -3, -4 и/или - 5) и/или PRONECTIN-F™. В отдельных вариантах осуществления можно избежать использования только MATRIGEL™, коллагена IV или ламинина с клетками, ранее культивированными с использованием TeSR, из-за возможных неблагоприятных воздействий на жизнеспособность клеток; тем не менее, эти композиции могут быть эффективно использованы в сочетании с другими компонентами матрикса. Комбинации этих компонентов матрикса могут обеспечить дополнительное преимущество для стимуляции роста клеток и жизнеспособности клеток. В отдельных вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6 или более вышеуказанных компонентов матрикса могут быть использованы для культивирования клеток, например, перед гемопоэтической дифференцировкой.

[00206] В некоторых вариантах осуществления для усиления лимфоидной дифференцировки может быть использована аскорбиновая кислота. В среду с определенным химическим составом может быть добавлено от приблизительно 10 мкМ до приблизительно 1 мМ аскорбиновой кислоты, например, от 100 до 500 мкМ, например, от приблизительно 50 мкМ до приблизительно 100 мкМ, например, приблизительно 95 мкМ. Аскорбиновая кислота может быть выбрана из различных аскорбатов, например, магниевой соли фосфата аскорбиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления для усиления лимфоидной дифференцировки можно использовать никотинамид (например, никотиновую кислоту), например, в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 5 мМ.

[00207] В некоторых аспектах ГПЦ дифференцируют в лимфоидные клетки, такие как Т-клетки, путем изменения эндогенной активности лиганда Notch путем введения вещества, повышающего продукцию лиганда Notch у субъекта. Способ также включает

культивирование клеток в среде, включающей эффективное количество лиганда notch и одного или более цитокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-7, IL-15, SCF, Flt-3 и IL-3. В некоторых частных вариантах осуществления среда может дополнительно включать IL-6. В некоторых вариантах осуществления лиганд notch представляет собой лиганд notch дельта 4 (DLL4), такой как химера DLL4:Fc.

[00208] Выбирают лиганд Notch, стимулирующий и поддерживающий дифференцировку и пролиферацию клеток Т-клеточной линии. Лиганд Notch может иметь человеческое происхождение или может происходить от других видов, включая виды млекопитающих, такие как грызун, собака, кошка, свинья, овца, корова, коза и приматы. Конкретные примеры лигандов Notch включают семейство дельта. Семейство дельта включает дельта-1 (идентификационный номер Genbank AF003522, Homo sapiens), дельта-3 (идентификационный номер Genbank AF084576, Rattus norvegicus), дельта-подобный 1 (идентификационный номер Genbank NM-005618 и NP-005609, Homo sapiens; идентификационный номер Genbank X80903, I48324, M. musculus), дельта-подобный 3 (идентификационный номер Genbank NM-053666, N-446118, Rattus norvegicus), дельта-4 (идентификационный номер Genbank AF273454, BAB18580, Mus musculus; идентификационный номер Genbank AF279305, AAF81912, Homo sapiens) и дельта-подобный 4 (идентификационный номер Genbank Q9NR61, AAF76427, AF253468, NM-019074, Homo sapiens; идентификационный номер Genbank NM-019454, mus musculus). Лиганды Notch доступны для приобретения или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК и очищены в различной степени.

[00209] Способ дополнительно включает стадию поддержания клеток HPC в культуре, описанной выше, в течение периода времени, достаточного для продуцирования дифференцированных NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные NK-клетки появляются в культурах вместе с Т-клетками, однако NK-клетки могут перестать размножаться после 6 недели. Как правило, определение увеличения количества NK-клеток и/или их состояния дифференцировки оценивается с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области техники. Например, за культивируемыми клетками можно наблюдать с помощью проточной цитометрии на предмет развития NK-клеток путем окрашивания клеток антителами к CD56 и антителами к CD3. Антитело к CD3, такое как ОКТ3, может присутствовать в концентрации от 0,5 до 2 мкг. Клетки, которые являются $CD56^{+}/CD3^{-}$, будут указывать на дифференцированные NK-клетки.

[00210] В частных аспектах лимфоидная дифференцировка в $CD3^{+}$ Т-клетки или $CD56^{+}CD3^{-}$ NK-клетки осуществляется посредством 2D культивирования в условиях гипоксии на планшетах, покрытых ретронектином и DLL4. В частных аспектах обработанный планшет для нетканевой культуры может быть покрыт химерой DLL4:Fc и RetroNectin (фрагмент фибронектина CH-296; Takara Shuzo, Япония) для использования в лимфоидной дифференцировке HPC. Дифференцировка может включать первый период дифференцировки в Т-/NK-клетки, за которым следует второй период размножения Т- или

NK-клеток. Первый период дифференцировки может составлять от приблизительно 1 недели до приблизительно 2 недель, а второй период размножения также может составлять от приблизительно 1 недели до приблизительно 2 недель. Таким образом, период лимфоидной дифференцировки и размножения целиком может составлять приблизительно 2-4 недели.

[00211] В некоторых вариантах осуществления процесс лимфоидной дифференцировки может включать совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями, такими как антигенспецифические опухолевые клетки, для повышения цитотоксической активности Т-клеток и NK-клеток. В частных аспектах период размножения в ходе лимфоидной дифференцировки может включать совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями. Например, CD19-CAR-T-клетки или NK-клетки могут быть совместно культивированы с CD19+опухолевыми клетками (например, CD19+клетками Daudi) в течение периода размножения, например, в течение одной-трех недель, в частности, двух недель. В некоторых аспектах период размножения может дополнительно включать добавление цитокинов, таких как IL-2, IL-15 и/или IL-21, в частности IL-2, для улучшения размножения. Концентрация цитокинов может быть оптимизирована, например, до от 10 до 50 мкМ.

Культура клеток

[00212] В отдельных вариантах осуществления для стимуляции дифференцировки HPC в миелоидные или лимфоидные линии могут быть использованы условия значительной гипоксии. В отдельных вариантах осуществления содержание кислорода в атмосфере, составляющее менее приблизительно 20%, менее приблизительно 19%, менее приблизительно 18%, менее приблизительно 17%, менее приблизительно 16%, менее приблизительно 15%, менее приблизительно 14% менее приблизительно 13%, менее приблизительно 12%, менее приблизительно 11%, менее приблизительно 10%, менее приблизительно 9%, менее приблизительно 8%, менее приблизительно 7%, менее приблизительно 6%, менее приблизительно 5%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2% или приблизительно 1%, может быть использовано для стимуляции дифференцировки в гемопоэтические клетки-предшественники. В отдельных вариантах гипоксическая атмосфера содержит приблизительно 5% газообразного кислорода.

[00213] Как описано в настоящей заявке, одна или более культуральных сред с определенным химическим составом могут быть эффективно использованы для стимуляции дифференцировки HPC в миелоидные и лимфоидные линии; в частности, исключение продуктов животного происхождения, таких как сывороточные и мышиные питающие слои, может снизить риски, связанные с воздействием на клетки продуктов животного происхождения, и позволить получить клетки, которые можно было бы более безопасно вводить человеку. Поскольку традиционная разработка культуры стволовых клеток основывалась на продуктах сыворотки и мышиных питающих слоях для

дифференцировки стволовых клеток в различные типы клеток, эти традиционные методики ограничивали масштаб, в котором могла проводиться дифференцировка, увеличивали биологическую изменчивость и потенциальное загрязнение и сильно затрудняли применение ES клеток в трансляционной терапии, в которой в противоположном случае они могли бы оказаться полезными.

[00214] Обычно клетки согласно настоящему изобретению культивируют в культуральной среде, которая представляет собой богатый питательными веществами забуференный раствор, способный поддерживать рост клеток. Культуральные среды, подходящие для выделения, размножения и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в гемопоэтические клетки-предшественники и гемопоэтические клетки согласно способу, описанному в настоящей заявке, включают, не ограничиваясь перечисленным, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), DMEM/F-15, RPMI 1640, среды Дульбекко, модифицированные по способу Исков (IMDM) и Opti-MEM SFM (Invitrogen Inc.). Среда с химически определенным составом включает минимально необходимую среду, такую как среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков (IMDM) (Gibco), с добавлением человеческого сывороточного альбумина, человеческого липопротеина ExCyte, трансферрина, инсулина, витаминов, незаменимых и заменимых аминокислот, пирувата натрия, глутамина, а также пригодны митогены. В контексте настоящей заявки термин «митоген» относится к агенту, стимулирующему деление клетки. Агент может быть химическим веществом, обычно какой-то формой белка, который стимулирует клеточное деление, вызывая митоз. В одном из вариантов осуществления для применения в способах согласно настоящему изобретению рассматриваются бессывороточные среды, такие как описанные в патенте США № 08/464,599 и WO 96/39487, и «полный носитель», как описано в патенте США № 5486359. В некоторых вариантах осуществления в культуральную среду добавлена 10% фетальная бычья сыворотка (FBS), человеческая аутологичная сыворотка, человеческая сыворотка типа AB или плазма, обогащенная тромбоцитами, с добавлением гепарина (2 ЕД/мл).

[00215] Иммунные клетки могут быть получены путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток или гемопоэтических клеток-предшественников в среде в условиях, увеличивающих внутриклеточный уровень факторов, достаточных для стимуляции дифференцировки клеток в миелоидные или лимфоидные линии. Среда может также содержать один или более агентов дифференцировки и созревания гемопоэтических клеток, таких как различные виды факторов роста. Эти агенты могут либо способствовать побуждению клеток к принятию более зрелого фенотипа, либо, предпочтительно, способствовать выживанию зрелых клеток, либо сочетать оба этих эффекта. Агенты дифференцировки и созревания могут включать растворимые факторы роста (пептидные гормоны, цитокины, комплексы лиганд-рецептор и другие соединения), способные стимулировать рост клеток гемопоэтической линии клеток. Неограничивающие примеры таких агентов включают, не ограничиваясь перечисленным, гемопоэтические или эндотелиальные факторы роста, такие как фактор роста

фибробластов (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор стволовых клеток (SCF), тромбопоэтин (TPO), лиганд FLT-3 (FLT3L), интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-9 (IL-9) или гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), или их изоформы или варианты.

Применение антигенспецифических иммунных клеток

[00216] Антигенспецифические иммунные эффекторные клетки, обеспечиваемые способами и композициями отдельных аспектов, могут применяться в различных областях применения. Они включают, не ограничиваясь перечисленным, трансплантацию или имплантацию клеток in vivo; скрининг цитотоксических соединений, канцерогенов, факторов роста/регуляции мутагенов, фармацевтических соединений и т. д. in vitro; выяснение механизма гематологических заболеваний и повреждений; изучение механизма действия лекарственных средств и/или факторов роста; диагностику и наблюдение рака у пациента; генную терапию; и производство биологически активных продуктов, и это лишь некоторые из них.

Скрининг тестируемых соединений

[00217] Иммунные клетки согласно настоящему изобретению могут быть использованы для скрининга факторов (таких как растворители, низкомолекулярные лекарственные средства, пептиды и полинуклеотиды) или условий внешней среды (таких как условия культивирования или манипуляции), которые влияют на характеристики лимфоидных клеток, предложенных в настоящей заявке.

[00218] Конкретные применения скрининга согласно настоящему изобретению относятся к тестированию фармацевтических соединений в исследованиях лекарственных средств. Читателю рекомендуется обратиться к общим сведениям в стандартном учебнике In vitro Methods in Pharmaceutical Research, Academic Press, 1997, и патенту США № 5030015. В отдельных аспектах миелоидные и лимфоидные клетки играют роль тестируемых клеток для стандартного скрининга лекарственных средств и анализов токсичности, ранее проводимого на гемопоэтических клетках и предшественниках в молодой культуре. Оценка активности фармацевтических соединений-кандидатов обычно включает объединение гемопоэтических клеток или предшественников, предложенных в отдельных аспектах, с соединением-кандидатом, определение любого изменения морфологии, маркерного фенотипа или метаболической активности клеток, связанных с соединением (по сравнению с необработанными клетками или клетками, обработанными инертным соединением), а затем соотнесение действия соединения с наблюдаемым изменением. Скрининг может проводиться либо потому, что соединение предназначено для оказания фармакологического действия на гемопоэтические клетки или предшественники, либо потому, что соединение, предназначенное для оказания какого-либо иного действия, может оказывать нежелательное действие на гемопоэтические клетки или предшественники. Два или более лекарственных средства могут тестироваться в комбинации (путем объединения с клетками либо одновременно, либо последовательно) для обнаружения возможных эффектов межлекарственного взаимодействия.

Адоптивная клеточная терапия

[00219] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам иммунотерапии, включающим введение эффективного количества иммунных клеток согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления медицинское заболевание или расстройство лечат путем переноса популяции иммунных клеток, вызывающих иммунный ответ. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения рак или инфекцию лечат путем переноса популяции иммунных клеток, вызывающих иммунный ответ. В настоящей заявке предложены способы лечения или отсрочки прогрессирования рака у индивидуума, включающие введение индивидууму эффективного количества антигенспецифической клеточной терапии. Настоящие способы могут применяться для лечения иммунных нарушений, солидных раковых заболеваний, гематологических раковых заболеваний и вирусных инфекций.

[00220] Опухоли, для которых пригодны настоящие способы лечения, включают любые типы злокачественных клеток, такие как присутствующие в солидной опухоли или гематологической опухоли. Примеры солидных опухолей могут включать, не ограничиваясь перечисленным, опухоль органа, выбранного из группы, состоящей из поджелудочной железы, толстой кишки, слепой кишки, желудка, головного мозга, головы, шеи, яичника, почки, гортани, саркомы, легкого, мочевого пузыря, меланомы, предстательной железы и молочной железы. Примеры гематологических опухолей включают опухоли костного мозга, Т- или В-клеточные лейкозы, лейкозы, лимфомы, бластомы, миеломы и тому подобное. Дополнительные примеры раковых заболеваний, подлежащих лечению с использованием способов, предложенных в настоящей заявке, включают, не ограничиваясь перечисленным, рак легкого (включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточную карциному легкого), рак брюшины, рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта и стромальный рак желудочно-кишечного тракта), рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак ободочной и прямой кишки, рак эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, различные виды рака головы и шеи и меланому.

[00221] Рак может, например, иметь следующий гистологический тип, хотя он не ограничен перечисленным: новообразование, злокачественное; карцинома; карцинома, недифференцированная; гигантоклеточная и веретеноклеточная карцинома; мелкоклеточная карцинома; папиллярная карцинома; плоскоклеточная карцинома; лимфоэпителиальная карцинома; базально-клеточная карцинома; пиломатриксная карцинома; переходноклеточная карцинома; папиллярная переходноклеточная карцинома; аденокарцинома; гастринома, злокачественная; холангиокарцинома; гепатоклеточная карцинома; комбинированная гепатоклеточная карцинома и холангиокарцинома; трабекулярная аденокарцинома; аденокистозная карцинома; аденокарцинома в аденоматозном полипе; аденокарцинома, семейный коли-полипоз; солидная карцинома;

карциноидная опухоль, злокачественная; бронхиолоальвеолярная аденокарцинома; папиллярная аденокарцинома; хромофобная карцинома; ацидофильная карцинома; оксифильная аденокарцинома; базофильная карцинома; светлоклеточная аденокарцинома; гранулярно-клеточная карцинома; фолликулярная аденокарцинома; папиллярная и фолликулярная аденокарцинома; неинкапсулированная склерозирующая карцинома; карцинома коры надпочечников; эндометриоидная карцинома; карцинома из придатков кожи; апокринная аденокарцинома; сальная аденокарцинома; церуминозная аденокарцинома; мукоэпидермоидная карцинома; цистаденокарцинома; папиллярная цистаденокарцинома; папиллярная серозная цистаденокарцинома; муцинозная цистаденокарцинома; муцинозная аденокарцинома; перстневидноклеточная карцинома; инфильтративно-протоковая карцинома; медуллярная карцинома; лобулярная карцинома; воспалительная карцинома; болезнь Педжета, молочной железы; ацинарно-клеточная карцинома; аденосквамозная карцинома; аденокарцинома с плоскоклеточной метаплазией; тимома, злокачественная; стромальная опухоль яичника, злокачественная; текома, злокачественная; гранулезоклеточная опухоль, злокачественная; андробластома, злокачественная; карцинома из клеток Сертоли; опухоль из клеток Лейдига, злокачественная; липидно-клеточная опухоль, злокачественная; параганглиома, злокачественная; внегрудная параганглиома злокачественная; феохромоцитома; гломангиосаркома; злокачественная меланома; амеланотическая меланома; поверхностная распространяющаяся меланома; злокачественная лентиго-меланома; акральные лентигинозные меланомы; узелковые меланомы; злокачественная меланома в гигантских пигментированных невусах; эпителиоидно-клеточная меланома; голубой невус, злокачественный; саркома; фибросаркома; фиброзная гистиоцитома, злокачественная; миксосаркома; липосаркома; липосаркома; лейомиосаркома; рабдомиосаркома; эмбриональная рабдомиосаркома; альвеолярная рабдомиосаркома; стромальная саркома; смешанная опухоль, злокачественная; мюллеровская смешанная опухоль; нефробластома; гепатобластома; карциносаркома; мезенхимома, злокачественная; опухоль Бреннера, злокачественная; филлоидная цистосаркома, злокачественная; синовиальная саркома; мезотелиома, злокачественная; дисгерминома; эмбриональная карцинома; тератома, злокачественная; яичниковый зоб, злокачественный; хориокарцинома; мезонефрома, злокачественная; гемангиосаркома; гемангиоэндотелиома, злокачественная; саркома Капоши; гемангиоперицитома, злокачественная; лимфангиосаркома; остеосаркома; юкстакортикальная остеосаркома; хондросаркома; хондробластома, злокачественная; мезенхимальная хондросаркома; гигантоклеточная опухоль кости; саркома Юинга; одонтогенная опухоль, злокачественная; амелобластная одонтосаркома; амелобластома, злокачественная; амелобластная фибросаркома; пинеалома, злокачественная; хордома; глиома, злокачественная; эпендимома; астроцитома; протоплазматическая астроцитома; фибриллярная астроцитома; астробластома; глиобластома; олигодендроглиома; олигодендробластома; примитивная нейроэктодермальная опухоль; саркома мозжечка; ганглионейробластома; нейробластома; ретинобластома; ольфакторная нейрогенная

опухоль; менингиома, злокачественная; нейрофибросаркома; неврилеммома, злокачественная; зернистоклеточная опухоль, злокачественная; злокачественная лимфома; болезнь Ходжкина; Ходжкина; парагранулема; злокачественная лимфома, мелкая лимфоцитарная; злокачественная лимфома, крупноклеточная, диффузная; злокачественная лимфома, фолликулярная; грибовидный микоз; другие охарактеризованные неходжкинские лимфомы; В-клеточная лимфома; неходжкинская лимфома (НХЛ) низкой степени злокачественности/фолликулярная; мелкая лимфоцитарная (SL) НХЛ; НХЛ средней степени злокачественности/фолликулярная; диффузная НХЛ средней степени злокачественности; иммунобластная НХЛ высокой степени злокачественности; лимфобластная НХЛ высокой степени злокачественности; мелкоклеточная НХЛ с нерассеченными ядрами высокой степени злокачественности; массивная болезнь НХЛ; мантийноклеточная лимфома; СПИД-ассоциированная лимфома; макроглобулинемия Вальденстрема; злокачественный гистиоцитоз; множественная миелома; тучноклеточная саркома; иммунопролиферативные заболевания тонкой кишки; лейкоз; лимфолейкоз; лейкоз плазматических клеток; эритролейкоз; лейкоз из лимфосаркомных клеток; миелоидный лейкоз; базофильный лейкоз; эозинофильный лейкоз; моноцитарный лейкоз; лейкоз из тучных клеток; мегакариобластный лейкоз; миелоидная саркома; волосатоклеточный лейкоз; хронический лимфолейкоз (ХЛЛ); острый лимфобластный лейкоз (ALL); острый миелоидный лейкоз (ОМЛ); и хронический миелобластный лейкоз.

[00222] Чтобы определить пригодность клеток, предложенных в настоящей заявке, для терапевтического применения, клетки сначала можно протестировать на подходящей животной модели. На одном уровне клетки оценивают по их способности выживать и сохранять свой фенотип in vivo. Клетки, предложенные в настоящем документе, вводят иммунодефицитным животным (таким как мыши NOG или животным, ставшим иммунодефицитными в результате химического воздействия или облучения) в месте, поддающемся дальнейшему наблюдению, например под почечную капсулу, в селезенку, в дольку печени или в костный мозг. Ткани собирают по прошествии от нескольких дней до нескольких недель или более, и оценивают, присутствуют ли все еще исходные типы клеток, такие как эритроциты. Это может быть выполнено путем мечения вводимых клеток детектируемой меткой (такой как зеленый флуоресцентный белок или β-галактозидаза); или путем измерения конститутивного маркера, специфичного для вводимых человеческих клеток. Если клетки, предложенные в настоящей заявке, тестируют с помощью моделирования на грызунах, наличие и фенотип введенных клеток можно оценить с помощью иммуногистохимии или ELISA с использованием античеловеческих антител, или с помощью анализа ПЦР в реальном времени с использованием праймеров и условий гибридизации, обеспечивающих амплификацию, специфическую для человеческих полинуклеотидных последовательностей. Подходящие маркеры для оценки экспрессии генов на уровне мРНК или белка представлены в других разделах настоящей заявки.

[00223] Иммунные клетки, получаемыми способами согласно настоящему изобретению, могут быть тестированы на различных животных моделях на их способность лечить гематологические расстройства и повреждения. Например, мышиная модель серповидноклеточной анемии или Rag-2-нокаутная мышь с дефицитом T-/B-клеток могут быть особенно подходящими животными моделями для тестирования миелоидных и лимфоидных клеток, описанных в настоящей заявке.

[00224] Иммунные клетки, предложенные в отдельных аспектах настоящего изобретения, демонстрирующие желательные функциональные характеристики или эффективность на животных моделях, также могут быть подходящими для прямого введения нуждающимся в этом людям. В целях гемостаза клетки могут быть введены в любом месте, имеющем достаточный доступ к кровообращению. Гемопоэтические клетки или их предшественники также могут быть доставлены в место повреждения или заболевания.

[00225] Клетки, предложенные в отдельных аспектах настоящего изобретения, могут быть использованы для терапии любого субъекта, нуждающегося в этом. Состояния человека, которые могут подходить для такой терапии, включают различные анемии и гемоглобинопатии, а также заболевания, характеризующиеся снижением количества гемопоэтических клеток (такие как, например, миелодиспластический синдром, миелофиброз, нейтропения, агранулоцитоз, тромбастения Гланцмана, тромбоцитопения и синдром приобретенного иммунодефицита). Для терапии человека доза обычно составляет приблизительно от 10^9 до 10^{12} клеток и, как правило, приблизительно от 5×10^9 до 5×10^{10} клеток, в зависимости от массы тела субъекта, природы и тяжести поражения, а также способности к репликации вводимых клеток. Окончательная ответственность за определение режима лечения и подходящей дозы лежит на лечащем враче.

[00226] Терапевтически эффективные количества иммунных клеток могут быть введены несколькими способами, включая парентеральное введение, например, внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интрастернальную или внутрисуставную инъекцию, или инфузию.

[00227] Терапевтически эффективное количество иммунных клеток для применения в адоптивной клеточной терапии представляет собой такое количество, обеспечивающее достижение желаемого эффекта у субъекта, проходящего лечение. Например, это может быть количество иммунных клеток, необходимое для ингибирования развития или для регрессии аутоиммунного или аллоиммунного заболевания, или способное ослабить симптомы, вызванные аутоиммунным заболеванием, такие как боль и воспаление. Оно также может представлять собой количество, необходимое для облегчения симптомов, связанных с воспалением, таких как боль, отек и повышенная температура. Оно также может представлять собой количество, необходимое для уменьшения или предотвращения отторжения трансплантированного органа.

[00228] Популяцию иммунных клеток можно вводить в схемах лечения, соответствующих заболеванию, например, в виде одну или несколько доз в течение от одного до нескольких дней для улучшения состояния заболевания, или в виде периодических доз в течение продолжительного времени для ингибирования прогрессирования заболевания и предотвращения рецидива заболевания. Точная доза, которую следует использовать в препарате, также будет зависеть от способа введения и серьезности заболевания или расстройства, и ее следует выбирать в соответствии с мнением практикующего врача и спецификой каждого пациента. Терапевтически эффективное количество иммунных клеток будет зависеть от подлежащего лечению субъекта, серьезности и типа поражения, а также способа введения. В некоторых вариантах осуществления дозы, которые могут быть использованы при лечении людей, составлять от по меньшей мере $3{,}8\times10^4$, по меньшей мере $3{,}8\times10^5$, по меньшей мере $3{,}8\times10^6$, по меньшей мере $3{,}8\times10^7$, по меньшей мере $3{,}8\times10^8$, по меньшей мере $3{,}8\times10^9$ или по меньшей мере $3{,}8\times10^{10}$ иммунных клеток/м^2. В отдельном варианте осуществления доза, используемая при лечении людей, составляет от приблизительно 3.8×10^9 до приблизительно 3.8×10^{10} иммунных клеток/м^2. В дополнительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество иммунных клеток может составлять от приблизительно 5×10^6 клеток на кг массы тела до приблизительно $7{,}5\times10^8$ клеток на кг массы тела, например, от приблизительно 2×10^7 клеток до приблизительно 5×10^8 клеток на кг массы тела, или от приблизительно 5×10^7 клеток до приблизительно 2×10^8 клеток на кг массы тела. Специалист в данной области может легко определить точное количество иммунных клеток на основании возраста, массы тела, пола и физиологического состояния субъекта. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных из систем испытаний in vitro или на животных моделях.

[00229] Иммунные клетки могут быть введены в сочетании с одним или более другими терапевтическими агентами для лечения иммунообусловленного расстройства. Комбинированная терапия может включать, не ограничиваясь перечисленным, одно или более противомикробных средств (например, антибиотики, противовирусные средства и противогрибковые средства), противоопухолевых средств (например, фторурацил, метотрексат, паклитаксел, флударабин, этопозид, доксорубицин или винкристин), иммунодефицитных агентов (например, флударабин, этопозид, доксорубицин или винкристин), иммуносупрессантов (например, азатиоприн или глюкокортикоиды, такие как дексаметазон или преднизон), противовоспалительных средств (например, глюкокортикоиды, такие как гидрокортизон, дексаметазон или преднизон, или нестероидные противовоспалительные средства, такие как ацетилсалициловая кислота, ибупрофен или напроксена натрий), цитокинов (например, интерлейкин-10 или трансформирующий фактор роста бета), гормонов (для например, эстроген) или вакцину. Кроме того, могут быть введены иммуносупрессанты или толерогенные агенты, включая, не ограничиваясь перечисленным, ингибиторы кальциневрина (например, циклоспорин и такролимус); ингибиторы mTOR (например, рапамицин); мофетила микофенолят,

антитела (например, распознающие CD3, CD4, CD40, CD154, CD45, IVIG или B-клетки); химиотерапевтические средства (например, метотрексат, треосульфан, бусульфан); облучение; или хемокины, интерлейкины или их ингибиторы (например, BAFF, IL-2, анти-IL-2R, IL-4, ингибиторы JAK-киназы). Такие дополнительные фармацевтические агенты могут быть введены до, во время или после введения иммунных клеток, в зависимости от желаемого эффекта. Такое введение клеток и агента может осуществляться одним и тем же путем или разными путями, а также в одном и том же месте или в другом месте.

Фармацевтические композиции

[00230] В настоящей заявке также предложены фармацевтические композиции и препараты, содержащие иммунные клетки (например, Т-клетки или NK-клетки) и фармацевтически приемлемый носитель. Введение может быть аутологичным или неаутологичным. Например, Т-клетки и/или NK-клетки и содержащие их композиции могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому совместимому субъекту. Иммунные клетки согласно настоящему изобретению могут быть введены посредством местной инъекции, включая введение с помощью катетера, системной инъекции, местной инъекции, внутривенной инъекции или парентерального введения. При введении терапевтической композиции согласно настоящему изобретению ее обычно предоставляют в стандартной лекарственной форме для инъекций (например, растворе, суспензии, эмульсии).

[00231] Фармацевтические композиции и препараты, как описано в настоящей заявке, могут быть получены путем смешивания активных ингредиентов (таких как антитело или полипептид), имеющих желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012), в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают, не ограничиваясь перечисленным, буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; комплексообразующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлсодержащие комплексы (например, комплексы Zn-белок) и/или неионогенные ПАВ, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры фармацевтически

приемлемых носителей в настоящей заявке дополнительно включают агенты для диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, например, растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины PH-20 гиалуронидазы человека, например, rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и способы их применения, в том числе rHuPH20, описаны в публикациях заявок на патент США №№ 2005/0260186 и 2006/0104968. В одном из аспектов sHASEGP объединяют с одним или более дополнительными гликозаминогликаназами, например, хондроитиназами.

ПРИМЕРЫ

[00232] Следующие примеры включены для демонстрации вариантов осуществления изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что методики, раскрытые в нижеследующих примерах, представляют собой методы, которые, как было обнаружено авторами, надлежащим образом функционируют при реализации данного изобретения и, таким образом, могут считаться предпочтительными способами его реализации. Однако специалистам в данной области техники в свете данного описания должно быть ясно, что в конкретных описанных вариантах осуществления могут быть осуществлены многие изменения без отхода от сущности и объема изобретения с получением аналогичных или сходных результатов.

Пример 1 - Получение полученных из PSC T-/NK-клеток, экспрессирующих CAR к CD19

[00233] Для создания плюрипотентных стволовых клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор (CAR), использовали два отдельных способа. В одном способе не содержащие трансгенов PSC получали из T-клеток с использованием ретровирусных векторов для получения клеток 1C (US20160257939; полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки) или эписомальных векторов для получения клеток E11. Во втором способе PSC трансфицировали вектором экспрессии PiggyBac, кодирующим гены гемопоэтического программирования ETV2/ERG, GATA2 и HOXA9 (сконструированные H1 ESC с введенными DOX-индуцируемыми генами гемопоэтического программирования ETV2-GATA2-HOXA9), для получения клеток A16. Затем PSC, полученные обоими способами, генетически модифицировали для конститутивной экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) второго поколения к человеческому CD19, состоящего из домена scFv, полученного из mAb FMC63, связывающего человеческий CD19, костимулирующего домена CD28 и сигнального домена CD3ζ.

[00234] Немодифицированные и CAR-модифицированные PSC дифференцировали в $CD34^+$ предшественники T/NK посредством цитокин-направленной дифференцировки (1C, E11) или EGH-индуцированного программирования (A16) (ФИГ. 1A-B). Выделенные $CD34^+$ предшественники дополнительно дифференцировали в $CD3^+$ T- (1C, E11) и CD3-$CD56^+$ NK-клетки (A16), используя 4-недельную гипоксическую культуру на планшетах, покрытых DLL4/ретронектином, в StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies) с добавлением

аскорбиновой кислоты и фосфата магния (0,25 мМ), никотинамида (2 мМ) и цитокинов (SCF, TPO, FLT3L, IL-7, IL-2). В параллельно полученные культуры T-/NK-клеток в течение последних 2 недель дифференцировки добавляли обработанные митомицином C клетки Daudi (линия CD19+ B-лимфобластоидных клеток, отрицательных по HLA I класса, с дефицитом β2-микроглобулина) в качестве источника антиген (CD19)-специфической активации CAR. Генерированные T-/NK-клетки обозначали следующим образом: полученные из 1C- или E11 T-клетки - T, CAR-T, CAR-T/Ag (совместная культура Daudi); полученные из A16 NK-клетки - NK, CAR-NK, CAR-NK/Ag (совместная культура Daudi).

[00235] Экспрессию CAR на стадиях дифференцировки оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием окрашивания белком L. $CD3^+$ T-клетки совместно окрашивали лямбда-цепью мышиного mAb к человеческому CD3 (клон SP34-2). После дифференцировки в T-/NK-клетки экспрессия CAR была значительно подавлена, однако CAR-положительные T- и NK-клетки можно было избирательно размножать после активации культуры с помощью CAR-специфического антигена (Ag; совместная культура с $CD19^+$ клетками Daudi).

[00236] Цитотоксическую функцию полученных из PSC T- (1C) и NK-клеток (A16) оценивали с помощью анализа цитотоксичности in vitro с использованием экспрессирующих люциферазу $CD19^+$ клеток-мишеней Daudi и Raji. Мишени инкубировали с эффекторами T/NK в течение 24 часов в соотношении 1:1, и активность люциферазы количественно определяли в лизатах культуры с помощью системы анализа люциферазы Steady-Glo (Promega). Процент цитотоксичности рассчитывали по формуле: (1- (ET/T)) × 100, где ET - культура эффекторы+мишени, T - только мишени.

[00237] В то время как немодифицированные T-/NK-клетки не обладали какой-либо обнаруживаемой активностью, как CAR-экспрессирующие T- (1C), так и NK-клетки (A16) демонстрировали цитотоксичность по отношению к мишеням $CD19^+$. CAR-зависимая цитотоксическая активность значительно усиливалась после 2-недельного совместного культивирования T/NK с клетками-мишенями $CD19^+$ (Daudi) (вариант CAR/Ag) (ФИГ. 3A).

[00238] Цитолитический потенциал CAR-T-клеток был подтвержден путем подсчета клеток-мишеней в реальном времени с использованием системы анализа живых клеток Incucyte S3 (Essen Bioscience). Экспрессирующие GFP $CD19^+$ клетки-мишени Raji инкубировали с немодифицированными и трансфицированными CAR полученными из PSC (E11 TiPSC) T-клетками в соотношении 1:1. Покадровую визуализацию и подсчет клеток GFP^+ Raji проводили в течение 9 часов. Значительное уменьшение жизнеспособных (GFP^+) клеток Рвджи было обнаружено в культуре только с клетками CAR-T (ФИГ. 3B).

[00239] Клетки CAR-T, полученные в результате 2-недельной дифференцировки T/NK с последующим 1-недельным вызванным антителом к CD3 размножением культуры T-клеток из полученных из PSC (E11 TiPSC) $CD34^+$ HPC, инкубировали в течение 24

часов с клетками мышиной мастоцитомы P815, трансфицированными человеческим антигеном CD19 ($CD19^+$ P815), и нетрансфицированными P815 для оценки CAR-индуцированной и конститутивной продукции цитокинов, соответственно. Цитокины измеряли в супернатантах культуры с использованием мультиплексного анализа цитокинов с помощью проточной цитометрии LEGENDplex (BioLegend) (ФИГ. 4). CAR-T-клетки демонстрировали специфическую CAR-индуцированную продукцию IFNγ, TNFα, IL-2, IL-13 и ГМ-КСФ. Цитотоксические свойства полученных из PSC CAR-T-клеток также были подтверждены конститутивной секрецией гранзима B.

[00240] Чтобы проверить эффективность CAR-T-клеток in vivo, 8-недельным мышам NSG внутрибрюшинно (в/б) инъецировали 5×10^4 экспрессирующих люциферазу клеток Raji. На следующий день (1 день) инъецировали T- (полученные из 1C) и NK-клетки (полученные из A16) (в/б) в дозе 10^7/мышь. Инъекции T/NK повторяли на 3 и 5 день. Во время инъекций T/NK (1-5 дни) всем мышам дополнительно инъецировали (в/б) комбинацию цитокинов IL-2 и IL-15 (оба в дозе 500 нг/мышь). За прогрессированием опухолей у мышей наблюдали с помощью биолюминесцентной визуализации in vivo каждые 2 недели (ФИГ. 5A). Обезболенных мышей, которым инъецировали (в/б) 150 мг/кг люциферина InVivo-Glo (Promega), анализировали в течение 15 минут после введения люциферина с использованием устройства для визуализации Pearl Trilogy in vivo (LiCor). Кривые выживания для разных групп мышей, получавших полученные из PSC T- (1C) либо NK-клетки (A16), показаны на ФИГ. 5B.

[00241] Опухоли, обнаруженные через 2 недели, значительно уменьшились, и средняя выживаемость мышей была продлена в ~2 раза одним курсом лечения (3 инъекции с 2-дневными интервалами) CAR-экспрессирующими полученными из PSC T- или NK-клетками. Онколитический потенциал in vivo может быть значительно улучшен путем предварительного совместного культивирования CAR-экспрессирующих полученных из PSC T- или NK-клеток с антиген-положительными опухолевыми клетками in vitro.

Пример 2 - Способы направленной дифференцировки

[00242] <u>Дифференцировка PCS в $CD34^+$лимфогемопоэтические предшественники</u>: Полученные из T-клеток PSC из примера 1 (TiPSC 1C и E11, полученные из T-клеток периферической крови путем ретровирусного и эписомального перепрограммирования, соответственно) дифференцировали в $CD34^+$ гемопоэтические предшественники посредством культивирования суспензии агрегатов. PSC поддерживали в условиях без фидера на 6-луночных планшетах, покрытых Matrigel™ или витронектином в среде Essential 8 (E8). Агрегаты получали из субконфлюентных PSC (при <80% конфлюэнтности) с плотностью 0,5 миллиона клеток на мл в среде E8 с добавлением 2 мкМ CHIR99021 (ингибитор GSK-3) и 5 мкМ блеббистатина (ингибитор миозина II). Образование агрегатов проводили в течение 6 часов культивирования в колбах со сверхнизким прикреплением (ULA) при непрерывном перемешивании на качающейся платформе при 15-20 об/мин (включая все последующие стадии культивирования).

[00243] Культуру с предварительно образованными клеточными агрегатами постепенно переносили в бессывороточную среду для гемопоэтической дифференцировки (HDM: 50% IMDM, 50% среды Хэма F12, 100 мкг/мл поливинилового спирта, 100 мкг/мл рекомбинантного человеческого сывороточного альбумина, 1x добавки заменимых аминокислот (Invitrogen), 0,1x добавки липидов с химически определенным составом (Invitrogen), 125 мкМ магниевой соли аскорбиновой кислоты-2-фосфата, 0,25 мкМ линолевой кислоты, добавки микроэлементов A (0,3x), B (0,2x) и C (0,1x) (Corning), 5 мМ хлорида натрия, 100 мкМ монотиоглицерина, 20 мкМ этаноламина, 100 нг/мл гепарина и 10 нг/мл IGF1) с добавлением 2 мкМ CHIR99021, 50 нг/мл VEGF и 50 нг/мл FGF2 путем добавления равных объемов через 6 и 24 часа. На 2-й день клеточные агрегаты осаждали седиментацией в течение 15 минут, среду аспирировали и переносили культуры в HDM с добавлением цитокинов, индуцирующих гемопоэтическую мезодерму - 25 нг/мл BMP4, 50 мг/мл VEGF и 50 нг/мл FGF2. Культивирование продолжали в течение 3 дней с ежедневной полной сменой среды.

[00244] Для поддержания дифференцировки и размножения гемопоэтических $CD34^+$ предшественников клеточные агрегаты далее переносили в HDM с добавлением гемопоэтических поддерживающих цитокинов - 50 нг/мл SCF, 50 нг/мл TPO, 20 нг/мл FLT3L и 20 нг/мл IL-3. Культивирование продолжали в течение 3-5 дней с ежедневной полной сменой среды. Для улучшения процесса перехода в гемопоэтические клетки могут быть добавлены следующие усиливающие компоненты: IL-11 (5-20 нг/мл), 8Br-цАМФ (100-300 мкМ) и/или VEGF (20-50 нг/мл).

[00245] HPC, идентифицированные в суспензии как плавающие отдельные клетки или небольшие скопления, собирали после 2+3+3-5-дневного процесса дифференцировки (в общей сложности 8-10 дней). HPC выделяли путем фильтрации всей культуры дифференцировки через клеточные сита с размером ячеек 70 и 30 мкм (Corning). HCP, собранные из фильтрата путем центрифугирования, однократно промывали в HDM и повторно суспендировали в TCDM (среда для Т-клеточной дифференцировки). Для обогащения HPC потенциалом дифференцировки в T/NK может быть проведено выделение фракции $CD34^+$ HPC с помощью магнитно-активированной сортировки клеток (MACS) с использованием прямых микрогранул CD34 (Myltenyi Biotec) в соответствии с рекомендациями производителя. HPC высевали на культуры для дифференцировки T/NK или криоконсервировали для последующего использования в течение 1 часа после выделения.

[00246] <u>Культуры для дифференцировки T/NK</u>: Для дифференцировки в T/NK обработанные пластиковые планшеты для нетканевой культуры покрывали химерным белком лиганда Notch hDLL4-Fc и ретронектином, разведенным в PBS (по 0,5 мкг/см^2 каждого). Перед посевом клеток раствор для нанесения покрытия аспирировали, планшеты промывали один раз PBS и заполняли 0,25 мл/см^2 среды для Т-клеточной дифференцировки (TCDM), состоящей из StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies), GlutaMax (1/100), аскорбиновой кислоты и фосфата магния (250 мкМ), никотинамида (2

мМ) и цитокинов SCF, TPO, FLT3L и IL7 (по 50 нг/мл каждого). Полученные из PSC HPC высевали с плотностью 5000 клеток/см^2 и культивировали в условиях гипоксии (5% O_2) в CO_2-инкубаторе в течение 2 недель с добавлением равного объема культуры TCDM на 3-й день и заменой половины объема культуры через день. Все дифференцированные клетки собирали путем осторожного повторного суспендирования и сбора неприкрепленных клеток с последующим сбором плохо прикрепленных клеток в течение 5-10 минут обработки PBS-ЭДТА (0,5 мМ). Чтобы продолжить процесс дифференцировки и улучшить выход T-/NK-клеток, дифференцировочное культивирование T-клеток может быть проведено повторно путем пересеивания собранных клеток в свежеприготовленные планшеты с DLL4/ретронектином с плотностью 10000 клеток/см^2 до достижения желаемого выхода клеток T-/NK-клеток. Эффективность дифференцировки в T/NK также может быть улучшена путем добавления к TCDM следующих усиливающих компонентов: CHIR99021 (1-3 мкМ), IL-2 (2-10 нг/мл), IL-12 (10-50 нг/мл).

[00247] Культуры для размножения T-клеток: Для размножения T-клеток обработанные планшеты для нетканевой культуры покрывали mAb к CD3 (клон OKT3), hDLL4-Fc и ретронектином, разведенным в PBS (по 0,5 мкг/см^2 каждого). Перед посевом клеток раствор для нанесения покрытия аспирировали, планшеты промывали один раз PBS и заполняли 0,25 мл/см^2 среды для размножения T-клеток (TCDM), состоящей из StemSpan SFEM (Stem Cell Technologies), Glutamax (1/100), аскорбиновой кислоты и фосфата магния (250 мкМ), никотинамида (2 мМ) и цитокинов SCF, TPO, FLT3L, IL7 (по 50 нг/мл каждого) и IL2, IL15 (по 10 нг/мл каждого). Для улучшения размножения также может быть добавлен IL-21 (5-20 нг/мл). Клетки, собранные из культур дифференцировки в T/NK, высевали с плотностью 10000 клеток/см^2 и культивировали в условиях гипоксии (5% O_2) в CO_2-инкубаторе в течение вплоть до 2 недель с добавлением равного объема культуры TCEM на 3-й день и заменой половины объема культуры через день. Размноженные T-клетки собирали путем осторожного повторного суспендирования и сбора неприкрепленных клеток.

Пример 3 - Характеристика способа направленной дифференцировки

[00248] PSC сначала дифференцировали в CD34$^+$ HPC в суспензионной культуре с клеточными агрегатами посредством последовательных стадий WNT-индуцированной подготовки к дифференцировке, индукции мезодермы и дифференцировки HPC в течение 8-10 дней (ФИГ. 1B). Фракцию HPC выделяли фильтрацией. Сортировку с помощью MAC по CD34$^+$ HPC не проводили, хотя при желании ее можно провести с использованием прямых парамагнитных гранул с CD34 (Myltenyi Biotec). Затем HPC переносили на планшеты, покрытые человеческим DLL4-Fc$^+$ ретронектином, для дифференцировки в T/NK в течение 2-4 недель. T-клетки можно дополнительно размножать в течение 1-2 недель в культуре на планшетах, покрытых mAb к CD3 (клон OKT3).

[00249] Полученные из PSC (1C TiPSC) CD34$^+$ клетки через 2 недели в условиях дифференцировки в T/NK образовывали типичную популяцию лимфоидных клеток, определяемую низкими параметрами FSC/SSC (ФИГ. 1D, левая точечная диаграмма). Эта

лимфоидная популяция содержала в основном $CD3^+$ T и $CD56^+CD3^-$ NK-клетки (ФИГ. 1D, точечная диаграмма посередине). Популяция Т-клеток включала $CD4^+$ и $CD8^+$ одно- и двойные положительные клетки, а также значительную долю двойных отрицательных клеток (ФИГ. 1D, правая точечная диаграмма).

[00250] Выходы каждого соответствующего типа клеток рассчитывали как отношение полученных абсолютных количеств клеток к исходным на каждой стадии получения клеток. Например, выход 1,5 CD34+HPC указывает на то, что в среднем 1,5 (полученное количество) $CD34^+$ HPC может быть получено из 1 (исходное количество) PSC. Соответственно, выход 102 Т-клеток указывает на то, что 102 (полученное количество) Т-клеток может быть получено из 1 (исходное количество) $CD34^+$ HPC (ФИГ. 1E).

[00251] Полученные из PSC (1C TiPSC) Т-клетки ($CD3^+$), дифференцированные и размноженные в течение 4 недель, экспрессировали α/β TCR (не γ/δ или инвариантный Vα24 NKT TCR) и типичные маркеры Т-клеток CD5, CD27 и CD7 (ФИГ. 1F). Они также экспрессировали маркеры, ассоциированные с цитотоксическими Т-/NK-клетками (CD161, CD94), и маркеры активации (CD69).

[00252] Иммобилизованные антитела к CD3 (iCD3) были минимально необходимы и достаточны для достижения размножения полученных из PSC Т-клеток (ФИГ. 1G, гистограмма). Стимуляция в растворе с помощью mAb к CD3 и к CD28 (sCD3, sCD28) не была эффективной ни по отдельности, ни в комбинации ($sCD3^+sCD28$), ни при добавлении к iCD3 ($iCD3^+sCD28$). Т-клетки, пролиферирующие в культуре для размножения, приобретают характерную морфологию лимфобластов неправильной формы (ФИГ. 1G, фотография). В отличие от относительно гетерогенной популяции исходных клеток, клетки, собранные после 2-недельного размножения Т-клеток, были по существу чистыми $CD3^+$ Т-клетками, которые также экспрессировали CD56 и приобретали экспрессию CD8 (ФИГ. 1G, точечные диаграммы проточной цитометрии). Таким образом, способ направленной дифференцировки позволяет эффективно получать Т-клетки.

[00253] Все способы, раскрытые и заявленные в настоящей заявке, могут быть получены и выполнены без проведения излишних экспериментов в свете настоящего раскрытия. Хотя композиции и способы согласно настоящему изобретению были описаны с точки зрения предпочтительных вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что способы, а также стадии или последовательность стадий способов, описанных в настоящей заявке, могут включать вариации без отступления от концепции, сущности и объема изобретения. Более конкретно, будет очевидно, что некоторые агенты, которые являются как химически, так и физиологически родственными, могут быть заменены агентами, описанными в настоящем документе, и при этом будут достигнуты одинаковые или схожие результаты. Все таковые схожие замены и модификации, очевидные для специалистов в данной области техники, считаются находящимися в пределах сущности, объема и концепции изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения.

СПИСОК ЦИТИРУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

Следующие цитируемые источники в той степени, в которой они описывают примеры методик или другие подробности, дополняющие приведенные в настоящей заявке, специально включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Akkina et al., J. Virol., 70:2581-2585, 1996.

Alexander et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5092-5096,1988.

Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., MA, 1996.

Biswas et al., Annals NY Acad. Sci., 590:582-583, 1990.

Biswas, et al., J. Clin. Microbiol., 29:2228-2233, 1991.

Blomer et al., J. Virol., 71(9):6641-6649, 1997.

Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987.

Chen et al., Nature Methods 8:424-429, 2011.

Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988.

Doulatov et al., Cell Stem Cell. 10:120-36, 2012.

Ercolani et al., J. Biol. Chem., 263:15335-15341,1988.

Evans, et al., In: Cancer Principles and Practice of Oncology, Devita et al. (Eds.), Lippincot-Raven, NY, 1054-1087, 1997.

Fechheimer et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.

Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.

Frisan et al., Epstein-Barr Virus Protocols, Part III, 125-127, 2001

Furie and Furie, Cell 53: 505-518, 1988.

Graham and Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.

Публикация международной заявки № WO 2007/069666

Публикация международной заявки № PCT/US2016/057893

Публикация международной заявки № PCT/US2016/057899

Публикация международной заявки № WO 94/09699

Публикация международной заявки № WO 95/06128

Публикация международной заявки № WO 96/39487

Jores et al., PNAS U.S.A. 87:9138, 1990.

Kaeppler et al., Plant Cell Reports 9: 415418, 1990.

Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989.

Karin et al. Cell, 36:371-379,1989.

Kato et al, J. Biol. Chem., 266:33613364, 1991.

Kim et al., J. Virol., 66:3879-3882, 1992.

Knust et al, EMBO J. 761-766, 1987.

Ladi et al., Nature Immunology, 7: 338-343, 2006.

Langle-Rouault et al., J. Virol., 72(7):6181-6185, 1998.

Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003.

Levitskaya et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23):12616-12621, 1997.

Linnemann, C. et al. Nat Med 21, 81-85, 2015.

Ludwig et al., Nat. Biotechnol., 24(2):185-187, 2006b.

Ludwig et al., Nat. Methods, 3(8):637-46, 2006a.

Macejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.

Maniatis, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988.

Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983.

Nabel et al., Science, 244(4910):1342-1344, 1989.

Naldini et al., Science, 272(5259):263-267, 1996.Zufferey et al., Nat. Biotechnol., 15(9):871-875,

Ng, Nuc. Acid Res., 17:601-615, 1989.

Nicola, et al., Blood, 54:614-627, 1979.

Nicolas and Rubenstein, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Lab. Press, 2001.

Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988.

Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721:185-190, 1982.

Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176, 1987.

Notta et al., Science, 218-221, 2011.

Paskind et al., Virology, 67:242-248, 1975.

Публикация патента № EP1507865

Pelletier and Sonenberg, Nature, 334(6180):320-325, 1988.

Potrykus et al., Mol. Gen. Genet**., 199(2):**169-177, 1985.

Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161-7165, 1984.

Quitsche et al., J. Biol. Chem., 264:9539-9545, 1989.

Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012.

Reubinoff et al., Nat. Biotechnol., 18:399-404, 2000.

Richards et al., Cell, 37:263-272, 1984.

Rippe, et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990.

Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. Cold Spring Harbor 1997.

Suzuki et al, EMBO J. 6:1891-1897, 1987.

Takahashi et al., Cell, 131:861-872, 2007.

Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), NY, Plenum Press, 149-188, 1986.

Thomson and Marshall, Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165, 1998.

Thomson and Odorico, J. Trends. Biotechnol., 18:53-57, 2000.

Thomson et al. Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 92:7844-7848, 1995.

Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718, 1986.

Заявка на патент США № 08/464,599

Заявка на патент США № 12/715,136

Заявка на патент США № 61/088,054

Патент США № 4683202
Патент США № 5030015
Патент США № 5302523
Патент США № 5322783
Патент США № 5384253
Патент США № 5464765
Патент США № 5486359
Патент США № 5538877
Патент США № 5538880
Патент США № 5550318
Патент США № 5556954
Патент США № 5563055
Патент США № 5580859
Патент США № 5589466
Патент США № 5591616
Патент США № 5610042
Патент США № 5656610
Патент США № 5702932
Патент США № 5736524
Патент США № 5780448
Патент США № 5789215
Патент США № 5843780
Патент США № 5843780
Патент США № 5928906
Патент США № 5945100
Патент США № 5981274
Патент США № 5994136
Патент США № 5994624
Патент США № 6013516
Патент США № 6200806
Патент США № 6225042
Патент США № 6355479
Патент США № 6362001
Патент США № 6544518
Патент США № 6790662
Патент США № 7029913
Патент США № 8058065
Патент США № 8129187
Патент США № 8268620
Патент США № 8268620

Патент США № 8372642
Патент США № 8741648
Публикация заявки на патент США № 20020055144
Публикация заявки на патент США № 20050260186
Публикация заявки на патент США № 20060104968
Публикация заявки на патент США № 20090148425
Публикация заявки на патент США № 20090246875
Публикация заявки на патент США № 2010/0210014
Публикация заявки на патент США № 20120276636
Публикация заявки на патент США № 2014/0315304
Публикация заявки на патент США № 20160257939
Wilson et al., Nature Reviews Immunology, 9: 91-105, 2009.
Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989.
Wong et al., Gene, 10:8794, 1980.
Wynn, Nature Immunology, 6:1069-1070, 2005.
Xu et al., Nat. Biotechnol., 19:971-974, 2001.
Yamanaka et al., Cell, 131(5):861-72, 2007.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, включающий:

(a) конструирование плюрипотентных стволовых клеток (PSC) для экспрессии химерного антигенного рецептора (CAR) с получением таким образом CAR-PSC;

(b) дифференцировку или прямое программирование CAR-PSC в $CD34^+$ гемопоэтические клетки-предшественники (HPC);

(c) дальнейшую дифференцировку $CD34^+$ HPC в Т-клетки и/или NK-клетки; и

(d) размножение Т-клеток и/или NK-клеток, включающее совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями с получением таким образом антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток.

2. Способ по п. 1, где PSC на стадии (a) представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) или эмбриональные стволовые клетки (ESC).

3. Способ по п. 2, где iPSC перепрограммированы из Т-клеток.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где стадия (b) включает проведение направленной дифференцировки.

5. Способ по п. 4, где направленная дифференцировка включает:

(a) образование эмбриоидных телец (EB) в присутствии блеббистатина, ингибитора GSK-3, FGF2 и VEGF;

(b) приведение EB в контакт с BMP-4, VEGF и FGF2 для стимуляции индукции мезодермы; и

(c) дифференцировку EB в присутствии лиганда Flt-3, IL-3, SCF и TPO с получением таким образом HPC.

6. Способ по п. 5, где дифференцировка согласно стадии (c) по существу не включает BMP4.

7. Способ по п. 5, где дифференцировка согласно стадии (c) не включает BMP4.

8. Способ по п. 5, где дифференцировка согласно стадии (c) дополнительно включает присутствие IL-11, цАМФ и/или VEGF.

9. Способ по п. 5, где дифференцировка согласно стадии (c) дополнительно включает присутствие IL-11, цАМФ и VEGF.

10. Способ по п. 5, где ингибитор GSK-3 представляет собой CHIR99021.

11. Способ по п. 4, где направленная дифференцировка включает:

(a) культивирование одиночных PSC на поверхности, покрытой амином, в присутствии блеббистатина, BMP4, VEGF и bFGF;

(b) инициирование дифференцировки путем приведения PSC в контакт с BMP-4, VEGF и FGF2; и

(c) дальнейшую дифференцировку PSC в присутствии лиганда Flt-3, IL-3, IL-6, SCF и TPO и гепарина с получением таким образом HPC,

причем указанный способ не включает образование EB.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где PSC по существу не содержат трансгенов.

13. Способ по п. 12, где PSC являются человеческими.

14. Способ по п. 1 или п. 3, где Т-клетки представляют собой $CD4^+$ Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки, цитотоксические Т-клетки, регуляторные Т-клетки, естественные киллерные Т-клетки, наивные Т-клетки, Т-клетки памяти или гамма-дельта Т-клетки.

15. Способ по п. 1, где PSC на стадии (a) дополнительно конструируют для экспрессии ERG/ETV2, GATA2 и HOXA9 под контролем одного индуцибельного промотора.

16. Способ по п. 15, дополнительно включающий конструирование PSC для экспрессии HMGA2, MYCN, NR4A2, SOX17, TFEC, MEIS1 и HOXA4.

17. Способ по п. 15 или п. 16, где программирование согласно стадии (b) включает индукцию экспрессии ERG/ETV2, GATA2 и HOXA9 в течение периода времени, достаточного для получения HPC, и прекращение индукции экспрессии до начала стадии (c).

18. Способ по п. 1, включающий культивирование клеток в определенных условиях без фидера.

19. Способ по п. 1, где стадия (b) дополнительно включает отбор клеток, экспрессирующих CD34 и CD43, перед дифференцировкой в антигенспецифические Т-клетки и/или NK-клетки.

20. Способ по п. 19, где отбор включает проведение магнитно-активированной сортировки клеток (MACS).

21. Способ по п. 19, где клетки, экспрессирующие CD34 и CD43, составляют по меньшей мере 35 процентов от общей популяции клеток.

22. Способ по п. 19, где клетки, экспрессирующие CD34 и CD43, составляют по меньшей мере 65 процентов от общей популяции клеток.

23. Способ по п. 1, где по меньшей мере 5 процентов HPC экспрессируют CAR.

24. Способ по п. 1, где по меньшей мере 10 процентов HPC экспрессируют CAR.

25. Способ по п. 1, где по меньшей мере 15 процентов HPC экспрессируют CAR.

26. Способ по п. 1, где дифференцировка согласно стадии (c) включает культивирование HPC на поверхности, покрытой ретронектином и Notch DLL-4, в присутствии аскорбиновой кислоты и никотинамида в условиях гипоксии.

27. Способ по п. 26, где культура дополнительно содержит SCF, лиганд FLT-3, TPO и IL-7.

28. Способ по п. 27, где культура дополнительно содержит ингибитор GSK-3, IL-2 и/или IL-12.

29. Способ по п. 27, где культура дополнительно содержит ингибитор GSK-3, IL-2 и IL-12.

30. Способ по п. 1, где размножение согласно стадии (d) дополнительно включает культивирование антигенспецифических Т-клеток в присутствии антитела к CD3, IL-2 и IL-15.

31. Способ по п. 1, где размножение согласно стадии (d) дополнительно включает

культивирование антигенспецифических Т-клеток в присутствии антитела к CD3, IL-2, IL-15 и IL-21.

32. Способ по п. 1, где размножение согласно стадии (d) дополнительно включает культивирование антигенспецифических Т-клеток в присутствии антитела к CD3, лиганда FLT3, IL-7, IL-2, IL-15 и/или IL-21.

33. Способ по п. 33, где размножение согласно стадии (d) дополнительно включает один или два дополнительных компонента, выбранных из группы, состоящей из SCF и TPO.

34. Способ по п. 26, где по меньшей мере 1,5 процента дифференцированных $CD34^+$ HPC представляют собой $CD3^+CAR^+$ Т-клетки.

35. Способ по п. 26, где по меньшей мере 2 процента дифференцированных $CD34^+$ HPC представляют собой $CD3^-CAR^+$ NK-клетки.

36. Способ по п. 30, где по меньшей мере 2 процента размноженных $CD34^+$ HPC представляют собой $CD3^+CAR^+$ Т-клетки.

37. Способ по п. 26, где по меньшей мере 10 процентов размноженных $CD34^+$ HPC представляют собой $CD3^-CAR^+$ NK-клетки.

38. Способ по п. 1, где CAR и антигенспецифические клетки-мишени нацелены на один и тот же антиген.

39. Способ по п. 38, где антиген представляет собой CD19.

40. Способ по п. 1, где антигенспецифические клетки-мишени представляют собой опухолевые клетки.

41. Способ по п. 1, где антигенспецифические клетки-мишени являются человеческими.

42. Способ по любому из пп. 38-41, где антигенспецифические клетки-мишени являются отрицательными по HLA I класса.

43. Способ по п. 42, где по меньшей мере 5 процентов антигенспецифических эффекторных Т-клеток проявляют цитотоксическую активность против клеток-мишеней.

44. Способ по п. 42, где по меньшей мере 40 процентов антигенспецифичных эффекторных NK-клеток проявляют цитотоксическую активность против клеток-мишеней.

45. Способ по п. 1, где CAR кодируется ДНК, интегрированной в геном PSC.

46. Способ по п. 1, где CAR содержит внутриклеточный сигнальный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающую область.

47. Способ по п. 46, где внутриклеточные сигнальные домены содержат CD3ζ и CD28.

48. Способ по п. 46, где антигенсвязывающая область представляет собой F(ab')2, Fab', Fab, Fv или scFv.

49. Способ по п. 1, где PSC являются HLA-гомозиготными.

50. Способ по п. 49, где HLA-гомозиготные PSC являются гомозиготными по

одному или более из аллелей локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP или HLA-DQ.

51. Способ по п. 49, где HLA-гомозиготные PSC являются гомозиготными по двум из аллелей локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DR, HLA-DP или HLA-DQ.

52. Способ по п. 51, где HLA-гомозиготные PSC являются гомозиготными по HLA-A и HLA-B.

53. Способ по п. 49, где HLA-гомозиготные PSC являются гомозиготными по HLA-A, HLA-B и HLA-C.

54. Способ получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, включающий:

(a) конструирование PSC для экспрессии CAR с получением таким образом CAR-PSC;

(b) культивирование CAR-PSC в присутствии блеббистатина, ингибитора GSK-3, FGF2 и VEGF с образованием таким образом EB;

(c) приведение EB в контакт с BMP-4, VEGF и FGF2, для стимуляции индукции мезодермы;

(d) дифференцировку EB в присутствии лиганда Flt-3, IL-3, SCF и TPO с получением таким образом $CD34^+$ HPC;

(e) дальнейшую дифференцировку $CD34^+$ HPC в Т-клетки и/или NK-клетки; и

(f) размножение Т-клеток и/или NK-клеток, включающее совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями с получением таким образом антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток.

55. Способ по п. 54, где ингибитор GSK-3 представляет собой CHIR99021.

56. Способ получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, включающий:

(a) конструирование PSC для экспрессии CAR с получением таким образом CAR-PSC;

(b) культивирование одиночных CAR-PSC на поверхности, покрытой амином, в присутствии блеббистатина, BMP4, VEGF и bFGF;

(c) инициирование дифференцировки путем приведения CAR-PSC в контакт с BMP-4, VEGF и FGF2;

(d) дальнейшую дифференцировку CAR-PSC в присутствии лиганда Flt-3, IL-3, IL-6, SCF и TPO и гепарина с получением таким образом HPC,

(e) дифференцировку HPC в Т-клетки и/или NK-клетки; и

(f) размножение Т-клеток и/или NK-клеток, включающее совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями с получением таким образом антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток,

причем указанный способ не включает образование EB.

57. Способ получения антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, включающий:

(a) конструирование PSC для экспрессии CAR с получением таким образом CAR-PSC;

(b) дифференцировку CAR-PSC в $CD34^+$ HPC;

(c) отбор $CD34^+CD43^+$ HPC;

(d) дальнейшую дифференцировку $CD34^+CD43^+$ HPC в Т-клетки и/или NK-клетки; и

(e) размножение Т-клеток и/или NK-клеток, включающее совместное культивирование с антигенспецифическими клетками-мишенями с получением таким образом антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток.

58. Популяция антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, полученных по любому из пп. 1-57.

59. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенспецифические эффекторные Т-клетки и/или NK-клетки, полученные по любому из пп. 1-57.

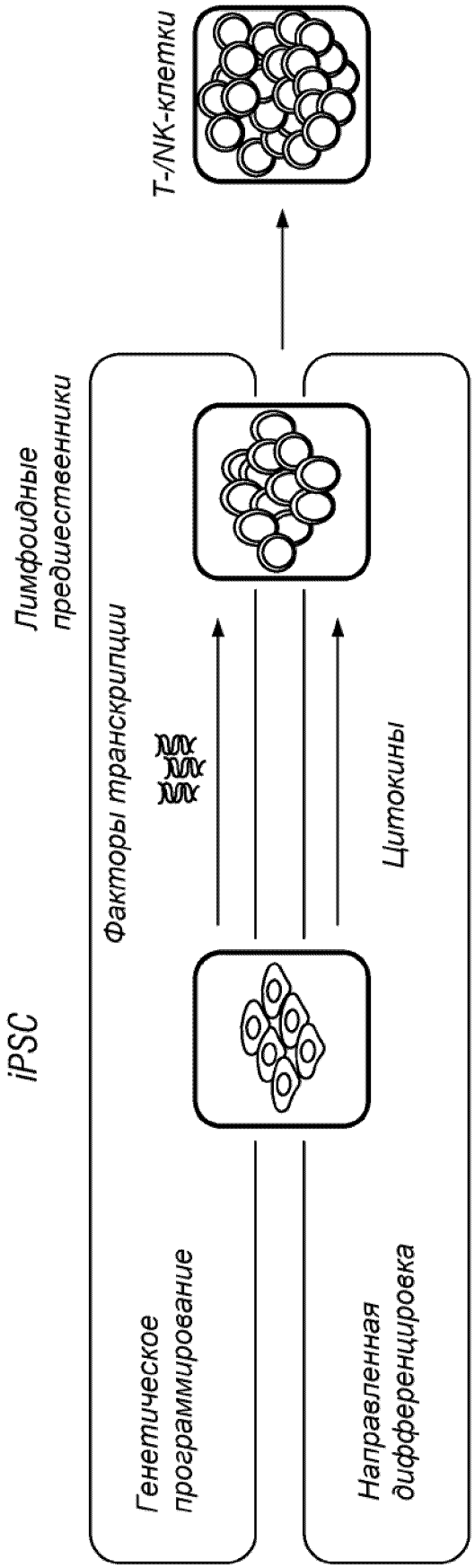
60. Композиция, содержащая антигенспецифические эффекторные Т-клетки и/или NK-клетки, полученные по любому из пп. 1-57, для лечения рака у субъекта.

61. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества антигенспецифических эффекторных Т-клеток и/или NK-клеток, полученных по любому из пп. 1-58.

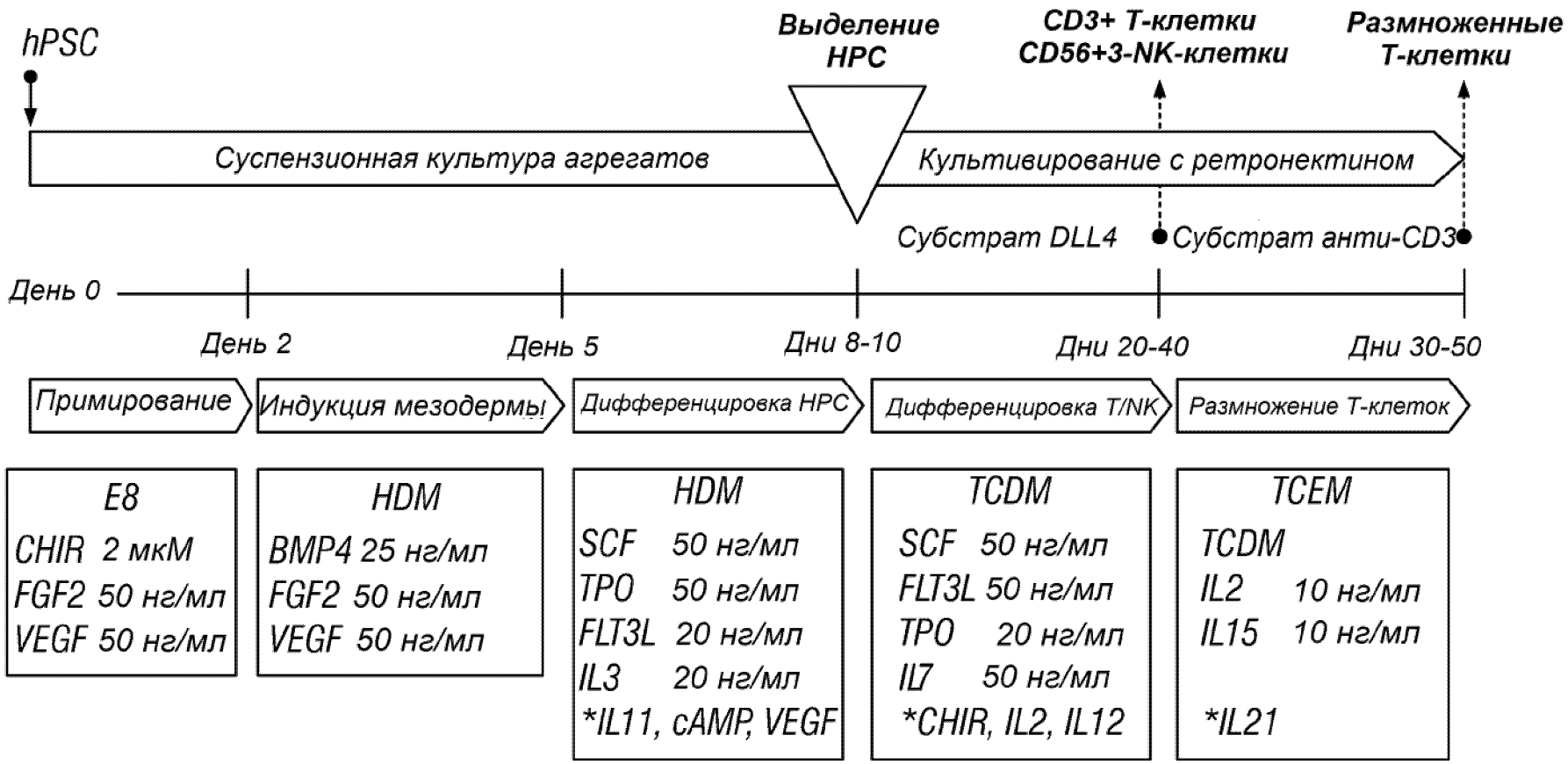
62. Способ по п. 61, где рак экспрессирует опухолевый антиген, и антигенспецифические эффекторные Т-клетки и/или NK-клетки нацелены на указанный опухолевый антиген.

63. Способ по п. 61, где субъект представляет собой человека.

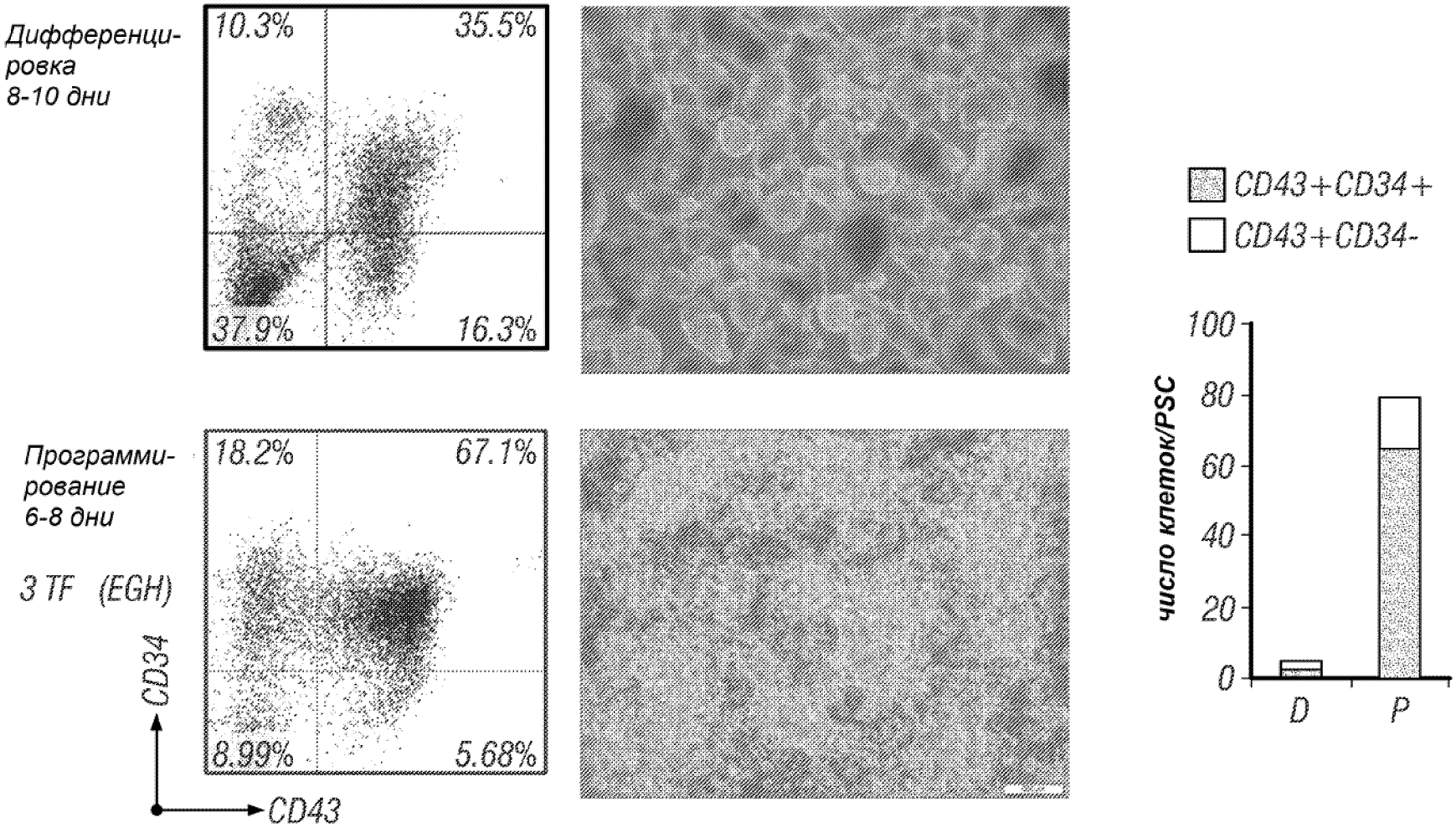
По доверенности


iPSC
Генетическое программирование
Направленная дифференцировка
Факторы транскрипции
Цитокины
Лимфоидные предшественники
T-/NK-клетки

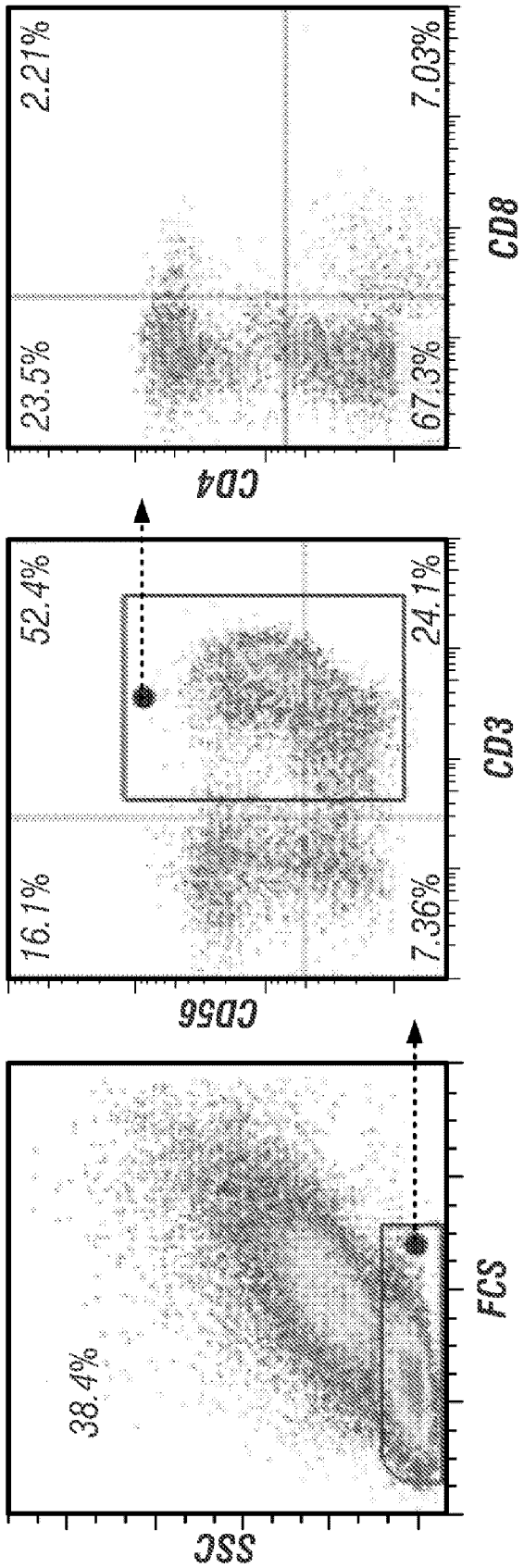
Фиг. 1A


hPSC
Выделение HPC
CD3+ Т-клетки
CD56+3-NK-клетки
Размноженные Т-клетки
Суспензионная культура агрегатов
Культивирование с ретронектином
Субстрат DLL4
Субстрат анти-CD3
День 0
День 2
День 5
Дни 8-10
Дни 20-40
Дни 30-50
Примирование
Индукция мезодермы
Дифференцировка HPC
Дифференцировка T/NK
Размножение Т-клеток
E8
CHIR 2 мкМ
FGF2 50 нг/мл
VEGF 50 нг/мл
HDM
BMP4 25 нг/мл
FGF2 50 нг/мл
VEGF 50 нг/мл
HDM
SCF 50 нг/мл
TPO 50 нг/мл
FLT3L 20 нг/мл
IL3 20 нг/мл
*IL11, cAMP, VEGF
TCDM
SCF 50 нг/мл
FLT3L 50 нг/мл
TPO 20 нг/мл
IL7 50 нг/мл
*CHIR, IL2, IL12
TCEM
TCDM
IL2 10 нг/мл
IL15 10 нг/мл
*IL21

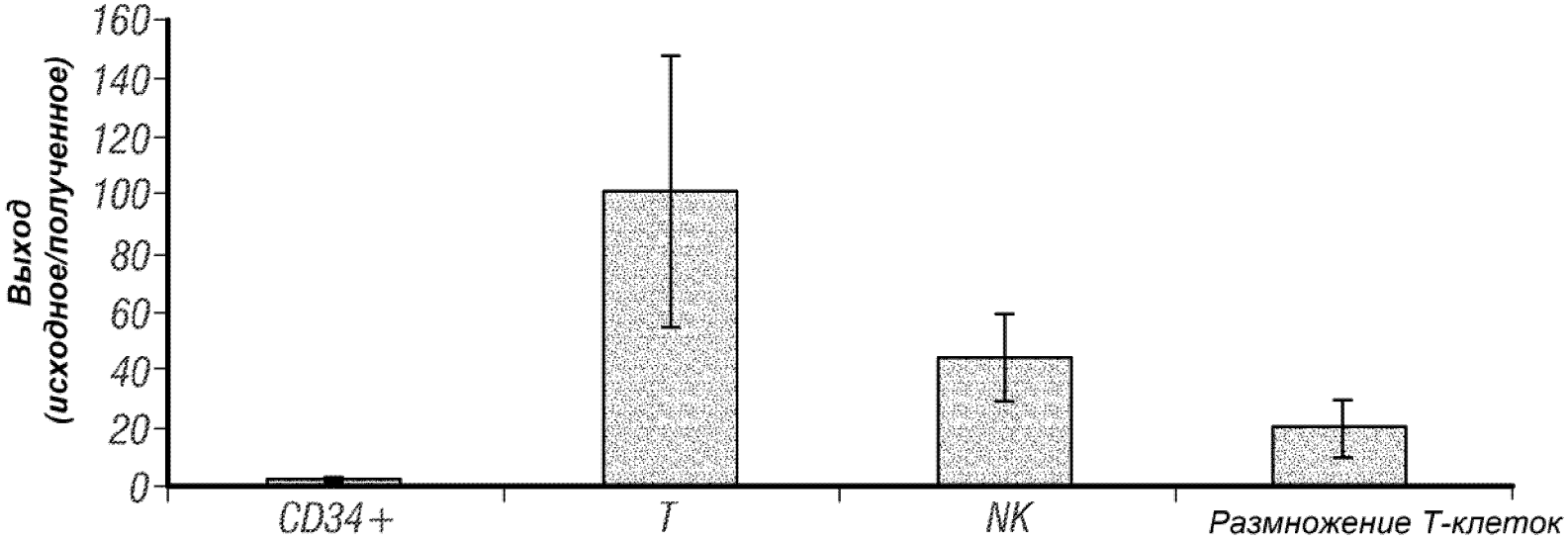
Фиг. 1B


Дифференцировка 8-10 дни
10.3%
35.5%
37.9%
16.3%
Программирование 6-8 дни
3 TF (EGH)
18.2%
67.1%
8.99%
5.68%
CD34
CD43
CD43+CD34+
CD43+CD34-
число клеток/PSC
100
80
60
40
20
0
D
P

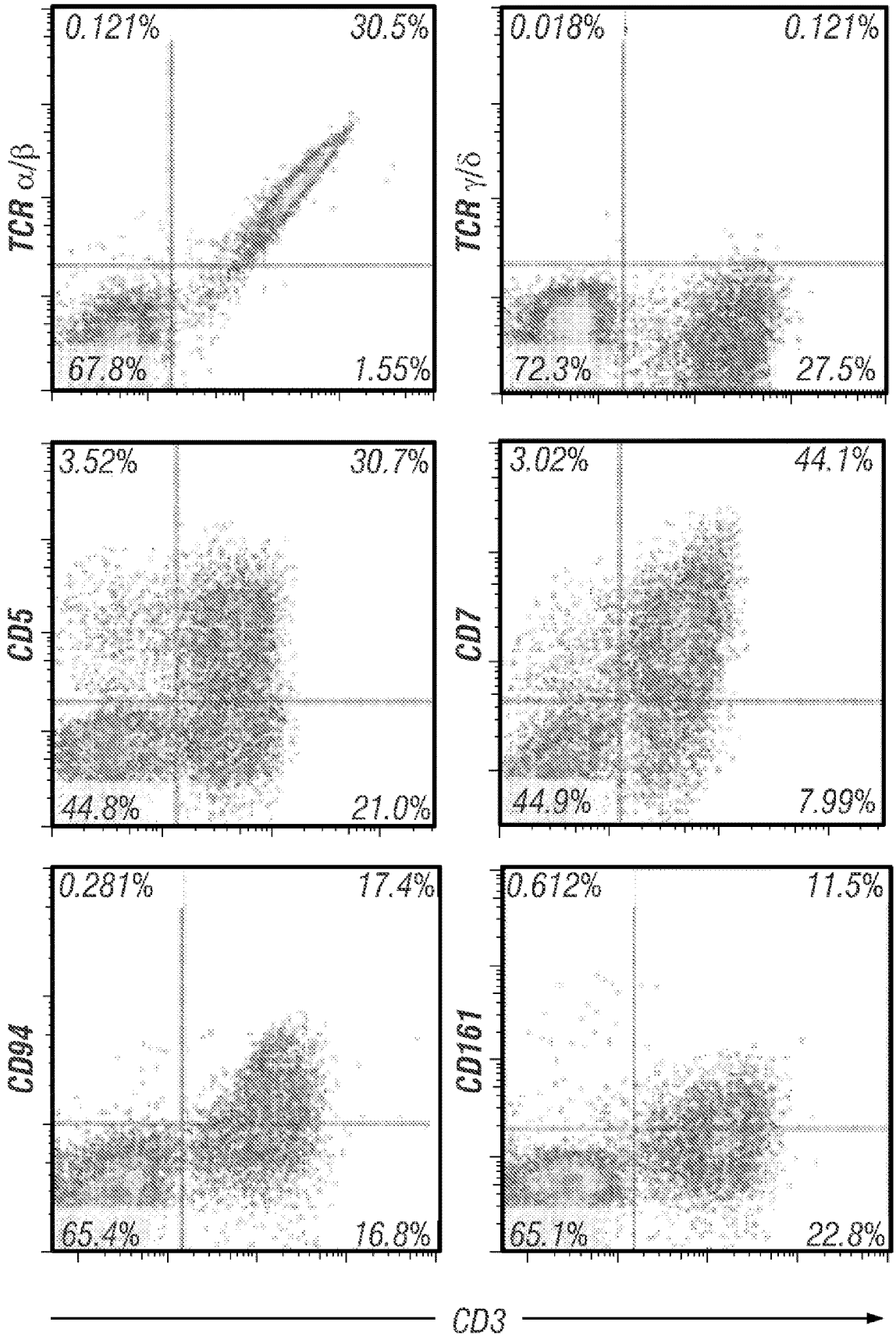
Фиг. 1С



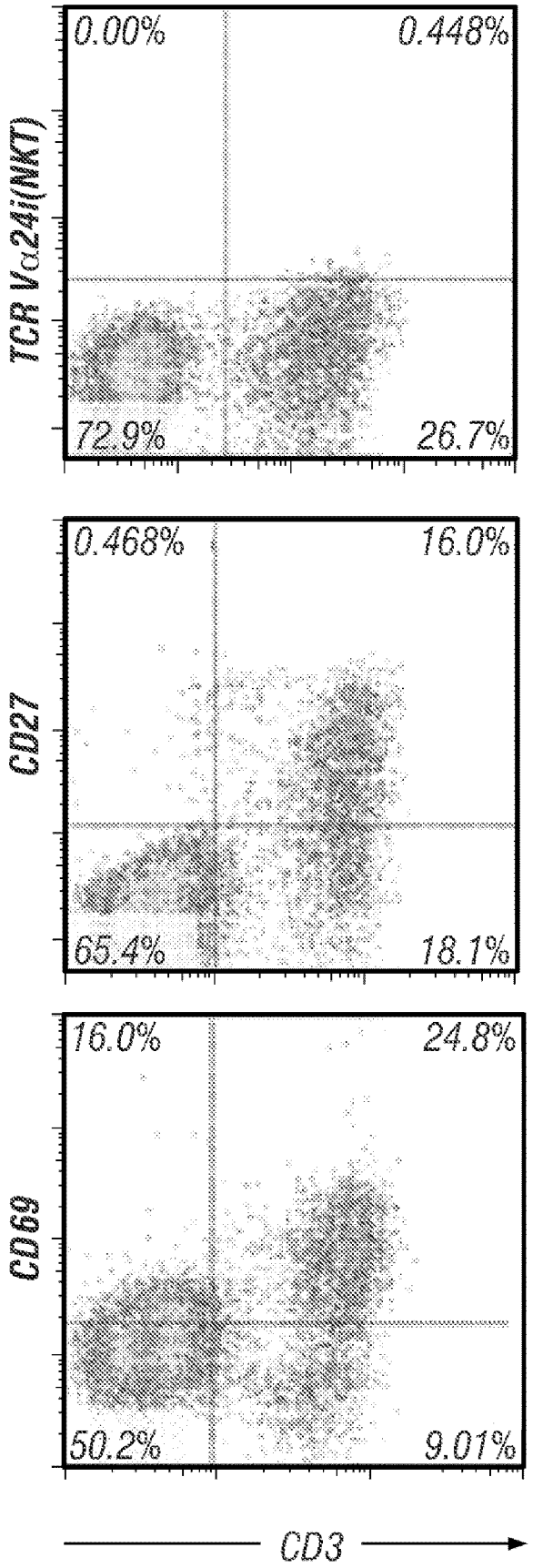
Фиг. 1D


Выход
(исходное/полученное)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
CD34+
T
NK
Размножение Т-клеток

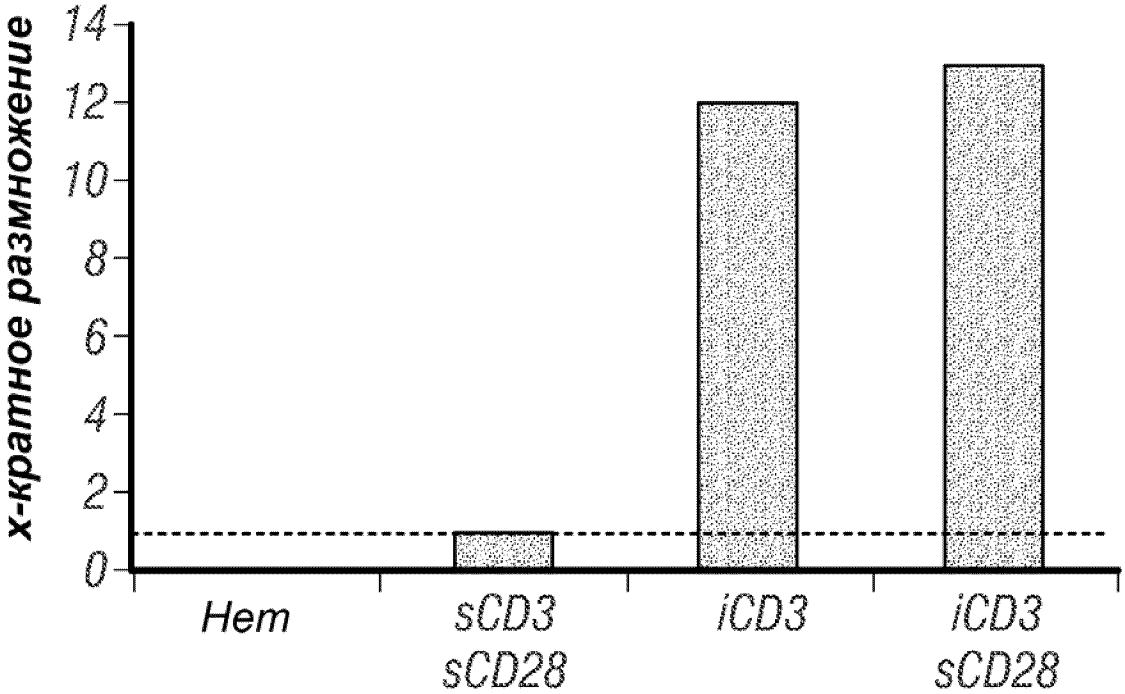
Фиг. 1E

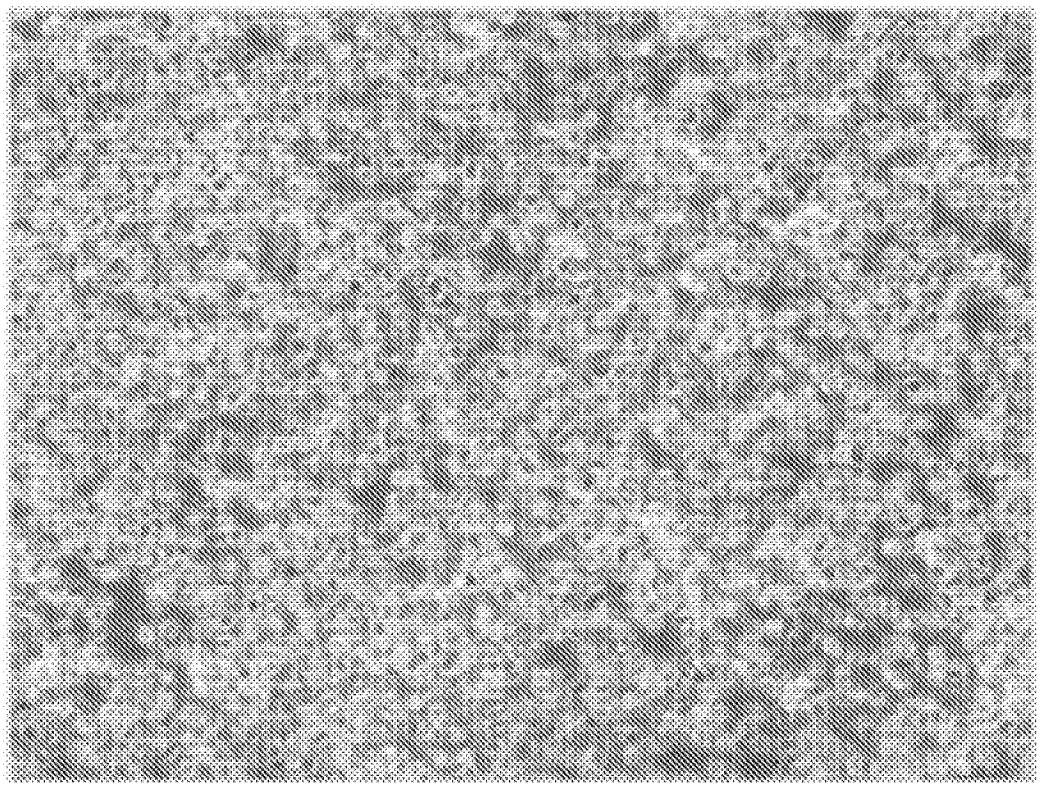

0.121%
30.5%
67.8%
1.55%
TCR α/β
0.018%
0.121%
72.3%
27.5%
TCR γ/δ
3.52%
30.7%
44.8%
21.0%
CD5
3.02%
44.1%
44.9%
7.99%
CD7
0.281%
17.4%
65.4%
16.8%
CD94
0.612%
11.5%
65.1%
22.8%
CD161
CD3

Фиг. 1F

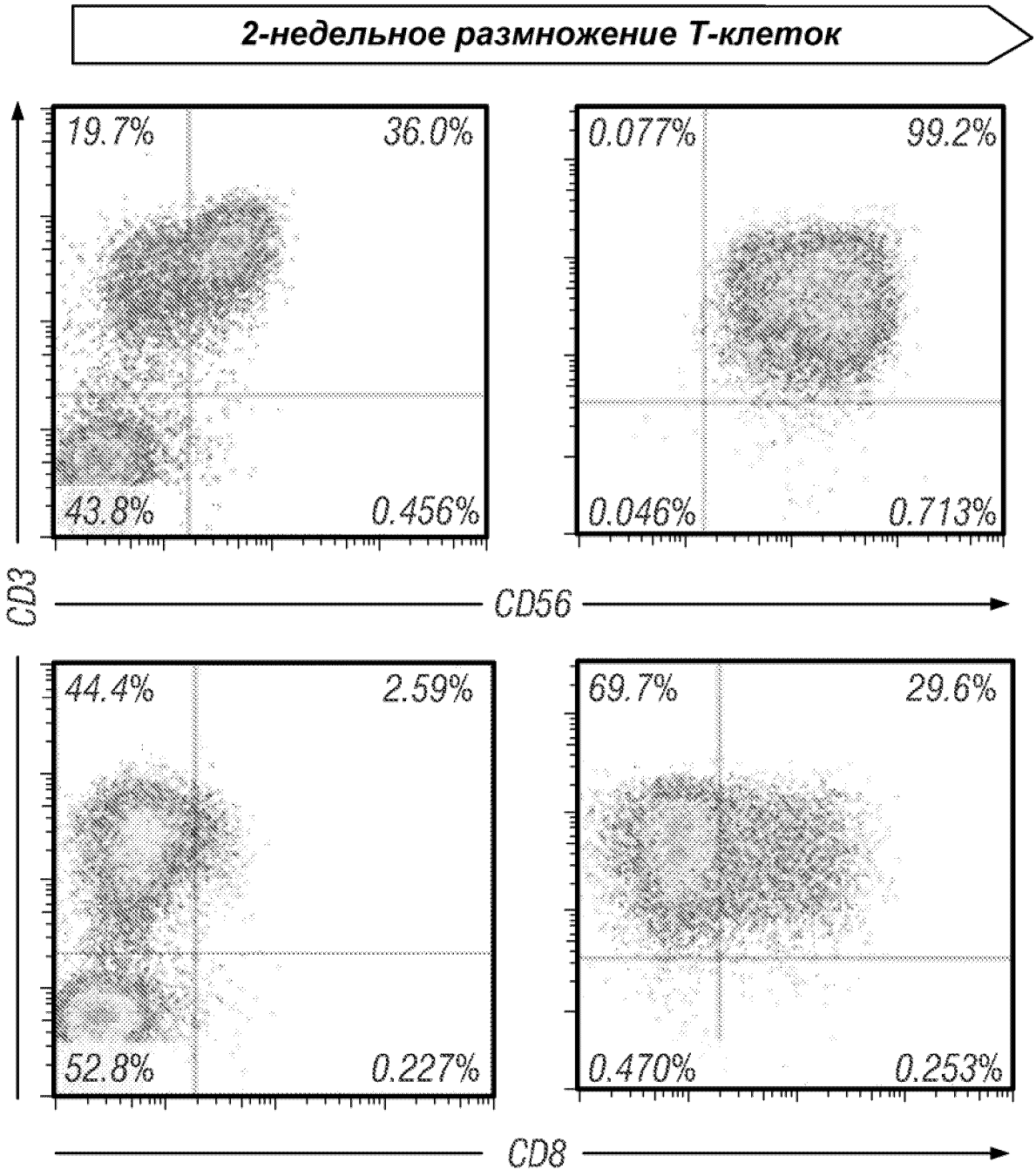


Фиг. 1F (продолжение)

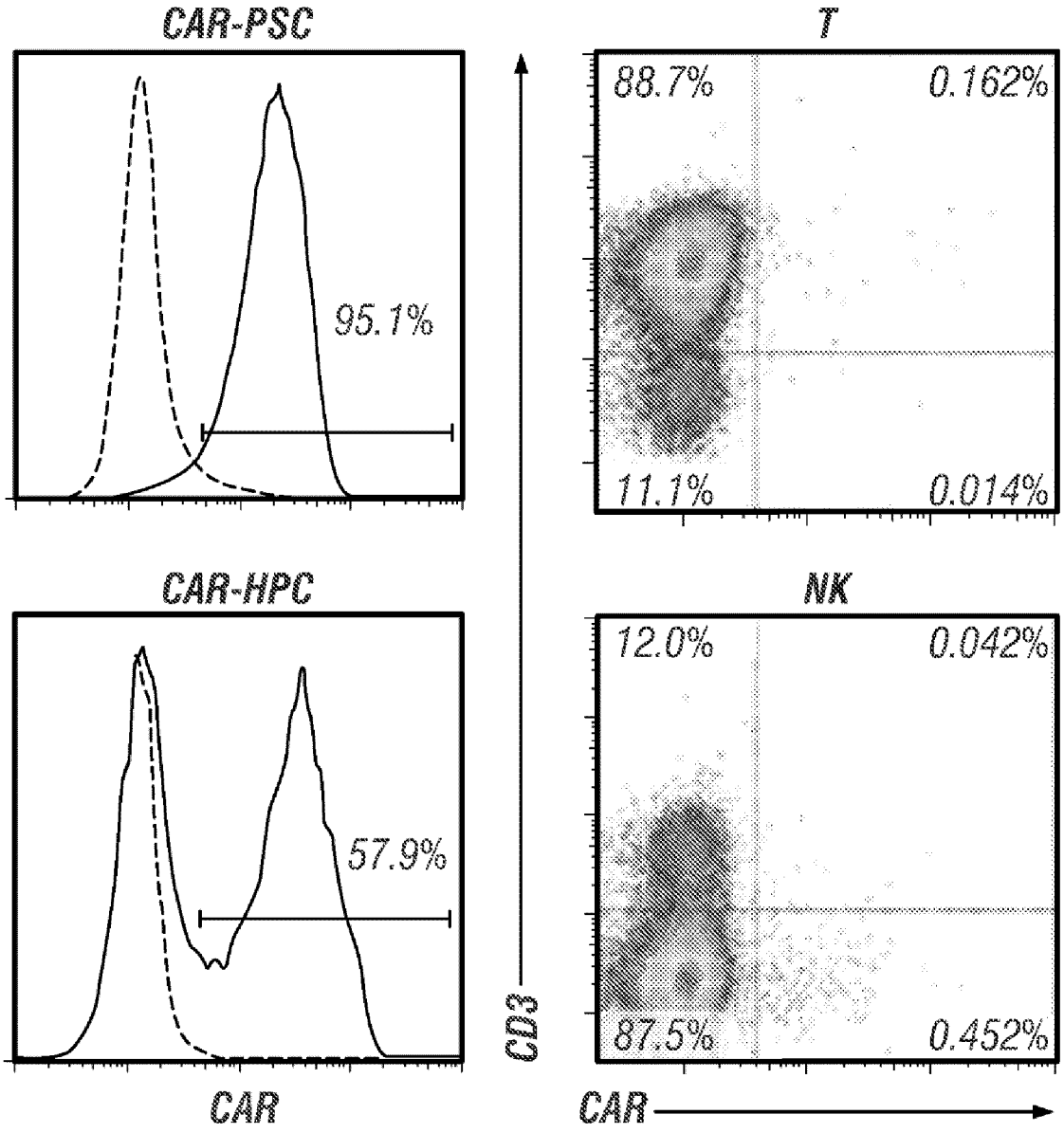

x-кратное размножение
14
12
10
8
6
4
2
0
Нет
sCD3
sCD28
iCD3
iCD3
sCD28



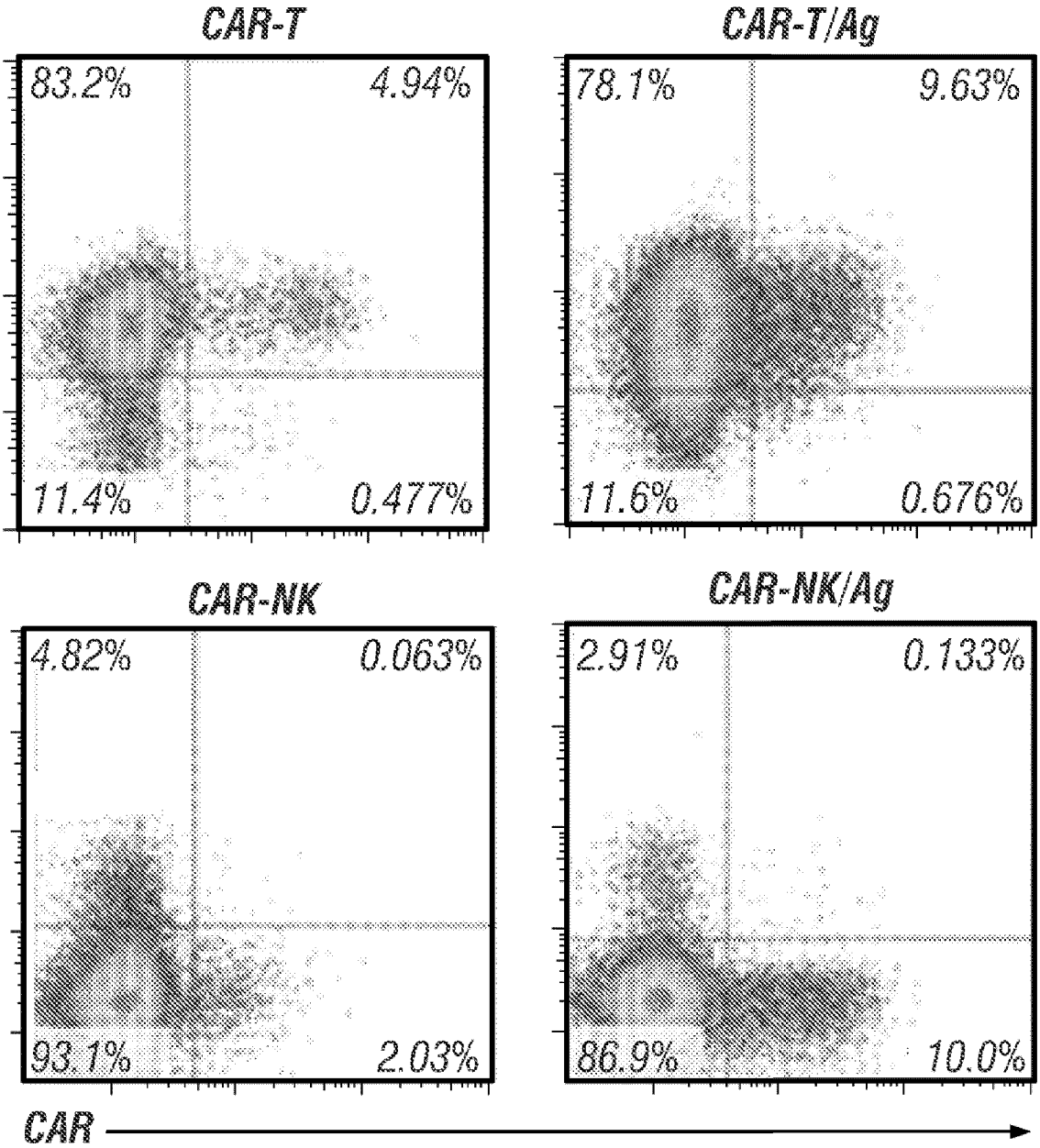
Фиг. 1G



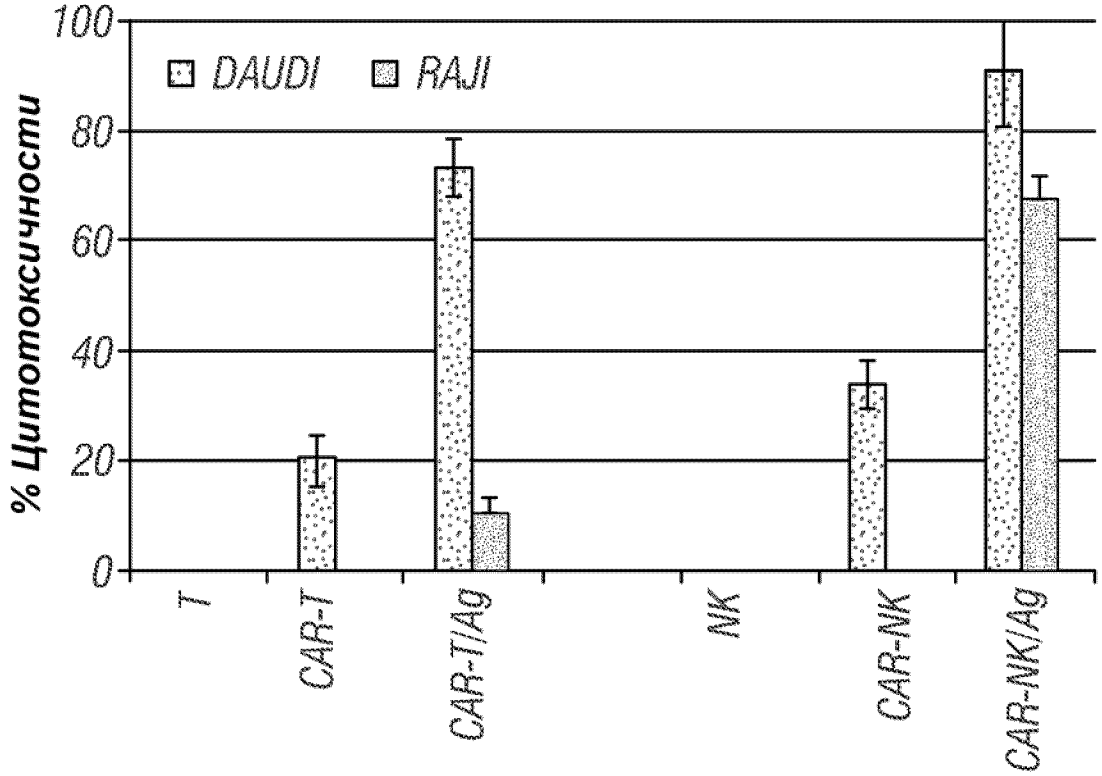
Фиг. 1G (продолжение)


CAR-PSC
95.1%
T
88.7%
0.162%
11.1%
0.014%
CAR-HPC
57.9%
NK
12.0%
0.042%
87.5%
0.452%
CD3
CAR
CAR

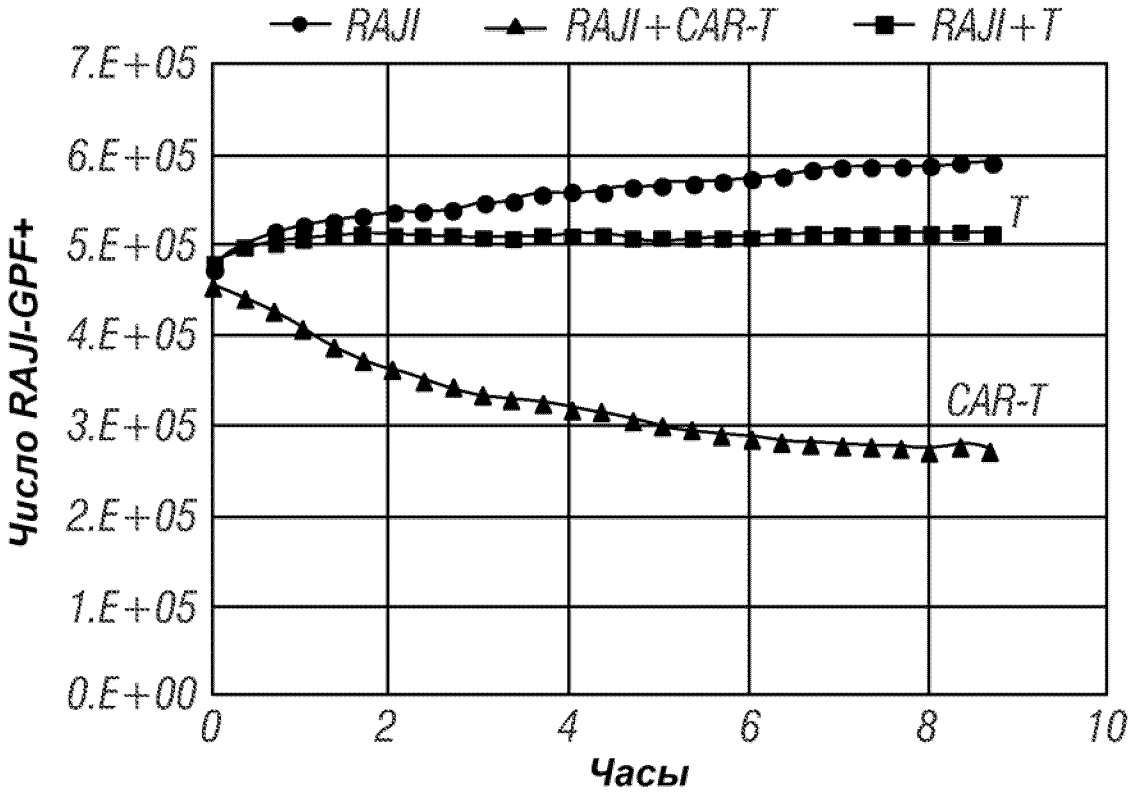
Фиг. 2



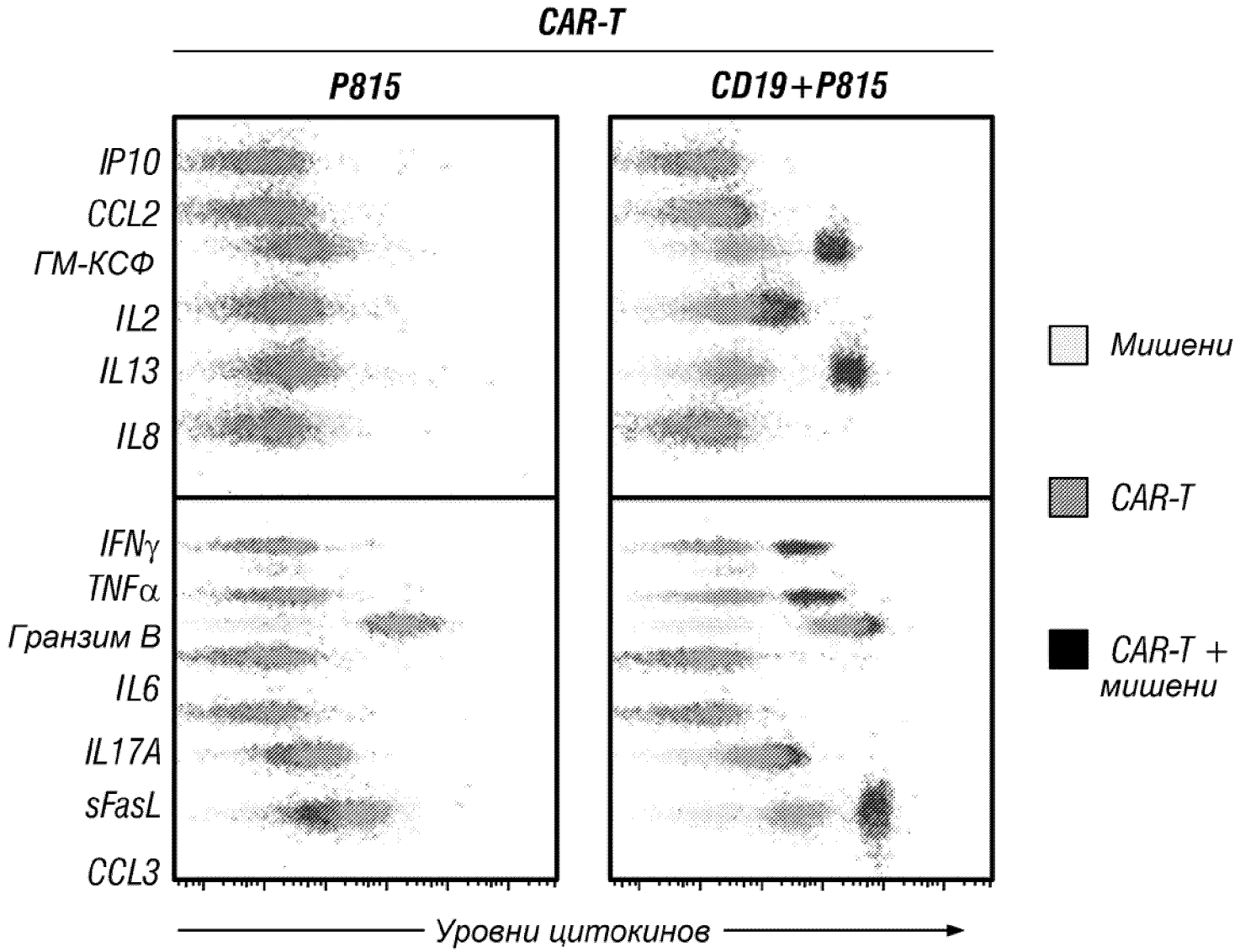
Фиг. 2 (продолжение)


100
80
60
40
20
0
% Цитотоксичности
DAUDI
RAJI
T
CAR-T
CAR-T/Ag
NK
CAR-NK
CAR-NK/Ag

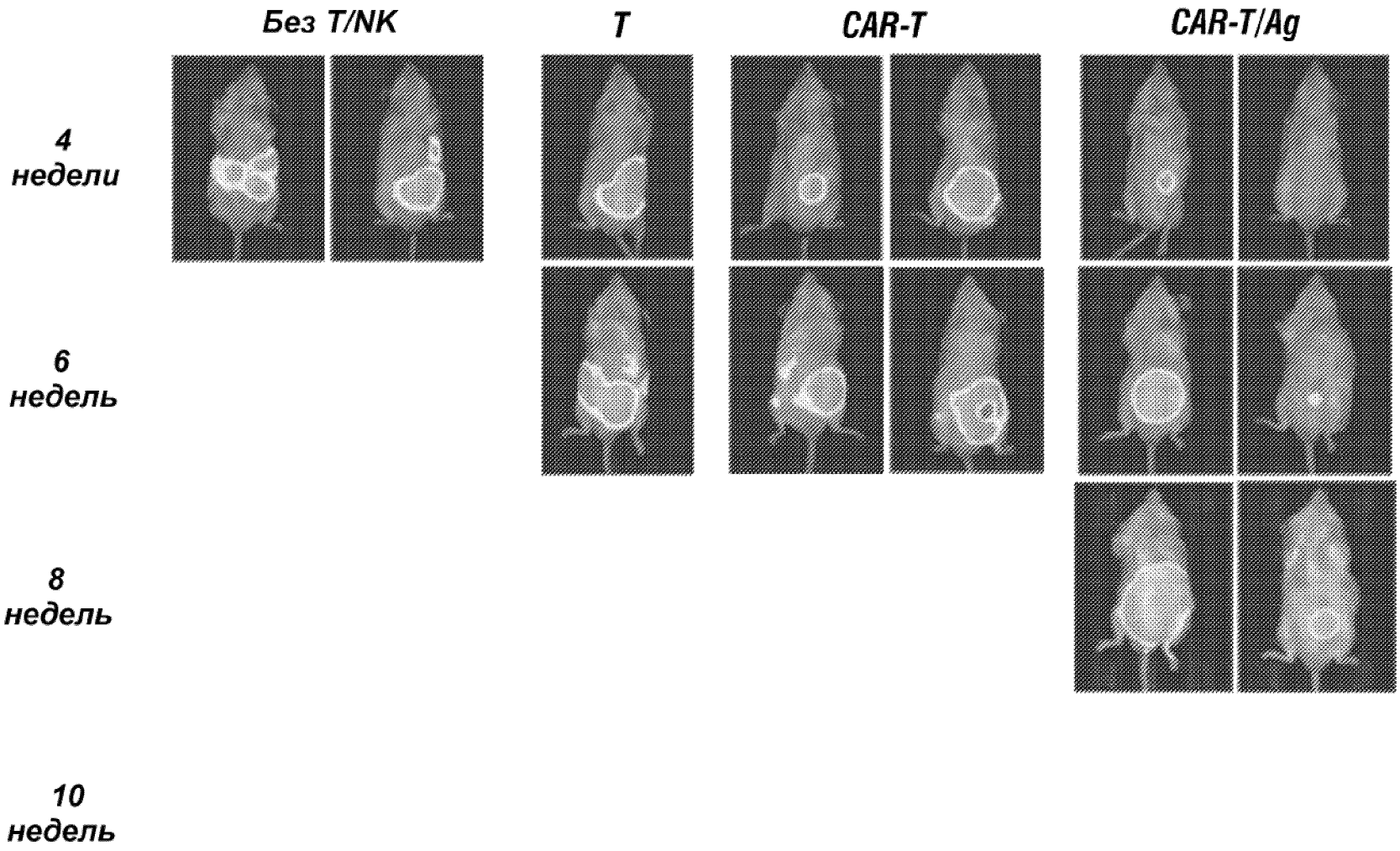
Фиг. 3А


RAJI
RAJI+CAR-T
RAJI+T
7.E+05
6.E+05
5.E+05
4.E+05
3.E+05
2.E+05
1.E+05
0.E+00
Число RAJI-GPF+
T
CAR-T
0
2
4
6
8
10
Часы

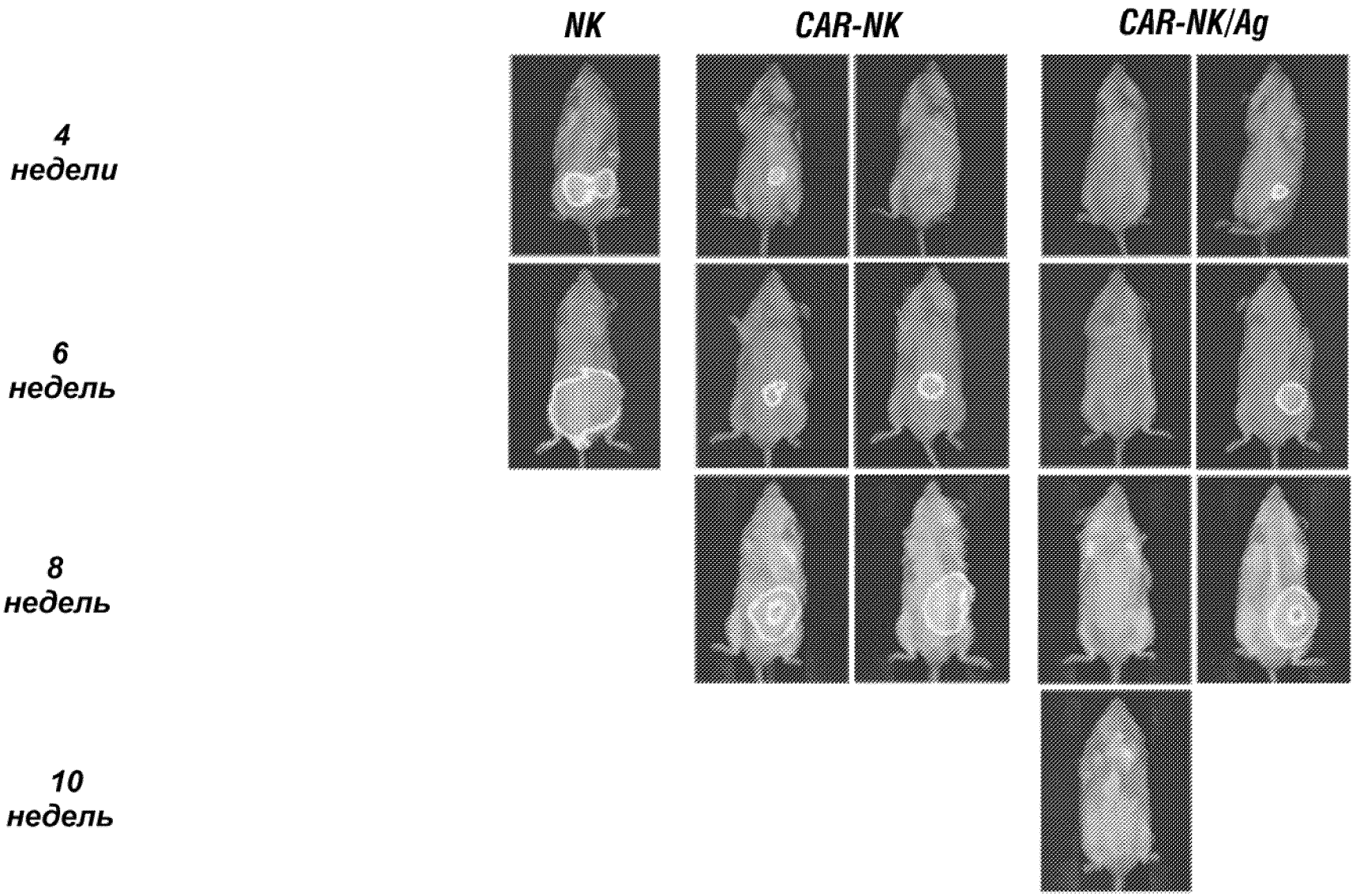
Фиг. 3В


CAR-T
P815
CD19+P815
IP10
CCL2
ГМ-КСФ
IL2
IL13
IL8
IFNγ
TNFα
Гранзим B
IL6
IL17A
sFasL
CCL3
Уровни цитокинов
Мишени
CAR-T
CAR-T + мишени

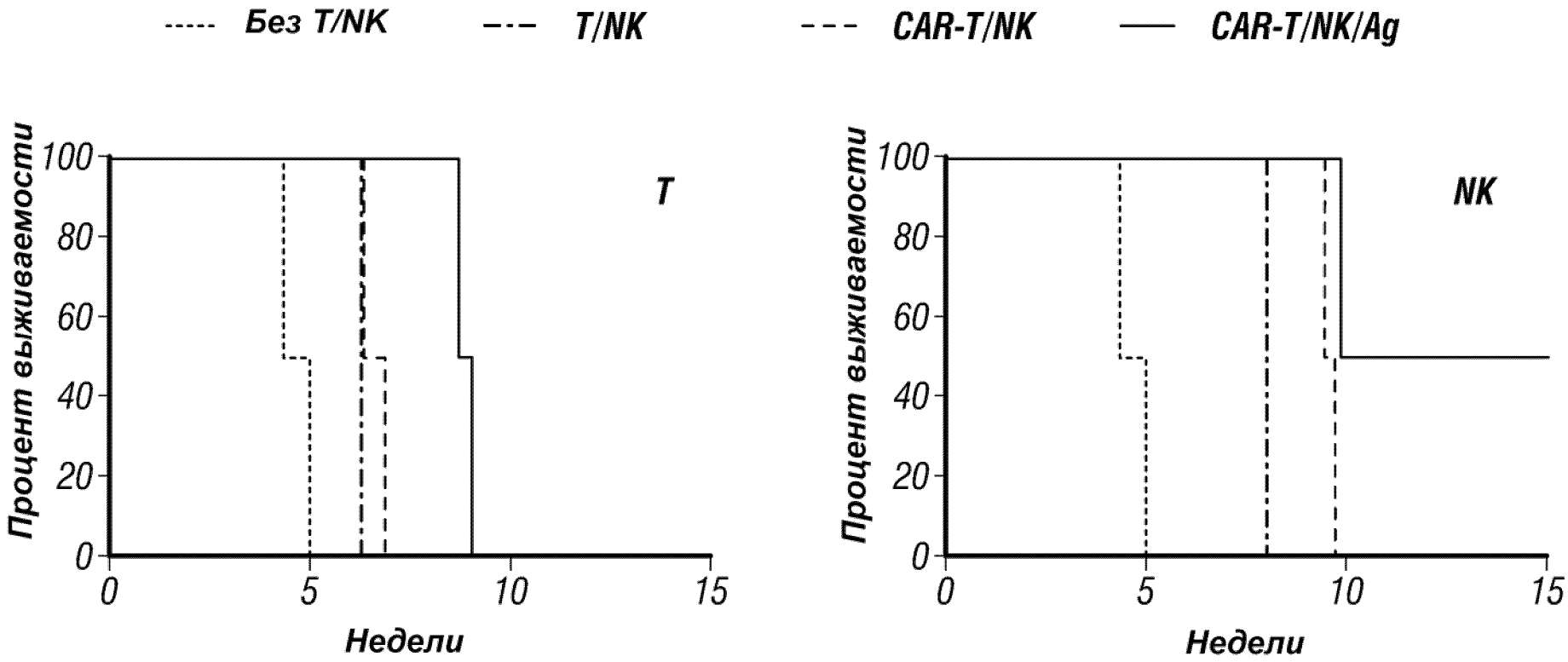
Фиг. 4



Фиг. 5A



Фиг. 5A (продолжение)


Без T/NK
T/NK
CAR-T/NK
CAR-T/NK/Ag
Процент выживаемости
100
80
60
40
20
0
T
0
5
10
15
Недели
Процент выживаемости
100
80
60
40
20
0
NK
0
5
10
15
Недели

Фиг. 5B