

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **039192**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.16

(21) Номер заявки
201791442

(22) Дата подачи заявки
2015.12.30

(51) Int. Cl. **A61K 35/17 (2015.01)**

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА И НАБОР ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 62/098,547; 62/139,952

(32) 2014.12.31; 2015.03.30

(33) US

(43) 2018.05.31

(86) PCT/US2015/068069

(87) WO 2016/109668 2016.07.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СЕЛДЖИН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Кан Линь, Чжан Сяокуй, Харрис
Джеффри, Янкович Владимир (US)**

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

(56) US-A1-20140322183

CANY et al. "Natural killer cells generated from cord blood hematopoietic progenitor cells efficiently target bone marrow-residing human leukemia cells in NOD/SCID/IL2Rg(null) mice", PLoS One, 05 June 2013 (05.06.2013), Vol. 8, No. 6, e64384, Pg. 1-11, entire document

BENSON et al. "The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody", Blood, 11 May 2010 (11.05.2010), Vol. 116, No. 13, Pgs. 2286-94, entire document

GLEASON et al. "Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production", Mol Cancer Ther. 17 October 2012 (17.10.2012), Vol. 11, No. 12, Pgs. 2674-84, entire document

SONG et al. "Chimeric NKG2D CAR-expressing T cell-mediated attack of human ovarian cancer is enhanced by histone deacetylase inhibition", Hum Gene Ther. 01 March 2013 (01.03.2013), Vol. 24, No. 3, Pgs. 295-305, entire document

WO-A1-2013123061

(57) Изобретение относится к способу лечения рака и набору для лечения рака.

B1

039192

039192

B1

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/098547, поданной 31 декабря 2014 г., и предварительной заявки на патент США № 62/139952, поданной 30 марта 2015 г., раскрытия каждой из которых включены в настоящее изобретение во всей их полноте посредством ссылок.

1. Область техники, к которой относится изобретение

В настоящем изобретении представлены способы лечения гематологического нарушения, солидной опухоли или инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта с применением НК-клеток в комбинации со вторым средством или с применением НК-клеток с генетическими модификациями для специфичности нацеливания и/или специфичности хоминга.

2. Уровень техники

Естественные клетки-киллеры (НК) представляют собой цитотоксические лимфоциты, которые составляют основной компонент врожденной иммунной системы.

НК-клетки активируются в ответ на интерфероны или полученные из макрофага цитокины. НК-клетки имеют поверхностные рецепторы двух типов, называемых "активирующими рецепторами" и "ингибирующими рецепторами", которые управляют цитотоксической активностью клеток.

Помимо других активностей, НК-клетки играют роль в отторжении опухолей организмом, и было показано, что они способны уничтожать инфицированные вирусами клетки. Естественные клетки-киллеры могут стать активированными посредством того, что у клеток отсутствуют белки или они демонстрируют сниженные уровни белков главного комплекса гистосовместимости (МНС). Активированные и расширенные НК-клетки и LAK-клетки из периферической крови использовались и в терапии *ex vivo* (вне организма), и в лечении *in vivo* (в организме) пациентов, имевших рак на поздней стадии, с некоторым успехом в отношении связанных с костным мозгом заболеваний, таких как лейкомия; рака молочной железы; и лимфом определенных типов.

Несмотря на выгодные свойства НК-клеток в уничтожении опухолевых клеток и инфицированных вирусами клеток, остается большая потребность в разработке более эффективных НК-клеток и более эффективных схем лечения, в которых применяются НК-клетки.

3. Сущность изобретения

Настоящее изобретение представляет способы лечения заболевания (например, гематологического нарушения, солидной опухоли или инфекционного заболевания) у нуждающегося в этом субъекта с применением естественных клеток-киллеров (НК) в комбинации со вторым средством, которое может применяться для лечения заболевания. Также в настоящем изобретении представлены способы лечения заболевания (например, гематологического нарушения, солидной опухоли или инфекционного заболевания) у нуждающегося в этом субъекта с применением НК-клеток с генетическими модификациями (например, НК-клеток, которые содержат химерный антигенный рецептор (CAR) и/или хоминг-рецептор) для специфичности нацеливания и/или хоминг-специфичности.

В одном из аспектов, представленных в настоящем раскрытии, способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта включают в себя (а) введение указанному субъекту изолированной популяции естественных клеток-киллеров (НК) или фармацевтической композиции с ними и (b) введение указанному субъекту второго средства или фармацевтической композиции с ним, при этом указанное второе средство может применяться для лечения указанного рака. В конкретном варианте осуществления указанный рак представляет собой множественную миелому.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ассоциированным с опухолью антигеном (ТАА). В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В конкретных вариантах осуществления ТАА выбирают из группы, состоящей из CD123, CLL-1, CD38, CS-1 (также называемого SLAMF7, SLAMF7, CD319 и CRACC), CD138, ROR1, FAP, MUC1, PSCA, EGFRvIII, EPHA2 и GD2. В более конкретном варианте осуществления второе средство представляет собой антитело, которое связывается с CS-1. В более конкретных вариантах осуществления второе средство представляет собой элутузумаб (HuLuc63, гуманизированное моноклональное антитело против CS-1 компаний Бристол-Майерс Сквибб/ЭббВи).

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается с ассоциированным с микроокружением опухоли антигеном (ТМАО). В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В конкретных вариантах осуществления ТМАО выбирают из группы, состоящей из VEGF-A, EGF, PDGF, IGF и bFGF.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается и является антагонистом активности белка иммунной контрольной точки. В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В конкретных вариантах осуществления белок иммунной контрольной точки выбирают из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой биспецифичный активатор клеток-киллеров (BiKE). В конкретных вариантах осуществления BiKE содержит первый одно-

цепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфично связывается с ТАА. В дальнейших конкретных вариантах осуществления ТАА выбирают из группы, состоящей из CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138, ROR1, FAP, MUC1, PSCA, EGFRvIII, EPHA2 и GD2. В конкретных вариантах осуществления BiKE содержит второй scFv, который специфично связывается с CD16.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой противовоспалительное средство.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой иммуномодулирующее средство. В конкретных вариантах осуществления второе средство представляет собой леналидомид или помалидомид.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой цитотоксическое средство.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой вакцину против рака.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой химиотерапевтический препарат.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой ингибитор HDAC. В других конкретных вариантах осуществления второе средство представляет собой ромидеписин (истодакс®, Celgene).

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой миРНК.

В некоторых вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят перед вторым средством или фармацевтической композицией с ним. В некоторых вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят после второго средства или фармацевтической композиции с ним. В других вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят одновременно со вторым средством или фармацевтической композицией с ним.

В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции, инфузии, внутривенного (IV) введения, внутривенного введения или внутриопухолевого введения. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют с помощью устройства, матрицы или скаффолда. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции. В конкретных вариантах осуществления инъекция НК-клеток представляет собой местную инъекцию. В более конкретных вариантах осуществления местную инъекцию выполняют непосредственно в солидную опухоль (например, саркому). В конкретных вариантах осуществления введение НК-клеток выполняют посредством инъекции шприцем. В конкретных вариантах осуществления введению НК-клеток посредством инъекции способствуют лапароскопией, эндоскопией, ультразвуком, компьютерной томографией, магнитным резонансом или рентгенологией.

В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту второго средства или фармацевтической композиции с ним выполняют посредством инъекции, инфузии, внутривенного (IV) введения, внутривенного введения или внутриопухолевого введения. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту второго средства или фармацевтической композиции с ним выполняют с помощью устройства, матрицы или скаффолда.

В различных вариантах осуществления НК-клетки являются фукозилированными на поверхности клеток.

В некоторых вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят в однократной дозе. В других вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят во множестве доз.

В некоторых вариантах осуществления второе средство или фармацевтическую композицию с ним вводят в однократной дозе. В других вариантах осуществления второе средство или фармацевтическую композицию с ним вводят во множестве доз.

В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней, при этом НК-клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR), и при этом указанный CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и, необязательно, дополнительно костимулирующий домен. Также в настоящем изобретении представлены способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней, при этом НК-клетки содержат хоминг-рецептор и способы лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение указанному субъекту изолированной популяции естественных клеток-киллеров (NK) или фармацевтической композиции с ней, при этом НК-клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR) и хоминг-рецептор, при этом указанный CAR содержит внекле-

точный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и, необязательно, дополнительно костимулирующий домен. В различных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и костимулирующий домен.

В конкретных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие CAR и/или хоминг-рецептор, получают из CD34⁺ стволовых гематопоетических клеток (HSC), которые конструируют таким образом, чтобы они экспрессировали CAR и/или хоминг-рецептор.

В различных вариантах осуществления внеклеточный домен CAR представляет собой антигенсвязывающий домен. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой scFv-домен. В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен специфично связывается с ТАА. В конкретных вариантах осуществления ТАА выбирают из группы, состоящей из CD123, CLL-1, CD38, CD20 и CS-1. В более конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный Fv (scFv) или антигенсвязывающий фрагмент, полученный из антитела, которое связывает CS-1. В более конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечную версию элутумаба и/или антигенсвязывающего фрагмента элутумаба. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен содержит одноцепочечный Fv (scFv) или антигенсвязывающий фрагмент, полученный из антитела, которое связывает CD20.

В различных вариантах осуществления внутриклеточный стимулирующий домен CAR представляет собой сигнальный домен дзета-CD3.

В различных вариантах осуществления костимулирующий домен CAR содержит внутриклеточный домен CD28, 4-1BB, PD-1, OX40, CTLA-4, NKp46, NKp44, NKp30, DAP10 или DAP12.

В различных вариантах осуществления хоминг-рецептор представляет собой хемотаксический рецептор. В конкретных вариантах осуществления хемотаксический рецептор выбирают из группы, состоящей из CXCR4, VEGFR2 и CCR7.

В одном из вариантов осуществления, представленном в настоящем раскрытии, способ лечения индивида, имеющего множественную миелому, включает в себя введение индивиду (1) леналидомида или помалидомида и (2) NK-клеток, которые содержат CAR ("CAR NK-клетки"), при этом указанные CAR NK-клетки являются эффективными для лечения множественной миеломы у указанного индивида. В конкретных вариантах осуществления способа лечения индивида со множественной миеломой указанные CAR NK-клетки содержат внеклеточный домен CAR, и этот внеклеточный домен является связывающим CS-1 доменом. В конкретных вариантах осуществления связывающий CS-1 домен содержит scFv или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое связывает CS-1. В определенных конкретных вариантах осуществления связывающий CS-1 домен содержит одноцепочечную версию элутумаба и/или антигенсвязывающего фрагмента элутумаба.

В другом варианте осуществления, представленном в настоящем раскрытии, способ лечения индивида, имеющего множественную миелому, включает в себя введение индивиду (1) леналидомида или помалидомида; (2) элутумаба и (3) CAR NK-клеток, при этом указанные CAR NK-клетки являются эффективными для лечения множественной миеломы у указанного индивида. В определенных конкретных вариантах осуществления способа лечения индивида с множественной миеломой указанные CAR NK-клетки содержат внеклеточный домен CAR, и этот внеклеточный домен является связывающим CS-1 доменом. В конкретных вариантах осуществления связывающий CS-1 домен содержит scFv или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое связывает CS-1.

В другом варианте осуществления, представленном в настоящем раскрытии, способ лечения индивида, имеющего рак крови (например, лимфому Беркитта), включает в себя введение индивиду (1) ромидеписина и (2) CAR NK-клеток, при этом указанные CAR NK-клетки являются эффективными для лечения рака крови (например, лимфомы Беркитта) у указанного индивида. В определенных конкретных вариантах осуществления способа лечения индивида с раком крови (например, лимфомой Беркитта) указанные CAR NK-клетки содержат внеклеточный домен CAR, и этот внеклеточный домен является связывающим CD20 доменом. В конкретных вариантах осуществления связывающий CD20 домен содержит scFv или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое связывает CD20.

В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции NK-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции, инфузии, внутривенного (IV) введения, внутрибедренного введения или внутриопухолевого введения. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции NK-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют с помощью устройства, матрицы или скаффолда. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции NK-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции. В конкретных вариантах осуществления инъекция NK-клеток представляет собой местную инъекцию. В более конкретных вариантах осуществления местную инъекцию выполняют непосредственно в солидную опухоль (например, саркому). В конкретных вариантах осуществления введение NK-клеток выполняют посредством инъекции шприцем. В конкретных вариантах осуществления введения NK-клеток посредством инъекции способствуют лапароскопией, эндоскопией, ультразвуком, компьютерной томографией, магнит-

ным резонансом или рентгенологией.

В различных вариантах осуществления НК-клетки являются фукозилированными на поверхности клеток.

В некоторых вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят в однократной дозе. В других вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят во множестве доз.

В другом аспекте, представленном в настоящем раскрытии, способы лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта включают в себя (а) введение указанному субъекту изолированной популяции естественных клеток-киллеров (NK) или фармацевтической композиции с ней и (b) введение указанному субъекту второго средства или фармацевтической композиции с ним, при этом указанное второе средство может применяться для лечения указанной вирусной инфекции.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфично связывается и является антагонистом активности белка иммунной контрольной точки. В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело. В конкретных вариантах осуществления белок иммунной контрольной точки выбирают из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой биспецифичный активатор клеток-киллеров (BiKE).

В некоторых вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят перед вторым средством или фармацевтической композицией с ним. В некоторых вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят после второго средства или фармацевтической композиции с ним. В других вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят одновременно со вторым средством или фармацевтической композицией с ним.

В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции, инфузии, внутривенного (IV) введения, внутривенного введения или внутриопухолевого введения. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют с помощью устройства, матрицы или скаффолда. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции. В конкретных вариантах осуществления инъекция НК-клеток представляет собой местную инъекцию. В более конкретных вариантах осуществления местную инъекцию выполняют непосредственно в солидную опухоль (например, саркома). В конкретных вариантах осуществления введение НК-клеток выполняют посредством инъекции шприцем. В конкретных вариантах осуществления введению НК-клеток посредством инъекции способствуют лапароскопией, эндоскопией, ультразвуком, компьютерной томографией, магнитным резонансом или рентгенологией.

В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту второго средства или фармацевтической композиции с ним выполняют посредством инъекции, инфузии, внутривенного (IV) введения, внутривенного введения или внутриопухолевого введения. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту второго средства или фармацевтической композиции с ним выполняют с помощью устройства, матрицы или скаффолда.

В различных вариантах осуществления НК-клетки являются фукозилированными на поверхности клеток.

В некоторых вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят в однократной дозе. В других вариантах осуществления изолированную популяцию НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят во множестве доз.

В некоторых вариантах осуществления второе средство или фармацевтическую композицию с ним вводят в однократной дозе. В других вариантах осуществления второе средство или фармацевтическую композицию с ним вводят во множестве доз.

В другом аспекте, представленном в настоящем раскрытии, способы лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта включают в себя введение указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней, при этом НК-клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR), при этом указанный CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и, необязательно, костимулирующий домен. Также в настоящем изобретении представлены способы лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение указанному субъекту изолированной популяции естественных клеток-киллеров (NK) или фармацевтической композиции с ней, при этом НК-клетки содержат химерный антигенный рецептор (CAR) и хоминг-рецептор, при этом указанный CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный

стимулирующий домен и, необязательно, костимулирующий домен. В различных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и костимулирующий домен.

В конкретных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие CAR и/или хоминг-рецептор, получают из CD34⁺ стволовых гематопозитических клеток (HSC), которые конструируют таким образом, чтобы они экспрессировали CAR и/или хоминг-рецептор.

В различных вариантах осуществления внеклеточный домен CAR представляет собой антигенсвязывающий домен. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой scFv домен.

В различных вариантах осуществления внутриклеточный стимулирующий домен CAR представляет собой сигнальный домен дзэта-CD3.

В различных вариантах осуществления костимулирующий домен CAR содержит внутриклеточный домен CD28, 4-1BB, PD-1, OX40, CTLA-4, NKp46, NKp44, NKp30, DAP10 или DAP12.

В различных вариантах осуществления хоминг-рецептор представляет собой хемотаксический рецептор. В конкретных вариантах осуществления хемотаксический рецептор выбирают из группы, состоящей из CXCR4, VEGFR2 и CCR7.

В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции NK-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции, инфузии, внутривенного (IV) введения, внутривенного введения или внутриопухолевого введения. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции NK-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют с помощью устройства, матрицы или скаффолда. В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции NK-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции. В конкретных вариантах осуществления инъекция NK-клеток представляет собой местную инъекцию. В более конкретных вариантах осуществления местную инъекцию выполняют непосредственно в солидную опухоль (например, саркому). В конкретных вариантах осуществления введение NK-клеток выполняют посредством инъекции шприцем. В конкретных вариантах осуществления введению NK-клеток посредством инъекции способствуют лапароскопией, эндоскопией, ультразвуком, компьютерной томографией, магнитным резонансом или рентгенологией.

В различных вариантах осуществления NK-клетки являются фукозилированными на поверхности клеток.

В некоторых вариантах осуществления изолированную популяцию NK-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят в однократной дозе. В других вариантах осуществления изолированную популяцию NK-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят во множестве доз.

Настоящее изобретение также представляет наборы для лечения заболевания (например, гематологическое нарушение, солидная опухоль или инфекционное заболевание) у нуждающегося в этом субъекта, которые включают в себя изолированную популяцию NK-клеток и второе средство, которое может применяться для лечения заболевания.

В одном из аспектов, представленных в настоящем раскрытии, наборы для лечения рака у нуждающегося в этом субъекта включают в себя (а) изолированную популяцию NK-клеток или фармацевтическую композицию с ней и (б) второе средство или фармацевтическую композицию с ним, при этом указанное второе средство может применяться для лечения указанного рака. Второе средство может являться любым средством, которое может применяться в способах лечения рака в соответствии с описанным выше.

В другом аспекте, представленном в настоящем раскрытии, наборы для лечения вирусной инфекции у нуждающегося в этом субъекта включают в себя (а) изолированную популяцию NK-клеток или фармацевтическую композицию с ней и (б) второе средство или фармацевтическую композицию с ним, при этом указанное второе средство может применяться для лечения указанной вирусной инфекции. Второе средство может быть любым средством, которое может применяться в способах лечения вирусной инфекции в соответствии с описанным выше.

В различных вариантах осуществления способов или наборов, предоставленных в настоящем раскрытии, NK-клетки представляют собой плацентарные промежуточные естественные клетки-киллеры (PiNK). В определенных вариантах осуществления клетки PiNK получены из плацентарных клеток. В конкретных вариантах осуществления плацентарные клетки получены из плацентарного перфузата. В конкретных вариантах осуществления плацентарные клетки получены из плацентарной ткани, которая была механически и/или ферментативно разорвана.

В различных вариантах осуществления способов или наборов, предоставленных в настоящем раскрытии, NK-клетки представляют собой активированные NK-клетки. В определенных вариантах осуществления активированные NK-клетки продуцируют посредством процесса, включающего в себя (а) высеивание популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в первой среде, содержащей интерлейкин-15 (IL-15) и, необязательно, один или более из фактора стволовых клеток (SCF) и интерлейкина-7 (IL-7), при этом указанный IL-15 и необязательные SCF и IL-7 не содержатся

в пределах неопределенного компонента указанной среды, в результате чего популяция расширяется и множество гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в пределах указанной популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников дифференцируется в NK-клетки во время указанного расширения; и (b) расширение клеток с этапа (a) во второй среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2), с тем, чтобы продуцировать популяцию активированных NK-клеток. В определенных вариантах осуществления активированные NK-клетки продуцируют посредством процесса, включающего в себя расширение популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в первой питательной среде, содержащей одно или более из фактора стволовых клеток (SCF) интерлейкина-7 (IL-7) и интерлейкина-15 (IL-15), и при этом указанные SCF, IL-7 и IL-15 не содержатся в пределах неопределенного компонента указанной среды, и при этом множество гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в пределах указанной популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников дифференцируется в NK-клетки во время указанного расширения; и при этом второй этап указанного способа включает в себя расширение клеток с первого этапа во второй среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2), с тем чтобы продуцировать активированные NK-клетки.

В конкретных вариантах осуществления первая среда также содержит один или более из лиганда Fms-подобной тирозинкиназы 3 (Flt3-L), тромбопоэтина (Тро), интерлейкина-2 (IL-2) или гепарина. В дальнейших конкретных вариантах осуществления первая среда дополнительно содержит эмбриональную бычью сыворотку или человеческую сыворотку. В дальнейших конкретных вариантах осуществления SCF присутствует в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл в первой среде. В дальнейших конкретных вариантах осуществления Flt3-L присутствует в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл в первой среде. В дальнейших конкретных вариантах осуществления IL-2 присутствует в концентрации от около 50 до около 1500 межд.ед./мл в первой среде. В дальнейших конкретных вариантах осуществления IL-7 присутствует в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл в первой среде. В дальнейших конкретных вариантах осуществления IL-15 присутствует в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл в первой среде. В дальнейших конкретных вариантах осуществления Тро присутствует в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл в первой среде. В дальнейших конкретных вариантах осуществления гепарин присутствует в концентрации от около 0,1 до около 30 ед/мл в первой среде.

В конкретных вариантах осуществления указанные IL-2 на приведенном выше втором этапе присутствуют в концентрации от 50 до около 1500 межд.ед./мл во второй питательной среде.

В конкретных вариантах осуществления указанная вторая среда дополнительно содержит одно или более из эмбриональной сыворотки теленка (FCS), трансферрина, инсулина, этаноламина, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, пальмитиновой кислоты, бычьего сывороточного альбумина (BSA) и фито-гематоглютина.

В конкретных вариантах осуществления стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники являются CD34⁺.

В конкретных вариантах осуществления стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники включают стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники из человеческого плацентарного перфузата и стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники из пуповины, при этом указанный плацентарный перфузат и указанная пуповинная кровь берутся из одной и той же плаценты.

В конкретных вариантах осуществления питающие клетки на приведенном выше этапе (b) включают в себя обработанные митомицином-С одноклеточные клетки периферической крови (PBMC), клетки K562 или прилипающие к культуре клеток стволовые клетки.

В конкретных вариантах осуществления NK-клетки являются CD3⁺CD56⁺CD16⁻. В дальнейшем конкретном варианте осуществления NK-клетки дополнительно являются CD94⁺CD117⁺. В другом дальнейшем конкретном варианте осуществления NK-клетки дополнительно являются CD161⁻. В другом дальнейшем конкретном варианте осуществления NK-клетки дополнительно являются NKG2D⁺. В другом дальнейшем конкретном варианте осуществления NK-клетки дополнительно являются NKp46⁺. В другом дальнейшем конкретном варианте осуществления NK-клетки дополнительно являются CD226⁺.

В различных вариантах осуществления способов или наборов, предоставленных в настоящем раскрытии, NK-клетки представляют собой полученные посредством трехэтапного процесса NK-клетки (TSPNK). В конкретных вариантах осуществления клетки TSPNK представляют собой клетки-предшественники NK. В определенных вариантах осуществления клетки TSPNK продуцируют посредством процесса, включающего в себя (a) культивирование гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в первой среде, содержащей Flt3L, TPO, SCF, IL-7, G-CSF, IL-6 и GM-CSF; (b) последующее культивирование указанных клеток во второй среде, содержащей Flt3L, SCF, IL-15 и IL-7, IL-17 и IL-15, G-CSF, IL-6 и GM-CSF; и (c) последующее культивирование указанных клеток в третьей среде, содержащей SCF, IL-15, IL-7, IL-2, G-CSF, IL-6 и GM-CSF.

В конкретных вариантах осуществления продолжительность культивирования этапа (a) составляет 7-9 дней, продолжительность культивирования этапа (b) составляет 5-7 дней и продолжительность культивирования этапа (c) составляет 5-9 дней. В конкретных вариантах осуществления продолжительность

культивирования этапа (а) составляет 7-9 дней, продолжительность культивирования этапа (б) составляет 5-7 дней и продолжительность культивирования этапа (с) составляет 21-35 дней.

В конкретных вариантах осуществления стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники, используемые в процессе, являются CD34⁺.

В конкретных вариантах осуществления стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники включают стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники из человеческого плацентарного перфузата и стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники из пуповины, при этом указанный плацентарный перфузат и указанная пуповинная кровь берутся из одной и той же плаценты.

В конкретных вариантах осуществления клетки CD34⁺ содержат более чем 80% клеток TSPNK в конце этапа (а) процесса продуцирования клеток TSPNK, приведенного выше.

В конкретных вариантах осуществления клетки TSPNK содержат не более чем 40% CD3⁺CD56⁺ клеток.

В конкретных вариантах осуществления клетки TSPNK содержат клетки, которые являются CD52⁺CD117⁺.

В различных вариантах осуществления способов или наборов, описанных в настоящем раскрытии, NK-клетки продуцируют посредством процесса, включающего в себя (а) культивирование гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в первой питательной среде, содержащей средство активации стволовых клеток и тромбопоэтин (Тро), с тем чтобы продуцировать первую популяцию клеток; (б) культивирование первой популяции клеток во второй питательной среде, содержащей средство активации стволовых клеток и интерлейкин 15 (IL-15) и не содержащей Тро, с тем чтобы продуцировать вторую популяцию клеток; и (с) культивирование второй популяции клеток в третьей питательной среде, содержащей IL-2 и IL-15 и не содержащей средство активации стволовых клеток и LMWH, с тем чтобы продуцировать третью популяцию клеток; при этом третья популяция клеток содержит NK-клетки, которые являются CD56⁺, CD3⁺, CD16⁺ или CD16⁺, и CD94⁺ или CD94⁻, и при этом по меньшей мере 80% NK-клеток являются жизнеспособными.

Рак в любом из способов или наборов, предоставленных в настоящем раскрытии, может представлять собой гематологический рак или солидную опухоль.

В предпочтительном варианте осуществления любого из способов или наборов, предоставленных в настоящем раскрытии, субъектом является человек.

3.1. Терминология.

При использовании в настоящем изобретении "естественная клетка-киллер" или "NK-клетки", без дополнительного изменения, включают NK-клетки, полученные из любого источника ткани, и включают в себя зрелые естественные клетки-киллеры, а также предшественники естественных клеток-киллеров. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой плацентарные промежуточные естественные клетки-киллеры (PiNK), как описано в разделе 5.1.1. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой активированные NK-клетки, как описано в разделе 5.1.2. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой полученные посредством трехэтапного процесса NK-клетки (TSPNK), как описано в разделе 5.1.3. NK-клетки могут быть получены из любого источника ткани и включают в себя зрелые естественные клетки-киллеры, а также клетки-предшественники NK.

При использовании в настоящем изобретении термин "популяция клеток-предшественников NK" относится к популяции клеток, содержащей последовательность клеточных поколений естественных клеток-киллеров, которые еще только будут развиваться в зрелые NK-клетки, что показывается, например, уровнем(ями) экспрессии одного или более фенотипических маркеров, например CD56, CD16 и KIR. В одном из вариантов осуществления популяция клеток-предшественников NK содержит клетки с низким CD16 и высоким CD56.

При использовании в настоящем изобретении "PiNK" и "клетки PiNK" относятся к плацентарным промежуточным естественным клеткам-киллерам, которые получают из человеческой плаценты, например человеческого плацентарного перфузата или плацентарной ткани, которая была механически и/или ферментативно разорвана. Клетки являются CD56⁺ и CD16⁺, например, в соответствии с определенным посредством проточной цитометрии, например, посредством активированной флуоресценцией сортировки клеток с использованием антител к CD56 и CD16.

При использовании в настоящем изобретении "плацентарный перфузат" означает перфузионный раствор, который прошел по меньшей мере через часть плаценты, например человеческой плаценты, например, через плацентарную сосудистую сеть, и содержит множество клеток, собранных перфузионным раствором во время прохождения через плаценту.

При использовании в настоящем изобретении "клетки плацентарного перфузата" означают клетки, содержащие ядро, например полные клетки, содержащие ядро, выделенные из или которые могут быть выделены из плацентарного перфузата.

При использовании в настоящем изобретении "питающие клетки" относится к клеткам одного типа, которые совместно культивируются с клетками второго типа, в целях обеспечения окружающей среды, в

которой клетки второго типа могут поддерживаться и, возможно, пролиферировать. Вне связи с какой-либо теорией, питающие клетки могут представлять, например, пептиды, полипептиды, электрические сигналы, органические молекулы (например, стероиды), молекулы нуклеиновых кислот, факторы роста (например, bFGF), другие факторы (например, цитокины) и метаболические питательные вещества целевым клеткам. В определенных вариантах осуществления питающие клетки растут в монослое.

При использовании в настоящем изобретении термин "гематопозитические клетки" включает в себя стволовые гематопозитические клетки и гематопозитические клетки-предшественники.

При использовании в настоящем изобретении "неопределенный компонент" является термином из области культуральных сред, который относится к компонентам, чьи составляющие, как правило, обычно не были предоставлены или не были определены количественно. Примеры "неопределенного компонента" включают, без ограничения, человеческую сыворотку (например, человеческую сыворотку АВ) и эмбриональную сыворотку (например, эмбриональную бычью сыворотку или эмбриональную сыворотку теленка).

При использовании в настоящем изобретении "+", при использовании для указания наличия конкретного клеточного маркера, означает, что наличие клеточного маркера может быть обнаружено в активированной флуоресценцией клеточной сортировке поверх изотипического контроля; или может быть обнаружено выше фона в количественном или полуколичественном ПЦР-РВ.

При использовании в настоящем изобретении "-", при использовании для указания наличия конкретного клеточного маркера, означает, что наличие клеточного маркера не может быть обнаружено в активированной флуоресценцией клеточной сортировке поверх изотипического контроля; или не может быть обнаружено выше фона в количественном или полуколичественном ПЦР-РВ.

При использовании в настоящем изобретении "рак" относится к гематологическому раку или солидной опухоли.

4. Краткое описание фигур

Фиг. 1 изображает активность антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) клеток PiNK в сравнении с клетками Daudi при различных концентрациях ритуксимаба.

Фиг. 2 изображает экспрессию PD-L1 и CS-1 в клеточных линиях MM MM285, MM293, RPMI8226 и OPM2. Клетки были окрашены анти-PD-L1 APC (Biolegend, Cat# 329708), анти-CS1 PE-Cy7 (Biolegend, Cat# 331816) и 7-AAD (BD Bioscience BD, Cat# 559925) согласно протоколу производителя. Данные были получены на BD LSRFortessa (BD Bioscience BD) и проанализированы с использованием программного обеспечения FLOWJO® (Tree Star). Данные были выражены как % положительных клеток, запечатанных под единичными клетками 7-AAD-. Установка % положительного запечатывания была сделана с использованием неокрашенного образца в качестве контроля. Крайний левый пик на графиках указывает контроль, тогда как самый правый пик указывает образец. Процент клеток, положительных по PD-L1, был следующим: 71,6% MM285, 70,7% MM293, 66,2% OPM-2 и 94,4% RPMI8226. Процент клеток, положительных по CS-1 был следующим: 31,8% MM285, 58,8% MM293, 93,4% OPM-2 и 29,5% RPMI8226.

Фиг. 3 изображает 24-часовую пробу на цитотоксичность полученных посредством трехэтапного процесса NK-клеток в сравнении с указанными клеточными линиями MM и первичными образцами MM в отношении эффектор-мишень, составляющем 3:1. Количество жизнеспособных целевых клеток (PKH26⁺TO-PRO-3⁻) в каждом образце было определено количественно посредством проточной цитометрии с использованием гранул для подсчета в соответствии с протоколом, предоставленным производителем (Invitrogen, Cat# C36950). Гранулы для подсчета были введены в данную пробу в целях учета любой потенциальной пролиферации опухолевых клеток во время длительного 24-часового культивирования. После инкубации в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂ клетки были собраны, после чего проводилось окрашивание 1 мкМ TO-PRO-3, чтобы идентифицировать мертвые клетки. Результаты изображены как среднее значение ± стандартное отклонение среднего значения.

Фиг. 4 изображает 24-часовую пробу на цитотоксичность полученных посредством трехэтапного процесса NK-клеток в сравнении с клетками OPM2 в отношении эффектор-мишень, составляющем 3:1, наряду со следующими дополнительными условиями: IL-15 (5 нг/мл) (Invitrogen, Cat# PHC9153); IL-2 (200 межд.ед./мл) (Invitrogen, Cat# PHC0023); анти-PD-L1 (10 нг/мл) (Affymetrix, Cat# 16-5983-82); анти-IgG (10 нг/мл) (Affymetrix, Cat# 16-4714-82); ревимид® (леналидомид; 1 мкМ) или диметилсульфоксид (0,1%) в планшетах с 48 лунками. Целевые клетки сами по себе были нанесены в планшет в качестве контролей. После инкубации в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂ клетки были собраны, после чего проводилось окрашивание 1 мкМ TO-PRO-3, чтобы идентифицировать мертвые клетки. Результаты изображены как среднее значение ± стандартное отклонение среднего значения.

5. Подробное описание

В настоящем изобретении представлены способы лечения заболевания (например, гематологического нарушения, солидной опухоли или инфекционного заболевания) у нуждающегося в этом субъекта с применением естественных клеток-киллеров (НК) в комбинации со вторым средством, которое может применяться для лечения заболевания. Также в настоящем изобретении представлены способы лечения заболевания (например, гематологического нарушения, солидной опухоли или инфекционного заболева-

ния) у нуждающегося в этом субъекта с применением НК-клеток с генетическими модификациями (например, НК-клеток, которые содержат химерный антигенный рецептор (CAR) и/или хоминг-рецептор) для специфичности нацеливания и/или хоминг-специфичности. Наборы для лечения заболевания (например, гематологического нарушения, солидной опухоли или инфекционного заболевания) у нуждающегося в этом субъекта включают в себя изолированную популяцию НК-клеток и второе средство, которое может применяться для лечения заболевания или которые включают в себя изолированную популяцию

НК-клеток с генетическими модификациями (например, НК-клетки, которые содержат химерный антигенный рецептор (CAR) и/или хоминг-рецептор), также представлены в настоящем раскрытии.

5.1. NK-клетки.

В настоящем изобретении описаны НК-клетки, включая клетки PiNK, активированные НК-клетки, клетки TSPNK и NK-клетки, полученные посредством трехэтапного процесса.

5.1.1. Плацентарные промежуточные естественные клетки-киллеры (PiNK).

В некоторых вариантах осуществления НК-клетки представляют собой плацентарные промежуточные естественные клетки-киллеры (PiNK) (см. также патент США № 8263065, изобретение которого включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте). В различных вариантах осуществления клетки PiNK получают из плацентарных клеток. В конкретных вариантах осуществления плацентарные клетки получают из плацентарного перфузата, например человеческого плацентарного перфузата. В конкретных вариантах осуществления плацентарные клетки получают из плацентарной ткани, которая была механически и/или ферментативно разорвана.

Клетки PiNK характеризуются как являющиеся $CD56^+CD16^-$, т.е. демонстрируют клеточный маркер CD56 и не имеют клеточного маркера CD16, например, в соответствии с определенным посредством проточной цитометрии, например активированной флуоресценцией сортировки клеток с применением антител против CD16 и CD56, как описано выше.

В определенных вариантах осуществления клетки PiNK являются $CD3^-$.

В других вариантах осуществления клетки PiNK не демонстрируют одного или более клеточных маркеров, демонстрируемых полностью зрелыми НК-клетками (например, CD16), или демонстрируют такие один или более маркеров на детектируемо сниженном уровне по сравнению с полностью зрелыми НК-клетками, или демонстрируют один или более клеточных маркеров, ассоциированных с предшественниками естественных клеток-киллеров, но не с полностью зрелыми естественными клетками-киллерами. В конкретном варианте осуществления клетка PiNK, описанная в настоящем раскрытии, экспрессирует NKG2D, CD94 и/или NKp46 на детектируемо более низком уровне, чем полностью зрелая НК-клетка. В другом конкретном варианте осуществления множество клеток PiNK, описанных в настоящем раскрытии, экспрессирует, суммарно, NKG2D, CD94 и/или NKp46 на детектируемо более низком уровне, чем эквивалентное количество полностью зрелых НК-клеток.

В определенных вариантах осуществления клетки PiNK экспрессируют одну или более микроРНК hsa-miR-100, hsa-miR-127, hsa-miR-211, hsa-miR-302c, hsa-miR-326, hsa-miR-337, hsa-miR-497, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a, hsa-miR-518e, hsa-miR-519d, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-618 и/или hsa-miR-99a на детектируемо более высоком уровне, чем естественные клетки-киллеры периферической крови.

Поскольку послеродовая плацента содержит ткань и клетки из плода и из плацентарного перфузата матери, в зависимости от способа сбора, клетки PiNK могут включать в себя только эмбриональные клетки или существенное большинство эмбриональных клеток (например, более чем около 90, 95, 98 или 99%) или могут включать в себя смесь эмбриональных и материнских клеток (например, эмбриональные клетки составляют менее чем около 90, 80, 70, 60 или 50% от суммарного количества содержащих ядро клеток перфузата). В одном из вариантов осуществления клетки PiNK получают только из эмбриональных плацентарных клеток, например клеток, полученных из замкнутой перфузии плаценты (см. выше), при этом перфузия производит перфузат, содержащий существенное большинство или только эмбриональные плацентарные клетки. В другом варианте осуществления клетки PiNK получают из эмбриональных и материнских клеток, например клеток, полученных посредством перфузии методом культивирования в кюветах (см. выше), при этом перфузия производит перфузат, содержащий смесь эмбриональных и материнских плацентарных клеток. Таким образом, в одном из вариантов осуществления НК-клетки представляют собой популяцию полученных из плаценты промежуточных НК-клеток, существенное большинство которых имеют эмбриональный генотип. В другом варианте осуществления НК-клетки представляют собой популяцию полученных из плаценты промежуточных НК-клеток, которые включают в себя НК-клетки, имеющие эмбриональный генотип, и НК-клетки, имеющие материнский фенотип.

5.1.2. Активированные NK-клетки.

В некоторых вариантах осуществления НК-клетки представляют собой активированные НК-клетки (т.е. полученные посредством двухэтапного процесса НК-клетки или клетки TSNK) (см. также публикацию заявки на патент США № 2012/0148553, изобретение которой включено в настоящее изобретение посредством ссылки во всей его полноте), которые представляют собой НК-клетки, продуцированные посредством любого способа/процесса, описанного ниже в разделе 5.2.4.

В конкретном варианте осуществления активированные НК-клетки являются $CD3^+CD56^+$. В конкретном варианте осуществления активированные НК-клетки являются $CD3^+CD56^+CD16^-$. В другом конкретном варианте осуществления активированные НК-клетки дополнительно являются $CD94^+CD117^+$. В другом конкретном варианте осуществления активированные НК-клетки дополнительно являются $CD161^-$. В другом конкретном варианте осуществления активированные НК-клетки дополнительно являются $NKG2D^+$. В другом конкретном варианте осуществления активированные НК-клетки дополнительно являются $NKp46^+$. В другом конкретном варианте осуществления активированные НК-клетки дополнительно являются $CD226^+$.

В определенных вариантах осуществления более чем 50, 60, 70, 80, 90, 92, 94, 96, 98% указанных активированных НК-клеток являются $CD56^+$ и $CD16^-$. В других вариантах осуществления по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 82, 84, 86, 88 или 90% указанных активированных НК-клеток являются $CD3^+$ и $CD56^+$. В других вариантах осуществления по меньшей мере 50, 52, 54, 56, 58 или 60% указанных активированных НК-клеток являются $NKG2D^+$. В других вариантах осуществления меньше чем 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3% указанных клеток являются $NKB1^+$. В определенных других вариантах осуществления менее чем 30, 20, 10, 8, 6, 4 или 2% указанных активированных НК-клеток являются $NKAT2^+$. В определенных других вариантах осуществления менее чем 30, 20, 10, 8, 6, 4 или 2% указанных активированных НК-клеток являются $CD56^+$ и $CD16^+$. В более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65 или 70% указанных активированных НК-клеток $CD3^+CD56^+$ являются $NKp46^+$. В других более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или 85% указанных активированных НК-клеток $CD3^+CD56^+$ являются $CD117^+$. В других более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% указанных активированных НК-клеток $CD3^+CD56^+$ являются $CD94^+$. В других более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% указанных активированных НК-клеток $CD3^+CD56^+$ являются $CD161^-$. В других более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 10, 12, 14, 16, 18 или 20% указанных активированных НК-клеток $CD3^+CD56^+$ являются $CD226^+$. В более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 20, 25, 30, 35 или 40% указанных активированных НК-клеток $CD3^+CD56^+$ являются $CD7^+$. В более конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60% указанных активированных НК-клеток $CD3^+CD56^+$ являются $CD5^+$.

Активированные НК-клетки могут иметь эмбриональный генотип или материнский генотип. Например, поскольку послеродовая плацента, в качестве источника гематопозитических клеток, подходящих для продуцирования активированных НК-клеток, содержит ткань и клетки от плода и от матери, плацентарный перфузат может содержать только эмбриональные клетки или существенное большинство эмбриональных клеток (например, более чем около 90, 95, 98 или 99%) или может содержать смесь эмбриональных и материнских клеток (например, эмбриональные клетки составляют менее чем около 90, 80, 70, 60 или 50% от суммарного количества содержащих ядро клеток перфузата). В одном из вариантов осуществления активированные НК-клетки получают только из эмбриональных плацентарных гематопозитических клеток, например клеток, полученных из замкнутой перфузии плаценты, при этом перфузия производит перфузат, содержащий существенное большинство или только эмбриональные плацентарные гематопозитические клетки. В другом варианте осуществления активированные НК-клетки получают из эмбриональных и материнских клеток, например, клеток, полученных посредством перфузии методом культивирования в кюветах (см. выше), при этом перфузия производила перфузат, содержащий смесь эмбриональных и материнских плацентарных клеток. Таким образом, в одном из вариантов осуществления активированные НК-клетки получают из популяции полученных из плаценты промежуточных НК-клеток, существенное большинство которых имеет эмбриональный генотип. В другом варианте осуществления активированные НК-клетки получают из популяции полученных из плаценты промежуточных НК-клеток, которые включают в себя естественные клетки-киллеры, имеющие эмбриональный генотип, и естественные клетки-киллеры, имеющие материнский фенотип.

В определенных вариантах осуществления активированные НК-клетки или популяции, обогащенные активированными НК-клетками, могут быть оценены посредством обнаружения одного или более функционально соответствующих маркеров, например, $CD94$, $CD161$, $NKp44$, $DNAM-1$, $2B4$, $NKp46$, $CD94$, KIR и семейство $NKG2$ активирующих рецепторов (например, $NKG2D$).

Необязательно, цитотоксическая активность изолированных или обогащенных естественных клеток-киллеров может быть оценена, например, в пробе на цитотоксичность с использованием опухолевых клеток, например культивированных опухолевых клеток $K562$, $LN-18$, $U937$, $WERI-RB-1$, $U-118MG$, $HT-29$, $HCC2218$, $KG-1$ или $U266$ и т.п. в качестве клеток-мишеней.

5.1.3. НК-клетки, полученные посредством трехэтапного процесса (TSPNK).

В некоторых вариантах осуществления НК-клетки представляют собой полученные посредством трехэтапного процесса НК-клетки (TSPNK), которые являются клетками НК, продуцированными любым способом/процессом, описанным ниже в разделе 5.2.5. В конкретных вариантах осуществления клетки TSPNK являются клетками-предшественниками НК (см. также публикацию заявки на патент США № 2012/0148553, изобретение которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его

полноте).

5.1.3.1. Клетки TSPNK.

В одном из вариантов осуществления указанная изолированная популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит больший процент клеток $CD3^+CD56^+$, чем популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, например, популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством того же самого трехэтапного процесса, за исключением того, что третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток-предшественников NK, был более коротким по времени, чем третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток TSPNK. В конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток TSPNK содержит около 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% клеток $CD3^+CD56^+$. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток TSPNK содержит не менее чем 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% клеток $CD3^+CD56^+$. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток TSPNK содержит между 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95-99% клеток $CD3^+CD56^+$. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, производится с применением трехэтапного процесса, который включает в себя длинный третий этап культивирования, например, третий этап культивирования продолжительностью 18-20, 19-21, 20-22 или 21-23 дня.

В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции клеток TSPNK включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $CD117^+$, при этом указанная популяция клеток TSPNK содержит меньший процент клеток $CD3^+CD56^+CD117^+$ чем популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, например, популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством того же самого трехэтапного процесса за исключением того, что третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток-предшественников NK, имел меньшую продолжительность, чем третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток TSPNK.

В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции клеток TSPNK включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $CD161^+$, при этом указанная популяция клеток TSPNK содержит меньший процент клеток $CD3^+CD56^+CD161^+$, чем популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, например, популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством того же самого трехэтапного процесса за исключением того, что третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток-предшественников NK, имел меньшую продолжительность, чем третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток TSPNK.

В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции клеток TSPNK включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $NKp46^+$, при этом указанная популяция клеток TSPNK содержит больший процент клеток $CD3^+CD56^+NKp46^+$, чем популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, например, популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством того же самого трехэтапного процесса, за исключением того, что третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток-предшественников NK, имел меньшую продолжительность, чем третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток TSPNK.

В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции клеток TSPNK включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $CD16^+$, при этом указанная популяция клеток TSPNK содержит больший процент клеток $CD3^+CD56^+CD16^+$, чем популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, например, популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством того же самого трехэтапного процесса, за исключением того, что третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток-предшественников NK, имел меньшую продолжительность, чем третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток TSPNK. В другом варианте осуществления клетки TSPNK, продуцированные посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, обладают более длинными теломерами, чем полученные из периферической крови (PB) NK-клетки.

В одном из вариантов осуществления популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, включает в себя клетки, которые являются $CD117^+$. В конкретном варианте осуществления указанные популяции клеток TSPNK содержат не более чем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% клеток $CD117^+$. В одном из вариантов осуществления популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного про-

цесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит клетки, которые являются NKG2D⁺. В конкретном варианте осуществления указанные популяции клеток TSPNK содержат не более чем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% клеток NKG2D⁺. В одном из вариантов осуществления популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит клетки, которые являются NKp44⁺. В конкретном варианте осуществления указанные популяции клеток TSPNK содержат не более чем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% клеток NKp44⁺. В одном из вариантов осуществления популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит клетки, которые являются CD52⁺. В конкретном варианте осуществления указанные популяции клеток TSPNK содержат не более чем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% клеток CD52⁺. В конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит клетки, которые являются CD52⁺CD117⁺. В одном из вариантов осуществления популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит клетки, которые являются CD244⁺. В конкретном варианте осуществления указанные популяции клеток TSPNK содержат не более чем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% клеток CD244⁺. В конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит клетки, которые являются CD244⁺CD117⁺. В одном из вариантов осуществления популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит клетки, которые являются LFA-1⁺. В конкретном варианте осуществления указанные популяции клеток TSPNK содержат не более чем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% клеток LFA-1⁺. В одном из вариантов осуществления популяция клеток TSPNK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит клетки, которые являются CD94⁺. В конкретном варианте осуществления указанные популяции клеток TSPNK содержат не более чем около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% клеток CD94⁺.

5.1.3.2. Клетки-предшественники NK.

В одном из вариантов осуществления указанная изолированная популяция клеток-предшественников NK содержит низкий процент клеток CD3⁺CD56⁺ по сравнению с процентом клеток CD3⁺CD56⁺, ассоциированных с популяциями клеток, не являющимися предшественниками NK-клеток, такие как популяции клеток, не являющиеся предшественниками NK-клеток, продуцированные посредством трехэтапных способов, описанных в настоящем раскрытии, например популяция клеток-предшественников NK содержит около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% клеток CD3⁺CD56⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток-предшественников NK содержит не более чем 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% клеток CD3⁺CD56⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток-предшественников NK содержит между 0-5%, 5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30%, 30-35%, 35-40%, 40-45% или 45-50% клеток CD3⁺CD56⁺. В некоторых вариантах осуществления указанные популяции клеток-предшественников NK, например популяции клеток-предшественников NK, которые содержат низкий процент клеток CD3⁺CD56⁺ по сравнению с процентом клеток CD3⁺CD56⁺, ассоциированных с популяциями клеток, не являющимися предшественниками NK-клеток, содержат не более чем 1%, не более чем 2%, не более чем 3%, не более чем 4%, не более чем 5%, не более чем 10% или не более чем 15% клеток CD3⁺CD56⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные популяции клеток-предшественников NK, продуцированные посредством трехэтапных процессов, описанных в настоящем раскрытии, продуцируют с применением трехэтапного процесса, который включает в себя короткий третий этап культивирования, например, третий этап культивирования продолжительностью 4-6, 5-7, 6-8 или 7-9 дней.

В определенных вариантах осуществления указанные клетки CD3⁺CD56⁺ в указанных популяциях клеток-предшественников NK дополнительно являются CD117⁺. В конкретном варианте осуществления около 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанных клеток CD3⁺CD56⁺ в указанных популяциях клеток-предшественников NK являются CD117⁺. В другом конкретном варианте осуществления не менее чем 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% указанных клеток CD3⁺CD56⁺ в указанных популяциях клеток-предшественников NK являются CD117⁺. В другом конкретном варианте осуществления, между 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95-99% указанных клеток CD3⁺CD56⁺ в указанных популяциях клеток-предшественников NK являются CD117⁺.

В определенных вариантах осуществления указанные клетки CD3⁺CD56⁺ в указанных популяциях клеток-предшественников NK дополнительно являются CD161⁺. В конкретном варианте осуществления, около 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75% указанных клеток CD3⁺CD56⁺ в указанных популяциях клеток-предшественников NK являются CD161⁺. В другом конкретном варианте осуществления, не менее чем 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 или 75% указанных клеток CD3⁺CD56⁺ в указанных популяциях клеток-предшественников NK являются CD161⁺. В другом конкретном варианте осуществления между 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% или 70-75% указанных клеток CD3⁺CD56⁺ в указанных популяциях клеток-предшественников NK являются CD161⁺.

или 7-9 дней.

В одном из вариантов осуществления популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, включает в себя клетки, которые являются $CD52^+CD117^+$. В конкретном варианте осуществления популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит более высокий процент клеток $CD52^+CD117^+$ по сравнению с процентом клеток $CD52^+CD117^+$, ассоциированных с популяцией гематопозитических клеток-предшественников. В конкретном варианте осуществления популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, содержит более высокий процент клеток $CD52^+CD117^+$ по сравнению с процентом клеток $CD52^+CD117^+$, ассоциированных с популяциями клеток, не являющимися предшественниками NK-клеток, например, популяция клеток-предшественников NK содержит около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90% или больше клеток $CD52^+CD117^+$. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток-предшественников NK содержит не менее чем 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% клеток $CD52^+CD117^+$. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток-предшественников NK содержит между 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95% или больше клеток $CD52^+CD117^+$. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток-предшественников NK, которая включает в себя клетки $CD52^+CD117^+$, продуцируется посредством трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, продуцируются с применением трехэтапного процесса, который включает в себя короткий третий этап культивирования, например третий этап культивирования продолжительностью 4-6, 5-7, 6-8 или 7-9 дней. В конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток-предшественников NK, которая включает в себя клетки $CD52^+CD117^+$, продуцируется с применением трехэтапного процесса, который включает в себя культивирование в течение суммарно 12 дней или больше, 13 дней или больше, 14 дней или больше, 15 дней или больше, 16 дней или больше, 17 дней или больше, 18 дней или больше, 19 дней или больше, 20 дней или больше или 21 дня или больше. В конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток-предшественников NK, которая включает в себя клетки $CD52^+CD117^+$, продуцируется с применением трехэтапного процесса, который включает в себя культивирование в течение суммарно 12 дней, 13 дней или 14 дней, но не более чем 21-25 дней, 25-30 дней или 30-35 дней культивирования. В конкретном варианте осуществления указанная популяция клеток-предшественников NK, которая включает в себя клетки $CD52^+CD117^+$, продуцируется с применением трехэтапного процесса, который включает в себя суммарно 21 день культивирования.

В конкретном варианте осуществления клетки-предшественники NK, описанные в настоящем раскрытии, обладают большей способностью к пересадке в костный мозг (например, *in vivo*), чем не являющиеся предшественниками NK-клетки, например не являющиеся предшественниками NK-клетки, продуцированные посредством сопоставимого способа. Например, в определенных вариантах осуществления клетки-предшественники NK, продуцированные с применением трехэтапного способа, который включает в себя короткий третий этап культивирования, например третий этап культивирования продолжительностью 4-6, 5-7, 6-8 или 7-9 дней, при пересадке в костный мозг (например, *in vivo*) обладают более высокой эффективностью, чем не являющиеся предшественниками NK-клетки, продуцированные с применением трехэтапного способа, который включает более длинный третий этап культивирования, например третий этап культивирования продолжительностью 18-20, 19-21, 20-22 или 21-23 дня. В другом варианте осуществления клетки-предшественники NK, описанные в настоящем раскрытии, обладают более длинными теломерами, чем полученные из периферической крови (PB) NK-клетки.

5.1.4. NK-клетки, продуцированные посредством трехэтапного способа.

В одном из вариантов осуществления в настоящем изобретении предоставлена изолированная популяция NK-клеток, при этом указанные NK-клетки продуцируют согласно трехэтапному способу, описанному ниже.

В одном из вариантов осуществления в настоящем изобретении предоставлена изолированная популяция NK-клеток, продуцированная посредством трехэтапного способа, описанного в настоящем раскрытии, при этом указанная популяция NK-клеток содержит больший процент клеток $CD3^+CD56^+$, чем популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством трехэтапного способа, описанного в настоящем раскрытии, например популяция клеток-предшественников NK, продуцированная посредством того же самого трехэтапного способа, за исключением того, что третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции клеток-предшественников NK, имел меньшую продолжительность, чем третий этап культивирования, применявшийся для продуцирования популяции NK-клеток. В конкретном варианте осуществления указанная популяция NK-клеток содержит около 70% или больше, в некоторых вариантах осуществления 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% клеток $CD3^+CD56^+$. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция NK-клеток содержит не менее чем 80, 85, 90, 95, 98 или 99% клеток $CD3^+CD56^+$. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция NK-клеток содержит между 70-75%, 75-80%, 80-85%, 85-90%, 90-95% или 95-99% клеток $CD3^+CD56^+$.

В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции NK-клеток включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $NKp46^+$. В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции NK-клеток включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $CD16^+$. В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции NK-клеток включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $CD16^+$. В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции NK-клеток включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $CD94^-$. В определенных вариантах осуществления указанные клетки $CD3^+CD56^+$ в указанной популяции NK-клеток включают в себя клетки $CD3^+CD56^+$, которые дополнительно являются $CD94^+$.

В одном из вариантов осуществления популяция NK-клеток, продуцированная посредством трехэтапного способа, описанного в настоящем раскрытии, включает в себя клетки, которые являются $CD117^+$. В одном из вариантов осуществления популяция NK-клеток, продуцированная посредством трехэтапного способа, описанного в настоящем раскрытии, включает в себя клетки, которые являются $NKG2D^+$. В одном из вариантов осуществления популяция NK-клеток, продуцированная посредством трехэтапного способа, описанного в настоящем раскрытии, включает в себя клетки, которые являются $NKp44^+$. В одном из вариантов осуществления популяция NK-клеток, продуцированная посредством трехэтапного способа, описанного в настоящем раскрытии, включает в себя клетки, которые являются $CD244^+$.

5.1.5. Комбинации клеток и комбинации клеток/перфузата.

NK-клетки, например активированные NK-клетки и/или клетки TSPNK, могут быть дополнительно объединены с плацентарным перфузатом, клетками плацентарного перфузата и/или прилипающими плацентарными клетками в настоящем изобретении.

5.1.5.1. Комбинации NK-клеток и перфузата или клеток перфузата.

В конкретных вариантах осуществления NK-клетки включают в себя клетки $PiNK\ CD56^+CD16^-$ в комбинации с естественными клетками-киллерами $CD56^+CD16^+$. В более конкретных вариантах осуществления естественные клетки-киллеры $CD56^+CD16^+$ могут быть изолированы из плаценты или из другого источника, например периферической крови, пуповинной крови, костного мозга и т.п. Таким образом, в различных других вариантах осуществления клетки $PiNK$ могут быть объединены с естественными клетками-киллерами $CD56^+CD16^+$ в соотношениях, например, около 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 или около 9:1. При использовании в данном контексте "изолированные" означает, что клетки были удалены из их обычной окружающей среды, например плаценты.

В различных конкретных вариантах осуществления изолированная популяция NK-клеток содержит по меньшей мере около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или по меньшей мере около 99% клеток $PiNK$. В другом варианте осуществления множество клеток $PiNK$ включает в себя или состоит из клеток $PiNK$, которые не были расширены; например, находятся в том же состоянии, в котором были собраны из плацентарного перфузата. В другом варианте осуществления множество клеток $PiNK$ включает в себя или состоит из клеток $PiNK$, которые были расширены. Способы расширения NK-клеток описываются в других местах в настоящем раскрытии, а также были описаны, например, в Ohno и др., публикации заявки на патент США № 2003/0157713; см. также Yssel et al., *J. Immunol. Methods*, 72(1):219-227 (1984) и Litwin et al., *J. Exp. Med.* 178(4):1321-1326 (1993).

В конкретных вариантах осуществления изолированная популяция NK-клеток представляет собой популяцию плацентарных клеток, включающих в себя клетки $PiNK$. В конкретном варианте осуществления изолированная популяция NK-клеток представляет собой тотальные содержащие ядро клетки из плацентарного перфузата, например, клетки плацентарного перфузата, включающие в себя аутогенные изолированные клетки $PiNK$. В различных других вариантах осуществления активированные NK-клетки могут быть объединены, например, с NK-клетками, при этом указанные NK-клетки были изолированы из источника ткани и не были расширены, NK-клетками, изолированными из источника ткани и расширенными, или NK-клетками, продуцированными посредством другого способа, например NK-клетки $CD56^+CD16^+$, например, в соотношениях, например, около 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 или около 9:1. При использовании в данном контексте "изолированные" означает, что клетки были удалены из их обычной тканевой окружающей среды.

В конкретных вариантах осуществления активированные NK-клетки могут также быть объединены, например, с NK-клетками, при этом указанные NK-клетки были изолированы из источника ткани и не были расширены, NK-клетками, изолированными из источника ткани и расширенными, или NK-клетками, продуцированными посредством другого способа, например NK-клетки $CD56^+CD16^+$, например, в соотношениях, например, около 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 или около 9:1. При использовании в данном контексте "изолированные" означает, что клетки были удалены из их обычной тканевой окружающей среды.

В одном из вариантов осуществления, например, используется объем плацентарного перфузата, до-

полненного НК-клетками, продуцированными с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например, активированными НК-клетками или клетками TSPNK (например, клетками-предшественниками НК). В конкретных вариантах осуществления, например, каждый миллилитр плацентарного перфузата дополнен около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 или более НК-клетками, продуцированными с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например, активированными НК-клетками или клетками TSPNK (например, клетками-предшественниками НК). В другом варианте осуществления клетки плацентарного перфузата дополнены НК-клетками, продуцированными с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированными НК-клетками или клетками TSPNK (например, клетками-предшественниками НК). В определенных других вариантах осуществления, когда клетки плацентарного перфузата объединяют с НК-клетками, продуцированными с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированными НК-клетками или клетками TSPNK (например, клетками-предшественниками НК), клетки плацентарного перфузата обычно составляют около, более чем около или менее чем около 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2 или 1% общего количества клеток. В определенных других вариантах осуществления, когда НК-клетки, продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированные НК-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники НК), объединяют с множеством клеток плацентарного перфузата и/или объединенных естественных клеток-киллеров, НК-клетки обычно составляют около, более чем около или менее чем около 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2 или 1% общего количества клеток. В определенных других вариантах осуществления, когда НК-клетки, продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированные НК-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники НК) используют для дополнения плацентарного перфузата, объем раствора (например, физиологического раствора, культуральной среды и т.п.), в котором суспендируют клетки, содержит около, более чем около или менее чем около 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 8, 6, 4, 2 или 1% суммарного объема перфузата и клеток, при этом НК-клетки суспендируют до около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 или более клеток на 1 мл до добавления.

В других вариантах осуществления любую из указанных выше комбинаций клеток, в свою очередь, объединяют с пуповинной кровью или содержащими ядро клетками из пуповинной крови.

Объединенный в пул плацентарный перфузат, который получают из двух или более источников, например двух или более плацент, и объединяют, например, объединяют в пул, может также использоваться в настоящем изобретении. Такой объединенный в пул перфузат может содержать приблизительно равные объемы перфузата из каждого источника или может содержать различные объемы из каждого источника. Относительные объемы из каждого источника могут быть выбраны случайным образом или могут быть основаны, например, на концентрации или количестве одного или более клеточных факторов, например цитокинов, факторов роста, гормонов и т.п.; количестве плацентарных клеток в перфузате из каждого источника или других характеристиках перфузата из каждого источника. Перфузат от множества перфузии одной и той же плаценты может быть аналогичным образом объединен в пул.

Аналогично, клетки плацентарного перфузата и полученные из плаценты промежуточные естественные клетки-киллеры, которые получают из двух или более источников, например двух или более плацент, и объединяют в пул, могут также использоваться в настоящем изобретении. Такие объединенные в пул клетки могут содержать приблизительно равные количества клеток из этих двух или более источников или различные количества клеток из одного или более объединенных в пул источников. Относительные количества клеток из каждого источника могут быть выбраны на основании, например, количества клеток одного или более конкретных типов среди клеток, которые будут объединены в пул, например количества клеток CD34⁺ и т.д.

НК-клетки, продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированные НК-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники НК) и комбинации таких клеток с плацентарным перфузатом и/или клетками плацентарного перфузата могут анализировать в целях определения степени или объема супрессии опухоли/инфекции (т.е. потенциальной активности), которые можно ожидать, например, от заданного количества НК-клеток или заданного объема перфузата. Например, аликвоту или пробное количество клеток вводят в контакт или размещают вблизи с известным количеством клеток опухоли/инфицированных клеток при условиях, в которых клетки опухоли/инфицированные клетки в других случаях пролиферировали бы, и скорость пролиферации клеток опухоли/инфицированных клеток в присутствии плацентарного перфузата, клеток перфузата, плацентарных естественных клеток-киллеров или комбинаций указанного, в течение долгого времени (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель или дольше) сравнивают с пролиферацией эквивалентного количества клеток опухоли/инфицированных клеток в отсутствие перфузата, клеток перфузата, плацентарных естественных клеток-киллеров или комбинаций указанного. Потенциальная активность клеток может быть выражена, например, как число клеток или объем раствора, требуемые для подавления роста клеток опухоли/распространения инфекции, например, на около 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% и т.п.

В определенных вариантах осуществления НК-клетки, продуцированные с применением процессов,

описанных в настоящем раскрытии, например активированные НК-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники NK), предоставляют как вводимые единицы фармацевтической категории. Такие единицы могут быть предоставлены в дискретных объемах, например, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 мл и т.п. Такие единицы могут быть предоставлены как содержащие конкретное количество клеток, например НК-клеток, или популяций НК-клеток, или популяций клеток-предшественников NK в комбинации с другими НК-клетками или клетками перфузата, например 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 или более клеток/мл, или 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} или более клеток на единицу. В конкретных вариантах осуществления единицы могут содержать около, по меньшей мере около или самое большее около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 или более НК-клеток/мл, или 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} или более клеток на единицу. Такие единицы могут быть предоставлены как содержащие конкретные количества НК-клеток и/или любых других клеток.

В приведенных выше вариантах осуществления НК-клетки или комбинации НК-клеток с клетками перфузата или перфузатом могут являться аутогенными для реципиента (т.е. быть полученными от реципиента) или аллогенными для реципиента (т.е. быть полученными по меньшей мере от одного индивида, отличного от указанного реципиента).

В определенных вариантах осуществления каждая единица клеток маркируется в целях указания одного или более из объема, числа клеток, типа клеток, была ли единица обогащена клетками конкретного типа и/или потенциальной активности заданного числа клеток в единице или заданного количества миллилитров единицы, т.е. вызывают ли клетки в единице измеримую супрессию пролиферации конкретного типа или типов опухолевых клеток.

5.1.5.2. Комбинация клеток NK из соответствующего перфузата и пуповинной крови.

НК-клетки могут быть также получены из комбинаций соответствующих единиц плацентарного перфузата и пуповинной крови по настоящему изобретению, и в настоящем изобретении они называются комбинированными естественными клетками-киллерами. "Соответствующие единицы" при использовании в настоящем изобретении указывают, что НК-клетки получают из клеток плацентарного перфузата и клеток пуповинной крови, при этом клетки пуповинной крови получают из пуповинной крови из той же плаценты, из которой получают плацентарный перфузат, т.е. клетки плацентарного перфузата и клетки пуповинной крови, и, таким образом, естественные клетки-киллеры из них, происходят из одного и того же индивида.

В определенных вариантах осуществления комбинированные плацентарные клетки-киллеры включают в себя только, или по существу только, естественные клетки-киллеры, которые являются $CD56^+$ и $CD16^-$. В определенных других вариантах осуществления комбинированные плацентарные клетки-киллеры включают в себя НК-клетки, которые являются $CD56^+$ и $CD16^-$, и НК-клетки, которые являются $CD56^+$ и $CD16^+$. В определенных конкретных вариантах осуществления комбинированные плацентарные клетки-киллеры включают в себя по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5% естественных клеток-киллеров $CD56^+CD16^-$ (клетки PiNK).

В одном из вариантов осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры не культивировались. В конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более высокое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+CD16^-$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более низкое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+CD16^-$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более высокое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+KIR2DL2/L3^+$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более низкое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+NKp46^+$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более низкое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+NKp30^+$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более низкое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+2B4^+$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более низкое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+CD94^+$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови.

В другом варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры культивировались, например, в течение 21 дня. В конкретном варианте осуществления комбинированные естествен-

ные клетки-киллеры содержат детектируемо более низкое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+KIR2DL2/L3^+$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры не культивировались. В другом конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более высокое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+NKp44^+$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови. В конкретном варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры содержат детектируемо более высокое количество естественных клеток-киллеров $CD3^+CD56^+NKp30^+$, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров из периферической крови.

В другом варианте осуществления комбинированные естественные клетки-киллеры экспрессируют детектируемо более высокое количество гранзима В, чем эквивалентное количество естественных клеток-киллеров периферической крови.

Комбинированные НК-клетки могут быть дополнительно объединены с пуповинной кровью. В различных вариантах осуществления пуповинную кровь объединяют с комбинированными естественными клетками-киллерами в количестве около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 комбинированных естественных клеток-киллеров на миллилитр пуповинной крови.

5.1.5.3. Комбинация НК-клеток с прилипающими плацентарными стволовыми клетками.

В других вариантах осуществления НК-клетки, продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированные НК-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники НК), продуцированные с применением трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, по отдельности или в комбинации с плацентарным перфузатом или клетками плацентарного перфузата, дополняют изолированными прилипающими плацентарными клетками, например, плацентарными стволовыми клетками и плацентарными мультипотентными клетками, как описано, например, в патентах США № 7045148 и 7255879 Харири и в публикации заявки на патент США № 2007/0275362, раскрытия которых включены в настоящее изобретение посредством ссылок во всей их полноте. "Прилипающие плацентарные клетки" означает, что клетки прилипают к поверхности культуры ткани, например, пластику с культурой тканей. Прилипающие плацентарные клетки, являющиеся целесообразными в композициях и способах, раскрытых в настоящем раскрытии, не являются трофобластами, эмбриональными зародышевыми клетками или эмбриональными стволовыми клетками. В определенных вариантах осуществления прилипающие плацентарные стволовые клетки используются в качестве питающих клеток во время процессов (например, двухэтапного способа), как описано выше.

НК-клетки продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например, активированные НК-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники НК), по отдельности или в комбинации с плацентарным перфузатом или клетками плацентарного перфузата, могут быть дополнены, например, 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 или более прилипающих плацентарных клеток на 1 мл или 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} или более прилипающих плацентарных клеток. Прилипающие плацентарные клетки в комбинациях могут представлять собой, например, прилипающие плацентарные клетки, которые культивировались в течение, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 или 40 дупликаций популяции или более.

Изолированные прилипающие плацентарные клетки при культивации в первичных культурах или при расширении в клеточной культуре прилипают к подложке, например к поверхности контейнера культуры тканей (например, пластику культуры тканей). Прилипающие плацентарные клетки в культуре принимают обычно фибробластоидный звездчатый вид с рядом эндоплазматических выступов, простирающихся от центрального клеточного тела.

Прилипающие плацентарные клетки, однако, морфологически отличаются от фибробластов, культивируемых при тех же самых условиях, так как прилипающие плацентарные клетки демонстрируют большее число таких выступов, чем фибробласты. Морфологически прилипающие плацентарные клетки также отличаются от гематопоетических стволовых клеток, которые обычно принимают более округленную или "булыжную" морфологию в культуре.

Изолированные прилипающие плацентарные клетки и популяции прилипающих плацентарных клеток, являющиеся целесообразными в композициях и способах, представленных в настоящем раскрытии, экспрессируют множество маркеров, которые могут применяться для идентификации и/или изоляции клеток или популяций клеток, которые содержат прилипающие плацентарные клетки. Прилипающие плацентарные клетки и популяции прилипающих плацентарных клеток, являющиеся целесообразными в композициях и способах, представленных в настоящем раскрытии, включают в себя прилипающие плацентарные клетки и содержащие прилипающие плацентарные клетки популяции клеток, полученные непосредственно из плаценты или любой ее части (например, амнион, хорион, амниоально-хориональная пластинка, плацентарные котилодоны, пуповина и т.п.). Популяция прилипающих стволовых плацентарных клеток, в одном из вариантов осуществления, представляет собой популяцию (т.е. две или более) прилипающих плацентарных клеток в культуре, например популяцию в контейнере, например

резервуаре.

Прилипающие плацентарные клетки обычно экспрессируют маркеры CD73, CD105 и CD200 и/или OCT-4 и не экспрессируют CD34, CD38 или CD45. Прилипающие плацентарные стволовые клетки могут также экспрессировать HLA-ABC (MHC-I) и HLA-DR. Эти маркеры могут применяться для идентификации прилипающих плацентарных клеток и для различения прилипающих плацентарных клеток от клеток других типов. Поскольку прилипающие плацентарные клетки могут экспрессировать CD73 и CD105, они могут обладать характеристиками, аналогичными характеристикам мезенхимальных стволовых клеток. Отсутствие экспрессии CD34, CD38 и/или CD45 идентифицирует прилипающие плацентарные стволовые клетки как не являющиеся стволовыми гематопозитическими клетками.

В определенных вариантах осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки, описанные в настоящем раскрытии, детектируемо подавляют пролиферацию раковых клеток или рост опухоли.

В определенных вариантах осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки представляют собой изолированные плацентарные стволовые клетки. В определенных других вариантах осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки представляют собой плацентарные мультипотентные клетки. В конкретном варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки являются CD34⁻, CD10⁺ и CD105⁺ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В более конкретном варианте осуществления изолированные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ прилипающие плацентарные клетки представляют собой плацентарные стволовые клетки. В другом более конкретном варианте осуществления изолированные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные клетки представляют собой мультипотентные прилипающие плацентарные клетки. В другом конкретном варианте осуществления изолированные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ плацентарные клетки обладают потенциалом для дифференцирования в клетки нейронного фенотипа, клетки остеогенного фенотипа или клетки хондрогенного фенотипа. В более конкретном варианте осуществления изолированные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются CD200⁺. В другом более конкретном варианте осуществления изолированные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются CD90⁺ или CD45⁻ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В другом более конкретном варианте осуществления изолированные CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются CD90⁺ или CD45⁻, в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В более конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются CD90⁺ или CD45⁻ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В другом более конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются CD90⁺ и CD45⁻, в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В другом более конкретном варианте осуществления CD34⁻, CD10⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD90⁺, CD45⁻ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются CD8CT и CD86⁻ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии.

В одном из вариантов осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки являются CD200⁺, HLA-G⁺. В конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В более конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻, CD73⁺ и CD105⁺. В другом варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки продуцируют одно или более подобных эмбрионидным тел при культивировании в условиях, которые допускают формирование подобных эмбрионидным тел.

В другом варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки являются CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺. В конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются HLA-G⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁻, CD38⁻ или CD45⁻. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В более конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁻, CD38⁻, CD45⁻ и HLA-G⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки продуцируют одно или более подобных эмбрионидным тел при культивировании в условиях, которые допускают формирование подобных эмбрионидным тел.

В другом варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки являются CD200⁺, OCT-4⁺. В конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются HLA-G⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁻, CD38⁻ и CD45⁻. В более конкретном варианте осуществления указанные изолированные

прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁺. В другом конкретном варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки также продуцируют одно или более подобных эмбрионным тел при культивировании в условиях, которые допускают формирование подобных эмбрионным тел.

В другом варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки являются CD73⁺, CD105⁺ и HLA-G⁺. В конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁺, CD38⁺ или CD45⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁺, CD38⁺ и CD45⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные прилипающие стволовые клетки также являются OCT-4⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные прилипающие стволовые клетки также являются CD200⁺. В более конкретном варианте осуществления указанные прилипающие стволовые клетки также являются CD34⁺, CD38⁺, CD45⁺, OCT-4⁺ и CD200⁺.

В другом варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки представляют собой стволовые клетки CD73⁺, CD105⁺, при этом указанные клетки продуцируют одно или более подобных эмбрионным тел при культивировании в условиях, которые допускают формирование подобных эмбрионным тел. В конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁺, CD38⁺ или CD45⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁺, CD38⁺ и CD45⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные прилипающие плацентарные клетки также являются OCT-4⁺. В более конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются OCT-4⁺, CD34⁺, CD38⁺ и CD45⁺.

В другом варианте осуществления прилипающие плацентарные стволовые клетки представляют собой стволовые клетки OCT-4⁺, при этом указанные прилипающие плацентарные стволовые клетки продуцируют одно или более подобных эмбрионным тел при культивировании в условиях, которые допускают формирование подобных эмбрионным тел, и при этом указанные стволовые клетки были идентифицированы как детектируемо подавляющие пролиферацию раковых клеток или рост опухоли.

В различных вариантах осуществления по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% указанных изолированных прилипающих плацентарных клеток являются OCT-4⁺. В конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD73⁺ и CD105⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD34⁺, CD38⁺ или CD45⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные стволовые клетки являются CD200⁺. В более конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки также являются CD73⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺, CD38⁺ и CD45⁺. В другом конкретном варианте осуществления указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки были расширены, например пересеяны, по меньшей мере один раз, по меньшей мере три раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 15 раз или по меньшей мере 20 раз.

В более конкретном варианте осуществления любого из приведенных выше вариантов осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки экспрессируют ABC-р (специфичный для плаценты белок-транспортер ABC; см., например, Allikmets et al., Cancer Res. 58(23):5337-9 (1998)).

В другом варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки являются CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD200⁺, CD34⁺ и CD133⁺. В другом варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки конститутивно секретируют IL-6, IL-8 и моноцитарный хемоаттрактантный белок (MCP-1).

Каждая из вышеупомянутых изолированных прилипающих плацентарных клеток может представлять собой клетки, полученные и изолированные непосредственно из плаценты млекопитающего, или клетки, которые культивировались и пересеивались по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30 или более раз, или комбинацию указанного. Множества подавляющих опухолевые клетки из изолированных прилипающих плацентарных клеток, описанных выше, могут содержать около, по меньшей мере или не более чем, 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} или более изолированных прилипающих плацентарных клеток.

5.1.5.4. Композиции, содержащие кондиционированные среды прилипающих плацентарных клеток.

Также в настоящем изобретении может применяться композиция, содержащая NK-клетки, продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например, активированные NK-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники NK), продуцированные с применением трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, и, дополнительно, кондиционированной среды, при этом указанная композиция подавляет опухоль или является эффективной при лечении рака или вирусной инфекции. Прилипающие плацентарные клетки в соответствии с описанным в настоящем изобретении могут применяться для продуцирования кондиционированной среды, которая является подавляющей опухоль, противораковой или противовирусной, т.е. среды, содержащей одну или

более биомолекул, секретированных или экскретируемых клетками, которые обладают детектируемым эффектом подавления опухолевых клеток, противораковым эффектом или противовирусным эффектом. В различных вариантах осуществления кондиционированная среда включает среду, в которой клетки разрастались (т.е. культивировались) в течение по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней. В других вариантах осуществления кондиционированная среда включает среду, в которой такие клетки выросли по меньшей мере до 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% смыкания или до 100% смыкания. Такая кондиционированная среда может применяться для поддержания культивирования отдельной популяции клеток, например плацентарных клеток или клеток другого вида. В другом варианте осуществления кондиционированная среда, предоставленная в настоящем раскрытии, включает питательную среду, в которой культивировались изолированные прилипающие плацентарные клетки, например изолированные прилипающие плацентарные стволовые клетки или изолированные прилипающие плацентарные мультипотентные клетки и клетки, отличные от изолированных прилипающих плацентарных клеток, например неплацентарные стволовые клетки или мультипотентные клетки.

Такая кондиционированная среда может быть объединена с любыми клетками или с любой комбинацией NK-клеток, продуцированных с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированными NK-клетками или клетками TSPNK (например, клетками-предшественниками NK), плацентарным перфузатом, клетками плацентарного перфузата, с тем чтобы сформировать композицию, которая является подавляющей опухолевые клетки, противораковой или противовирусной. В определенных вариантах осуществления композиция содержит менее чем половину кондиционированной среды по объему, например около или менее чем около 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1% по объему.

Таким образом, в одном из вариантов осуществления в настоящем изобретении применяется композиция, содержащая NK-клетки, продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированные NK-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники NK), и культуральную среду от культивирования изолированных прилипающих плацентарных клеток, при этом указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки (а) прилипают к субстрату и (b) являются $CD34^+$, $CD10^+$ и $CD105^+$; при этом указанная композиция детектируемо подавляет рост или пролиферацию опухолевых клеток или является противораковой или противовирусной. В конкретном варианте осуществления изолированные прилипающие плацентарные клетки являются $CD34^+$, $CD10^+$ и $CD105^+$ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В более конкретном варианте осуществления изолированные $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ прилипающие плацентарные клетки представляют собой плацентарные стволовые клетки. В другом более конкретном варианте осуществления изолированные $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ плацентарные клетки представляют собой мультипотентные прилипающие плацентарные клетки. В другом конкретном варианте осуществления изолированные $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ плацентарные клетки обладают потенциалом для дифференцирования в клетки нейронного фенотипа, клетки остеогенного фенотипа или клетки хондрогенного фенотипа. В более конкретном варианте осуществления изолированные $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются $CD200^+$. В другом более конкретном варианте осуществления изолированные $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются $CD90^+$ или $CD45^-$ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В другом более конкретном варианте осуществления изолированные $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются $CD90^+$ или $CD45^-$ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В более конкретном варианте осуществления, $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются $CD90^+$ или $CD45^-$ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В другом более конкретном варианте осуществления, $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются $CD90^+$ и $CD45^-$ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии. В другом более конкретном варианте осуществления, $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$, $CD90^+$, $CD45^-$ прилипающие плацентарные клетки дополнительно являются $CD8CT$ и $CD86^+$ в соответствии с обнаруженным посредством проточной цитометрии.

В другом варианте осуществления в настоящем изобретении применяется композиция, содержащая NK-клетки, продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированные NK-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники NK), и культуральную среду от культивирования изолированных прилипающих плацентарных клеток, при этом указанные изолированные прилипающие плацентарные клетки (а) прилипают к субстрату и (b) экспрессируют $CD200$ и $HLA-G$, или экспрессируют $CD73$, $CD105$ и $CD200$, или экспрессируют $CD200$ и OCT-4, или экспрессируют $CD73$, $CD105$ и $HLA-G$, или экспрессируют $CD73$ и $CD105$ и способствуют образованию одного или более подобных эмбрионным тел в популяции плацентарных клеток, которая содержит плацентарные стволовые клетки, когда указанную популяцию культивируют в условиях, которые допускают формирование подобных эмбрионным тел, или экспрессируют OCT-4 и способствуют образованию одного или более подобных эмбрионным тел в популяции плацентарных клеток, которая содержит плацентарные стволовые клетки, когда указанную популяцию культивируют в условиях, которые допускают

формирование подобных эмбрионидным тел; при этом указанная композиция детектируемо подавляет рост или пролиферацию опухолевых клеток или является противораковой или противовирусной. В конкретном варианте осуществления композиция дополнительно содержит множество указанных изолированных прилипающих плацентарных клеток. В другом конкретном варианте осуществления композиция содержит множество неплацентарных клеток. В более конкретном варианте осуществления указанные неплацентарные клетки включают в себя клетки CD34⁺, например гематопозитические клетки-предшественники, такие как гематопозитические клетки-предшественники периферической крови, гематопозитические клетки-предшественники пуповинной крови или гематопозитические клетки-предшественники плацентарной крови. Неплацентарные клетки могут также включать в себя стволовые клетки, такие как мезенхимальные стволовые клетки, например полученные из костного мозга мезенхимальные стволовые клетки. Неплацентарные клетки могут также представлять собой один или более типов взрослых клеток или клеточных линий. В другом конкретном варианте осуществления композиция содержит антипролиферативное средство, например антитело анти-MIP-1 α или анти-MIP-1 β .

В конкретном варианте осуществления культуральную среду, кондиционированную одной из клеток или комбинаций клеток, описанных выше, получают из множества изолированных прилипающих плацентарных клеток, совместно культивируемых с множеством опухолевых клеток в соотношении около 1:1, около 2:1, около 3:1, около 4:1 или около 5:1 изолированных прилипающих плацентарных клеток к опухолевым клеткам. Например, кондиционированная культуральная среда или супернатант могут быть получены из культуры, содержащей около 1×10^5 изолированных прилипающих плацентарных клеток, около 1×10^6 изолированных прилипающих плацентарных клеток, около 1×10^7 изолированных прилипающих плацентарных клеток или около 1×10^8 изолированных прилипающих плацентарных клеток или более. В другом конкретном варианте осуществления кондиционированную культуральную среду или супернатант получают из совместной культуры, содержащей от около 1×10^5 до около 5×10^5 изолированных прилипающих плацентарных клеток и около 1×10^5 опухолевых клеток; от около 1×10^6 до около 5×10^6 изолированных прилипающих плацентарных клеток и около 1×10^6 опухолевых клеток; от около 1×10^7 до около 5×10^7 изолированных прилипающих плацентарных клеток и около 1×10^7 опухолевых клеток; или от около 1×10^8 до около 5×10^8 изолированных прилипающих плацентарных клеток и около 1×10^8 опухолевых клеток.

5.2. Способы продуцирования NK-клеток.

NK-клетки могут быть продуцированы из гематопозитических клеток, например гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников из любого источника, например плацентарной ткани, плацентарного перфузата, пуповинной крови, плацентарной крови, периферической крови, селезенки, печени и т.п.

Одним важным источником естественных клеток-киллеров и клеток, которые могут использоваться для получения естественных клеток-киллеров, в соответствии с описанным выше, является плацента, например плацента полного срока, например человеческая плацента полного срока. Плацентарный перфузат содержит клетки плацентарного перфузата, которые могут быть получены, например, посредством способов, раскрытых в патентах США № 7045148 и 7468276 и публикации заявки на патент США № 2009/0104164, раскрытия каждого из которых включены в настоящее описание во всей их полноте.

5.2.1. Композиция для сбора клеток.

Плацентарный перфузат и клетки перфузата, из которых могут быть изолированы гематопозитические стволовые клетки или клетки-предшественники или которые являются полезными в подавлении опухоли или лечении индивида, имеющего опухолевые клетки, рак или вирусную инфекцию, например, в комбинации с NK-клетками, например популяциями NK-клеток, продуцированными в соответствии с трехэтапным способом, представленным в настоящем раскрытии, могут быть собраны посредством перфузии через послеродовую плаценту млекопитающего, например человека, с применением плацентарной композиции для сбора клеток. Перфузат может быть собран из плаценты посредством перфузии через плаценту любого физиологически приемлемого раствора, например физиологического раствора, культуральной среды или более сложной композиции для сбора клеток. Композиция для сбора клеток, подходящая для перфузии через плаценту и для сбора и сохранения клеток перфузата, описывается подробно в родственной заявке на патент США № 2007/0190042, которая включена в настоящее изобретение посредством ссылки во всей ее полноте.

Композиция для сбора клеток может содержать любой физиологически приемлемый раствор, подходящий для сбора и/или культивирования стволовых клеток, например физиологический раствор (например, фосфатно-солевой буферный раствор, раствор Кребса, модифицированный раствор Кребса, раствор Игла, 0,9% NaCl и т.д.), культуральная среда (например, DMEM, H.DMEM и т.д.) и т.п.

Композиция для сбора клеток может содержать один или более компонентов, которые имеют тенденцию к сохранению плацентарных клеток, т.е. могут препятствовать тому, чтобы плацентарные клетки умерли, или могут задерживать смерть плацентарных клеток, сокращать количество плацентарных клеток в популяции клеток, которые умирают и т.п., с момента сбора до момента культивирования. Такие компоненты могут представлять собой, например, ингибитор апоптоза (например, ингибитор каспазы

или ингибитор JNK); сосудорасширяющее средство (например, сульфат магния, гипотензивное средство, предсердный натрийуретический пептид (ANP), адренокортикотропин, кортикотропин-высвобождающий гормон, пентацианонитрозо-железо(3)-кислый натрий, гидралазин, аденозинтрифосфат, аденозин, индометацин или сульфат магния, ингибитор фосфодиэстеразы и т.д.); ингибитор некроза (например, 2-(1H-индол-3-ил)-3-пентиламино-малеимид, пирролидиндитиокарбамат или клоназепам); ингибитор TNF- α и/или несущий кислород перфторуглерод (например, перфтороктил бромид, перфтордецил бромид и т.д.).

Композиция для сбора клеток может содержать один или более разлагающих ткань ферментов, например металлопротеазу, сывороточную протеазу, нейтральную протеазу, гиалуронидазу, РНКазу или ДНКазу и т.п. Такие ферменты включают в себя, но не ограничены указанным, коллагеназы (например, коллагеназу I или IV, коллагеназу из *Clostridium histolyticum* и т.д.); диспазу, термолизин, эластазу, трипсин, либериазу, гиалуронидазу и т.п.

Композиция для сбора клеток может содержать бактерицидно или бактериостатически эффективное количество антибиотика. В определенных неограничивающих вариантах осуществления антибиотик представляет собой макролид (например, тобрамицин), цефалоспорин (например, цефалексин, цефтрадин, цефуроксим, цефпрозил, цефаклор, цефиксим или цефадроксил), клэритромицин, эритромицин, пенициллин (например, пенициллин V) или хинолон (например, офлоксацин, цiproфлоксацин или норфлоксацин), тетрациклин, стрептомицин и т.д. В конкретном варианте осуществления антибиотик является активным против грамположительных и/или грамотрицательных бактерий, например *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и т.п.

Композиция для сбора клеток может также содержать одно или более следующих соединений:

аденозин (от около 1 до около 50 мкМ);

D-глюкоза (от около 20 до около 100 мкМ);

ионы магния (от около 1 до около 50 мкМ);

макромолекула с молекулярным весом более чем 20000 Да в одном из вариантов осуществления, присутствующая в количестве, достаточном для поддержания целостности эндотелия и клеточной жизнеспособности (например, синтетический или естественный коллоид, полисахарид, такой как декстран или полиэтиленгликоль, присутствующий в количестве от около 25 до около 100 г/л или от около 40 до около 60 г/л);

антиоксидант (например, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, глутатион, витамин С или витамин Е, присутствующие в концентрации от около 25 до около 100 мкМ);

восстановитель (например, N-ацетилцистеин, присутствующий в концентрации от около 0,1 до около 5 мкМ);

средство, которое предотвращает поступление кальция в клетки (например, верапамил, присутствующий в концентрации от около 2 до около 25 мкМ);

нитроглицерин (например, от около 0,05 до около 0,2 г/л);

противосвертывающее средство, в одном из вариантов осуществления, присутствующее в количестве, достаточном, чтобы помочь предотвратить свертывание остаточной крови (например, гепарин или гирудин, присутствующие в концентрации от около 1000 до около 100000 единиц/л); или

содержащее амилорид соединения (например, амиролид, этилизопропил амиролид, циклогексан амиролид, этан амиролид или изобутил амиролид, присутствующие в количестве от около 1,0 до около 5 мкМ).

5.2.2. Сбор и обработка плаценты.

Обычно человеческую плаценту извлекают вскоре после ее выталкивания после рождения. В одном из вариантов осуществления плаценту извлекают из пациента после получения информированного согласия и после того, как полная история болезни пациента была получена и ассоциирована с плацентой. В одном из вариантов осуществления история болезни продолжается после родов.

До восстановления перфузата удаляются пуповинная кровь и плацентарная кровь. В определенных вариантах осуществления после родов извлекают пуповинную кровь из плаценты. Плацента может быть подвергнута обычному процессу извлечения пуповинной крови. Обычно игла или канюля используются при помощи силы тяжести, для того, чтобы обескровить плаценту (см., например, Андерсон, патент США № 5372581; Гессель et al., патент США № 5415665). Игла или канюля обычно размещаются в пупочной вене, и плацента может мягко массироваться в целях способствования дренирования пуповинной крови из плаценты. Такое извлечение пуповинной крови может быть выполнено коммерчески, например, компаниями LifeBank Inc., Cedar Knolls, N.J., ViaCord, Cord Blood Registry и CryoCell. В одном из вариантов осуществления дренирование плаценты выполняется посредством свободного вытекания, без дополнительных манипуляций, с тем чтобы минимизировать разрыв ткани во время извлечения пуповинной крови.

Как правило, плацента транспортируется из родильного зала или родовой палаты в другое место, например лабораторию, для извлечения пуповинной крови и сбора перфузата. Плацента может транспортироваться в стерильном теплоизолированном устройстве транспортировки (поддерживающем темпера-

туру плаценты в диапазоне 20-28°C), например, путем помещения плаценты, с зажатым внутренним концом пуповины, в стерильный герметизируемый полиэтиленовый пакет, который затем размещают в изо-термическом контейнере. В другом варианте осуществления плаценту транспортируют в наборе для сбора пуповинной крови, по существу таком, как описан в патенте США № 7147626. В одном из вариантов осуществления плаценту доставляют в лабораторию в течение от 4 до 24 ч после родов. В определенных вариантах осуществления внутренний конец пуповины зажимают, например, в пределах 4-5 см от вставки в плацентарный диск до извлечения пуповинной крови. В других вариантах осуществления внутренний конец пуповины зажимают после извлечения пуповинной крови, но до дальнейшей обработки плаценты.

Плацента, до сбора перфузата, может храниться в стерильных условиях при комнатной температуре или при температуре 5-25°C (по шкале Цельсия). Плацента может храниться в течение периода более чем 48 ч или в течение периода от 4 до 24 ч до выполнения перфузии через плаценту, с тем чтобы удалить любую остаточную пуповинную кровь. Плацента может храниться в растворе противосвертывающего средства при температуре от 5 до 25°C (по шкале Цельсия). Соответствующие растворы противосвертывающего средства известны в технике. Например, может использоваться раствор гепарина или варфарина натрия. В одном из вариантов осуществления раствор противосвертывающего средства содержит раствор гепарина (например, 1% вес./вес. в растворе 1:1000). В некоторых вариантах осуществления обескровленная плацента хранится в течение не более чем 36 ч до того, как будет собран плацентарный перфузат.

5.2.3. Плацентарная перфузия.

Способы выполнения перфузии через плаценту млекопитающего и получения плацентарного перфузата раскрываются, например, в Харири, патенты США № 7045148 и 7255879, и в публикациях заявок на патент США № 2009/0104164, 2007/0190042 и 20070275362, выпущенных как патент США № 8057788, раскрытия каждого из которых включены в настоящее изобретение посредством ссылки во всей их полноте.

Перфузат может быть получен путем прохождения перфузионного раствора, например физиологического раствора, культуральной среды или композиций для сбора клеток, описанных выше, через плацентарную сосудистую сеть. В одном из вариантов осуществления перфузию через плаценту млекопитающего выполняют путем прохождения перфузионного раствора через пупочную артерию, или пупочную вену, или через них обеих. Поток перфузионного раствора через плаценту может быть осуществлен, например, через протекание посредством свободного вытекания. Например, перфузионный раствор проталкивают через плаценту с использованием насоса, например перистальтического насоса. Пупочная вена может быть, например, канюлирована с помощью канюли, например тефлоновой (TEFLON®) или пластиковой канюли, которая соединена со стерильным соединяющим устройством, таким как стерильный трубопровод. Стерильное соединяющее устройство соединяют с коллектором перфузии.

При подготовке к перфузии плацента может быть ориентирована таким образом, чтобы пупочная артерия и пупочная вена располагались в самой высокой точке плаценты. Плацента может быть подвергнута перфузии путем прохождения перфузионного раствора через плацентарную сосудистую сеть или через плацентарную сосудистую сеть и окружающую ткань. В одном из вариантов осуществления пупочную артерию и пупочную вену одновременно соединяют с пипеткой, которая соединяется через гибкий соединитель с резервуаром перфузионного раствора. Перфузионный раствор проходит в пупочную вену и артерию. Перфузионный раствор выделяется из и/или проходит через стенки кровеносных сосудов в окружающие ткани плаценты и собирается в соответствующем сосуде открытого типа с поверхности плаценты, которая была присоединена к матке матери во время беременности. Перфузионный раствор может также быть введен путем открытия пуповины и обеспечения возможности протекания или просачивания из отверстий в стенке плаценты, которая соединялась со стенкой матки матери. В другом варианте осуществления перфузионный раствор проходит через пупочные вены и собирается из пупочной артерии, или проходит через пупочную артерию и собирается из пупочных вен, т.е. проходит только через плацентарную сосудистую сеть (эмбриональную ткань).

В одном из вариантов осуществления, например, пупочная артерия и пупочная вена соединяются одновременно, например, с пипеткой, которая соединяется через гибкий соединитель с резервуаром перфузионного раствора. Перфузионный раствор проходит в пупочную вену и артерию. Перфузионный раствор выделяется из и/или проходит через стенки кровеносных сосудов в окружающие ткани плаценты и собирается в соответствующем сосуде открытого типа с поверхности плаценты, которая была присоединена к матке матери во время беременности. Перфузионный раствор может также быть введен путем открытия пуповины и обеспечения возможности протекания или просачивания из отверстий в стенке плаценты, которая соединялась со стенкой матки матери. Плацентарные клетки, которые собирают этим способом, который может называться "методом кюветы", обычно представляют собой смесь эмбриональных и материнских клеток.

В другом варианте осуществления перфузионный раствор проходит через пупочные вены и собирается из пупочной артерии или проходит через пупочную артерию и собирается из пупочных вен. Плацентарные клетки, собранные этим способом, который может называться способом "замкнутого конту-

ра", обычно являются практически исключительно эмбриональными.

Способ перфузии замкнутого контура в одном из вариантов осуществления может быть выполнен следующим образом. Послеродовую плаценту получают в течение около 48 ч после рождения. Пуповину зажимают и отрезают выше зажима. Пуповина может быть утилизирована или может быть обработана с целью извлечения, например, стволовых клеток пуповины и/или обработки мембраны пуповины для производства биоматериала. Амниотическая мембрана может быть сохранена во время перфузии или может быть отделена от хориона, например, с применением тупого отделения пальцами. Если амниотическую мембрану отделяют от хориона до перфузии, она может быть, например, утилизирована или обработана, например, с целью получения стволовых клеток посредством ферментативного расщепления или для производства, например, амниотического мембранного биоматериала, например биоматериала, описанного в публикации заявки на патент США № 2004/0048796. После очистки плаценты от всех видимых кровяных сгустков и остаточной крови, например, с использованием стерильной марли сосуды пуповины раскрывают, например, путем частичного разрезания мембраны пуповины, с тем чтобы раскрыть поперечное сечение пуповины. Сосуды идентифицируют и открывают, например, путем продвижения закрытого зажима типа "крокодил" через разрезанный конец каждого сосуда. Устройство, например пластмассовую трубку, соединенную с устройством перфузии или перистальтическим насосом, затем вставляют в каждую из плацентарных артерий. Насос может быть любым насосом, подходящим для данной цели, например перистальтическим насосом. Пластмассовую трубку, соединенную со стерильным накопительным резервуаром, например мешком для крови, таким как 250 мл мешок для сбора крови, затем вставляют в плацентарную вену. Альтернативно, трубку, соединенную с насосом, вставляют в плацентарную вену и трубки к накопительному(ым) резервуару(ам) вставляют в одну или обе плацентарные артерии. Плаценту затем подвергают перфузии с некоторым объемом перфузионного раствора, например около 750 мл перфузионного раствора. Клетки в перфузате затем собирают, например, посредством центрифугирования.

В одном из вариантов осуществления внутренний конец пуповины зажимают во время перфузии и, более конкретно, может быть зажато в пределах 4-5 см (сантиметров) вставки пуповины в плацентарный диск.

Первый сбор жидкости перфузии из плаценты млекопитающего во время процесса кровоизвлечения обычно окрашен остаточными эритроцитами пуповинной крови и/или плацентарной крови. Жидкость перфузии становится более бесцветной с продолжением перфузии и вымыванием остаточных клеток пуповинной крови из плаценты. Обычно от 30 до 100 мл жидкости перфузии является подходящим для первоначального вымывания крови из плаценты, но больше или меньше жидкости перфузии может использоваться в зависимости от наблюдаемых результатов.

В определенных вариантах осуществления пуповинную кровь удаляют из плаценты до перфузии (например, посредством свободного стекания), но плаценту не промывают (например, подвергают перфузии) раствором для удаления остаточной крови. В определенных вариантах осуществления пуповинную кровь удаляют из плаценты до перфузии (например, посредством свободного стекания), и плаценту промывают (например, подвергают перфузии) раствором для удаления остаточной крови.

Объем жидкости перфузии, используемый для выполнения перфузии через плаценту, может изменяться в зависимости от количества плацентарных клеток, которые должны быть собраны, размера плаценты, количества сборов, которое должно быть сделано для одной плаценты и т.д. В различных вариантах осуществления объем жидкости перфузии может составлять от 50 до 5000 мл, от 50 до 4000 мл, от 50 до 3000 мл, от 100 до 2000 мл, от 250 до 2000 мл, от 500 до 2000 мл или от 750 до 2000 мл. Как правило, перфузию через плаценту выполняют 700-800 мл жидкости перфузии после кровоизвлечения.

Плацента может подвергаться перфузии множество раз в течение нескольких часов или нескольких дней. Если плацента должна быть подвергнута перфузии множество раз, она может поддерживаться или культивироваться в асептических условиях в контейнере или другом подходящем сосуде и подвергаться перфузии композицией для сбора клеток или стандартным перфузионным раствором (например, физиологическим раствором, таким как фосфатно-солевой буферный раствор ("PBS") с противосвертывающим средством или без него (например, гепарин, варфарин натрия, кумарин, бис-гидроксикумарин) и/или с антимикробной добавкой или без нее (например, β -меркаптоэтанол (0,1 mM); с антибиотиками, такими как стрептомицин (например, в концентрации 40-100 мкг/мл), пенициллин (например, в концентрации 40 ед./мл), амфотерицин В (например, в концентрации 0,5 мкг/мл). В одном из вариантов осуществления изолированная плацента поддерживается или культивируется в течение некоторого периода времени без сбора перфузата таким образом, что плацента поддерживается или культивируется в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 ч или 2, или 3, или более дней до перфузии и сбора перфузата. Перфузированная плацента может поддерживаться в течение одного или более дополнительных периодов времени, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ч или более, и подвергаться перфузии во второй раз, например 700-800 мл жидкости перфузии. Плацента может подвергаться перфузии 1, 2, 3, 4, 5 или более раз, например один раз в каждые 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ч. В одном из вариантов осуществления перфузию через плаценту и сбор перфузионного раствора, например композиции для сбора плацентарных клеток, повторяют до тех пор, пока количество

извлекаемых клеток не упадет ниже 100 клеток/мл. Перфузаты в различные моменты времени могут быть дополнительно обработаны индивидуально в целях извлечения зависящих от времени популяций клеток, например тотальных содержащих ядро клеток. Перфузаты, полученные в различные моменты времени, также могут быть объединены.

5.2.4. Плацентарный перфузат и клетки плацентарного перфузата.

Как правило, плацентарный перфузат от единственной плацентарной перфузии содержит от около 100 до около 500 миллионов имеющих ядро клеток, включая гематопозитические клетки, из которых NK-клетки, например NK-клетки, продуцированные согласно трехэтапному способу, описанному в настоящем раскрытии, могут быть продуцированы посредством способа, раскрытого в настоящем раскрытии. В определенных вариантах осуществления плацентарный перфузат или клетки перфузата включают в себя CD34⁺ клетки, например стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники. Такие клетки, в более конкретном варианте осуществления, могут содержать стволовые клетки или клетки-предшественники CD34⁺CD45, стволовые клетки или клетки-предшественники CD34⁺CD45⁺ и т.п. В определенных вариантах осуществления перфузат или клетки перфузата хранятся посредством криоамортизации до изоляции из них гематопозитических клеток. В определенных других вариантах осуществления плацентарный перфузат содержит, или клетки перфузата содержат, только эмбриональные клетки или комбинацию эмбриональных клеток и материнских клеток.

5.2.5. Гематопозитические клетки.

В различных вариантах осуществления NK-клетки продуцируют из гематопозитических клеток, например гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников.

Гематопозитические клетки при использовании в настоящем изобретении могут представлять собой любые гематопозитические клетки, способные дифференцироваться в NK-клетки, например клетки-предшественники, гематопозитические клетки-предшественники, стволовые гематопозитические клетки и т.п. Гематопозитические клетки могут быть получены из источников ткани, таких как, например, костный мозг, пуповинная кровь, плацентарная кровь, периферическая кровь, печень и т.п. или комбинации указанного. Гематопозитические клетки могут быть получены из плаценты. В конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки получают из плацентарного перфузата. Гематопозитические клетки из плацентарного перфузата могут содержать смесь эмбриональных и материнских гематопозитических клеток, например, смесь, в которой материнские клетки составляют более чем 5% общего количества гематопозитических клеток. В одном из вариантов осуществления гематопозитические клетки из плацентарного перфузата содержат по меньшей мере около 90, 95, 98, 99 или 99,5% эмбриональных клеток.

В другом конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки, например стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники, получают из плацентарного перфузата, пуповинной крови или периферической крови. В другом конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки, например стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники, представляют собой объединенные клетки из плацентарного перфузата и пуповинной крови, например, пуповинной крови из той же самой плаценты, что и перфузат. В другом конкретном варианте осуществления указанная пуповинная кровь выделяется из плаценты, отличной от плаценты, из которой получают указанный плацентарный перфузат. В определенных вариантах осуществления объединенные клетки могут быть получены путем объединения в пул или объединения пуповинной крови и плацентарного перфузата. В определенных вариантах осуществления пуповинная кровь и плацентарный перфузат объединяют в соотношении 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 и т.п. по объему для получения объединенных клеток. В конкретном варианте осуществления пуповинную кровь и плацентарный перфузат объединяют в соотношении от 10:1 до 1:10, от 5:1 до 1:5 или от 3:1 до 1:3. В другом конкретном варианте осуществления пуповинную кровь и плацентарный перфузат объединяют в соотношении 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 или 1:10. В более конкретном варианте осуществления пуповинную кровь и плацентарный перфузат объединяют в соотношении 8,5:1,5 (85%:15%).

В определенных вариантах осуществления пуповинную кровь и плацентарный перфузат объединяют в соотношении 100:1, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 65:35, 60:40, 55:45, 50:50, 45:55, 40:60, 35:65, 30:70, 25:75, 20:80, 15:85, 10:90, 5:95, 100:1, 95:1, 90:1, 85:1, 80:1, 75:1, 70:1, 65:1, 60:1, 55:1, 50:1, 45:1, 40:1, 35:1, 30:1, 25:1, 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100 и т.п. по суммарному содержанию имеющих ядро клеток (TNC) для получения объединенных клеток. В конкретном варианте осуществления пуповинную кровь и плацентарный перфузат объединяют в соотношении от 10:1 до 1:10, от 5:1 до 1:5 или от 3:1 до 1:3. В другом конкретном варианте осуществления пуповинную кровь и плацентарный перфузат объединяют в соотношении 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 или 1:10.

В другом конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки, например стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники, берут и из пуповинной крови и из плацентарного перфузата, но при этом указанную пуповинную кровь выделяют из плаценты, отличной от плаценты, из

которой получают указанный плацентарный перфузат.

В определенных вариантах осуществления гематопозитические клетки являются клетками $CD34^+$. В конкретных вариантах осуществления гематопозитические клетки, целесообразные в способах, раскрытых в настоящем раскрытии, являются $CD34^+CD38^+$ или $CD34^+CD38^-$. В более конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки являются $CD34^+CD38^+Lin^-$. В другом конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки являются одним или более из $CD2^+$, $CD3^+$, $CD11b^+$, $CD11c^+$, $CD14^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $CD24^+$, $CD56^+$, $CD66b^+$ и/или гликофорин A⁺. В другом конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки являются $CD2^+$, $CD3^+$, $CD11b^+$, $CD11c^+$, $CD14^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $CD24^+$, $CD56^+$, $CD66b^+$ и гликофорин A⁺. В другом более конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки являются $CD34^+CD38^+CD33^+CD117^-$. В другом более конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки являются $CD34^+CD38^+CD33^+CD117^+CD235^+CD36^-$.

В другом варианте осуществления гематопозитические клетки являются $CD45^+$. В другом конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки являются $CD34^+CD45^+$. В другом варианте осуществления гематопозитическая клетка является $Thy-1^+$. В конкретном варианте осуществления гематопозитическая клетка является $CD34^+Thy-1^+$. В другом варианте осуществления гематопозитические клетки являются $CD133^+$. В конкретных вариантах осуществления гематопозитические клетки являются $CD34^+CD133^+$ или $CD133^+Thy-1^+$. В другом конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки $CD34^+$ являются $CXCR4^+$. В другом конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки $CD34^+$ являются $CXCR4^-$. В другом варианте осуществления гематопозитические клетки являются положительными по KDR (рецептор 2 сосудистого фактора роста). В конкретных вариантах осуществления гематопозитические клетки являются $CD34^+KDR^+$, $CD133^+KDR^+$ или $Thy-1^+KDR^+$. В определенных других вариантах осуществления гематопозитические клетки являются положительными по альдегиддегидрогеназе (ALDH⁺), например, клетками $CD34^+ALDH^+$.

В определенных других вариантах осуществления клетки $CD34^+$ являются $CD45^-$. В конкретных вариантах осуществления клетки $CD34^+$, например клетки $CD34^+$, $CD45^-$, экспрессируют одну или более, или все, миРНК hsa-miR-380, hsa-miR-512, hsa-miR-517, hsa-miR-518c, hsa-miR-519b и/или hsa-miR-520a.

В определенных вариантах осуществления гематопозитические клетки являются $CD34^+$.

Гематопозитические клетки могут также не иметь определенных маркеров, которые показывают детерминацию клеточной дифференцировки или отсутствие "необученности" в развитии. Например, в другом варианте осуществления гематопозитические клетки являются $HLA-DR^-$. В конкретных вариантах осуществления гематопозитические клетки являются $CD34^+HLA-DR^-$, $CD133^+HLA-DR^-$, $Thy-1^+HLA-DR^-$ или $ALDH^+HLA-DR^-$. В другом варианте осуществления гематопозитические клетки являются отрицательными по одному или более, предпочтительно по всем, маркерам клеточной линии $CD2$, $CD3$, $CD11b$, $CD11c$, $CD14$, $CD16$, $CD19$, $CD24$, $CD56$, $CD66b$ и гликофору A.

Таким образом, гематопозитические клетки могут быть отобраны для применения в способах, раскрытых в настоящем изобретении, на основании наличия маркеров, которые указывают недифференцированное состояние, или на основании отсутствия маркеров клеточной линии, указывающих, что по меньшей мере некоторая дифференцировка клеточной линии имела место. Способы изоляции клеток, включая гематопозитические клетки, на основании наличия или отсутствия конкретных маркеров подробно обсуждаются ниже.

Гематопозитические клетки, при использовании в настоящем раскрытии, могут представлять собой по существу однородную популяцию, например популяцию, содержащую по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% гематопозитических клеток из единственного источника ткани, или популяцию, содержащую гематопозитические клетки, демонстрирующие одни и те же ассоциированные с гематопозитическими клетками клеточные маркеры. Например, в различных вариантах осуществления гематопозитические клетки могут содержать по меньшей мере около 95, 98 или 99% гематопозитических клеток из костного мозга, пуповинной крови, плацентарной крови, периферической крови или плаценты, например, перфузата плаценты.

Гематопозитические клетки при использовании в настоящем изобретении могут быть получены от одного индивида, например из единственной плаценты, или от множества индивидов, например, могут быть объединены в пул. Если гематопозитические клетки получают от множества индивидов и объединяют в пул, гематопозитические клетки могут быть получены из одного и того же источника ткани. Таким образом, в различных вариантах осуществления все объединенные в пул гематопозитические клетки взяты из плаценты, например плацентарного перфузата, все взяты из плацентарной крови, все взяты из пуповинной крови, все взяты из периферической крови и т.п.

Гематопозитические клетки при использовании в настоящем изобретении в определенных вариантах осуществления могут включать в себя гематопозитические клетки из двух или более источников ткани. Например, в определенных вариантах осуществления, когда гематопозитические клетки из двух или более источников объединяют для использования в способах по настоящему раскрытию, множество гематопозитических клеток, используемое для продуцирования NK-клеток, включает в себя гематопозитические клетки из плаценты, например перфузата плаценты. В различных вариантах осуществления гематопозитические клетки, используемые для продуцирования NK-клеток, включают в себя гематопозитические клет-

ки из плаценты и из пуповинной крови; из плаценты и периферической крови; из плаценты и плацентарной крови, или плаценты и костного мозга. В предпочтительном варианте осуществления гематопозитические клетки включают в себя гематопозитические клетки из плацентарного перфузата в комбинации с гематопозитическими клетками из пуповинной крови, при этом пуповинная кровь и плацента взяты из одного и того же индивида, т.е. при этом перфузат и пуповинная кровь сочетаются друг с другом. В вариантах осуществления, в которых гематопозитические клетки включают в себя гематопозитические клетки из двух источников ткани, гематопозитические клетки из этих источников могут быть объединены в соотношении, например, 1:10, 2:9, 3:8, 4:7, 5:6, 6:5, 7:4, 8:3, 9:2, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1 или 9:1.

5.2.5.1. Плацентарные стволовые гематопозитические клетки.

В определенных вариантах осуществления гематопозитические клетки представляют собой плацентарные гематопозитические клетки. При использовании в настоящем изобретении "плацентарные гематопозитические клетки" означают гематопозитические клетки, полученные непосредственно из плаценты, а не из плацентарной крови или из пуповинной крови. В одном из вариантов осуществления плацентарные гематопозитические клетки являются $CD34^+$. В конкретном варианте осуществления плацентарные гематопозитические клетки преимущественно (например, по меньшей мере около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98%) являются клетками $CD34^+CD38^-$. В другом конкретном варианте осуществления плацентарные гематопозитические клетки преимущественно (например, по меньшей мере около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98%) являются клетками $CD34^+CD38^+$. Плацентарные гематопозитические клетки могут быть получены из послеродовой плаценты млекопитающего (например, человека) любыми средствами, известными специалистам в данной области техники, например, посредством перфузии.

В другом варианте осуществления плацентарная гематопозитическая клетка является $CD45^-$. В конкретном варианте осуществления гематопозитическая клетка является $CD34^+CD45^-$. В другом конкретном варианте осуществления плацентарные гематопозитические клетки являются $CD34^+CD45^+$.

5.2.6. Способы продуцирования клеток PiNK.

В различных вариантах осуществления клетки PiNK получают из плацентарных клеток. В конкретных вариантах осуществления плацентарные клетки получают из плацентарного перфузата, например человеческого плацентарного перфузата. В конкретных вариантах осуществления плацентарные клетки получают из плацентарной ткани, которая была механически и/или ферментативно разорвана.

5.2.6.1. Получение клеток PiNK из плацентарного перфузата.

В одном из вариантов осуществления клетки PiNK собирают путем получения плацентарного перфузата, последующего контактирования плацентарного перфузата с композицией, которая специфично связывает клетки $CD56^+$, например, антителом против $CD56$, после чего производится изоляция клеток $CD56^+$ на основании указанного связывания, с тем чтобы сформировать популяцию клеток $CD56^+$. Популяция клеток $CD56^+$ включает в себя изолированную популяцию NK-клеток. В конкретном варианте осуществления клетки $CD56^+$ контактируют с композицией, которая специфично связывается с клетками $CD16^+$, например, антителом против $CD16$, и клетки $CD16^+$ исключают из популяции клеток $CD56^+$. В другом конкретном варианте осуществления клетки $CD3^+$ также исключают из популяции клеток $CD56^+$.

В одном из вариантов осуществления клетки PiNK получают из плацентарного перфузата следующим образом. Послеродовую человеческую плаценту обескровливают и подвергают перфузии, например, около 200-800 мл перфузионного раствора, только через плацентарную сосудистую сеть. В конкретном варианте осуществления плаценту дренируют от пуповинной крови и промывают, например, перфузионным раствором, через плацентарную сосудистую сеть, с тем чтобы удалить остаточную кровь до выполнения указанной перфузии. Перфузат собирают и обрабатывают, с тем чтобы удалить любые остаточные эритроциты. Естественные клетки-киллеры в тотальных содержащих ядро клетках в перфузате могут быть изолированы на основании экспрессии $CD56$ и $CD16$. В определенных вариантах осуществления изоляция клеток PiNK включает в себя изоляцию с применением антитела к $CD56$, при этом изолированные клетки являются $CD56^+$. В другом варианте осуществления изоляция клеток PiNK включает в себя изоляцию с применением антитела к $CD16$, при этом изолированные клетки являются $CD16^+$. В другом варианте осуществления изоляция клеток PiNK включает в себя изоляцию с применением антитела к $CD56$ и исключение множества не являющихся PiNK клеток с применением антитела к $CD16$, при этом изолированные клетки включают в себя клетки $CD56^+$, $CD16^-$.

Разделение клеток может быть выполнено любым способом, известным в технике, например посредством сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) или предпочтительно магнитной сортировки клеток с использованием микрогранул, конъюгированных со специфичными антителами. Магнитное разделение клеток может быть выполнено и автоматизировано с применением, например, сепаратора AUTOMACS™ (Miltenyi).

В другом аспекте процесс изоляции плацентарных NK-клеток (например, клеток PiNK) включает в себя получение множества плацентарных клеток и изоляцию естественных клеток-киллеров из указанного множества плацентарных клеток. В конкретном варианте осуществления плацентарные клетки представляют собой или содержат клетки плацентарного перфузата, например тотальные содержащие ядро клетки из плацентарного перфузата. В другом конкретном варианте осуществления указанное множество

плацентарных клеток представляет собой или содержит плацентарные клетки, полученные механическим и/или ферментативным расщеплением плацентарной ткани. В другом варианте осуществления указанную изоляцию выполняют с применением одного или более антител. В более конкретном варианте осуществления указанные одно или более антител включают в себя одно или более антител к CD3, CD16 или CD56. В более конкретном варианте осуществления указанная изоляция включает в себя изоляцию клеток CD56⁺ от клеток CD56⁻ в указанном множестве плацентарных клеток. В более конкретном варианте осуществления указанная изоляция включает в себя изоляцию плацентарных клеток CD56⁺, CD16⁻, например, плацентарных естественных клеток-киллеров, например, клеток PiNK, от плацентарных клеток, которые являются CD56⁻ или CD16⁺. В более конкретном варианте осуществления указанная изоляция включает в себя изоляцию плацентарных клеток CD56⁺, CD16⁻, CD3⁻ от плацентарных клеток, которые являются CD56⁻, CD16⁺ или CD3⁺. В другом варианте осуществления указанный процесс изоляции плацентарных естественных клеток-киллеров приводит к формированию популяции плацентарных клеток, которая содержит по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или по меньшей мере 99% естественных клеток-киллеров CD56⁺, CD16⁻.

В определенных вариантах осуществления плацентарные NK-клетки, например, клетки PiNK, были расширены в культуре. В определенных других вариантах осуществления клетки плацентарного перфузата были расширены в культуре. В конкретном варианте осуществления указанные клетки плацентарного перфузата были расширены в присутствии питающего слоя и/или в присутствии по меньшей мере одного цитокина. В более конкретном варианте осуществления указанный питающий слой содержит клетки K562 или мононуклеары периферической крови. В другом более конкретном варианте осуществления указанный по меньшей мере один цитокин представляет собой интерлейкин-2. В конкретных вариантах осуществления клетки PiNK культивировались, например расширялись в культуре, в течение по меньшей мере около или самое большее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней. В конкретном варианте осуществления клетки PiNK культивируют в течение около 21 дня.

5.2.6.2. Разрыв и расщепление плацентарной ткани с целью получения клеток PiNK.

Плацентарные NK-клетки, например клетки PiNK, могут также быть получены из плацентарной ткани, которая была механически и/или ферментативно разорвана.

Плацентарная ткань может быть разорвана с применением одного или более разлагающих тканей ферментов, например металлопротеазы, серин-протеазы, нейтральной протеазы, РНК-азы или ДНК-азы и т.п. Такие ферменты включают, но не ограничены указанным, коллагеназы (например, коллагеназа I или IV, коллагеназа из *Clostridium histolyticum* и т.д.); диспазу, термолизин, эластазу, трипсин, либеразу, гиалуронидазу и т.п. Обычно после расщепления расщепленную ткань пропускают через натягиватель или фильтр, чтобы удалить частично расщепленные скопления клеток, оставляя по существу одноклеточную суспензию.

После того как суспензия плацентарных клеток была получена, естественные клетки-киллеры могут быть изолированы с использованием, например, антител к CD3 и CD56. В конкретном варианте осуществления плацентарные естественные клетки-киллеры изолируют путем отбора клеток, которые являются CD56⁺, с получением первой популяции клеток; производят контактирование указанной первой популяции клеток с антителами, специфичными для CD3 и/или CD16; и удаляют клетки из указанной первой популяции клеток, которые являются CD3⁺ или CD56⁺, посредством чего получают вторую популяцию клеток, которая является по существу CD56⁺ и CD3⁻, CD56⁺ и CD16⁻ или CD56⁺, CD3⁻ и CD16⁻.

В одном из вариантов осуществления магнитные гранулы используют для изолирования плацентарных естественных клеток-киллеров из суспензии плацентарных клеток. Клетки могут быть изолированы, например, с применением методики магнитно активируемой сортировки клеток (MACS), способа для разделения частиц на основании их способности связывать магнитные гранулы (например, диаметром около 0,5-100 мкм), которые содержат одно или более специфичных антител, например антител против CD56. Множество полезных модификаций может быть выполнено на магнитных микросферах, включая ковалентное добавление антитела, которое специфично распознает конкретную молекулу поверхности клеток или гаптен. Гранулы затем смешивают с клетками, чтобы обеспечить возможность связывания. Клетки затем проходят через магнитное поле, с тем чтобы выделить клетки, имеющие конкретный маркер поверхности клеток. В одном из вариантов осуществления эти клетки могут затем быть изолированы и повторно смешаны с магнитными гранулами, соединенными с антителом против дополнительных маркеров поверхности клеток. Клетки снова проходят через магнитное поле, в результате чего выделяют клетки, которые связываются с обоими антителами. Такие клетки могут затем быть разведены в отдельных кюветах, таких как кюветы для микротитрования, в целях клональной изоляции.

5.2.7. Способы продуцирования активированных NK-клеток.

Активированные NK-клетки могут быть продуцированы из гематопозитических клеток, которые описаны выше. В определенном варианте осуществления активированные NK-клетки продуцируют из расширенных гематопозитических клеток, например гематопозитических стволовых клеток и/или гематопозитических клеток-предшественников. В конкретном варианте осуществления гематопозитические клетки расширяются и дифференцируются непрерывно в первой среде без использования питающих клеток.

Клетки затем культивируют во второй среде в присутствии питающих клеток. Такая изоляция, расширение и дифференцировка могут быть выполнены на централизованном производстве, которое предоставляет расширенные гематопозитические клетки для доставки в целях децентрализованного расширения и дифференцировки в точки использования, например больницы, военные базы, на линию фронта и т.п.

В некоторых вариантах осуществления продуцирование активированных НК-клеток включает в себя расширение популяции гематопозитических клеток. Во время расширения клеток множество гематопозитических клеток в пределах гематопозитической популяции клеток дифференцируется в НК-клетки.

В одном из вариантов осуществления процесс продуцирования популяции активированных естественных клеток-киллеров (НК) включает в себя (а) высевание популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в первой среде, содержащей интерлейкин-15 (IL-15) и, необязательно, один или более из фактора стволовых клеток (SCF) и интерлейкина-7 (IL-7), при этом указанный IL-15 и необязательные SCF и IL-7 не содержатся в пределах неопределенного компонента указанной среды, в результате чего популяция расширяется и множество гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в пределах указанной популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников дифференцируется в НК-клетки во время указанного расширения; и (b) расширение клеток с этапа (а) во второй среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2), с тем чтобы продуцировать популяцию активированных НК-клеток.

В другом варианте осуществления активированные НК-клетки в соответствии с описанным в настоящем изобретении продуцируют посредством двухэтапного процесса расширения/дифференцирования и созревания НК-клеток. Первые и вторые этапы включают в себя культивирование клеток в средах с уникальной комбинацией клеточных факторов. В определенных вариантах осуществления процесс включает в себя (а) культивирование и расширение популяции гематопозитических клеток в первой среде, при этом множество гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в пределах гематопозитической популяции клеток дифференцируется в НК-клетки; и (b) расширение НК-клеток с этапа (а) во второй среде, при этом НК-клетки дополнительно расширяются и дифференцируются, и при этом НК-клетки созревают (например, становятся активированными или получают цитотоксическую активность другим способом). В определенных вариантах осуществления процесс не включает в себя промежуточных этапов между этапом (а) и (b), каких-либо дополнительных этапов культивирования до этапа (а) и/или каких-либо дополнительных этапов (например, этапа созревания) после этапа (b).

5.2.7.1. Первый этап.

В определенных вариантах осуществления процесс продуцирования активированных НК-клеток включает в себя первый этап культивирования и расширения популяции гематопозитических клеток в первой среде, при этом множество гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в пределах гематопозитической популяции клеток дифференцируется в НК-клетки.

Вне связи с каким-либо параметром, механизмом или теорией, культивирование гематопозитических клеток в соответствии с описанным в настоящем изобретении приводит к непрерывному расширению гематопозитических клеток и дифференцированию НК-клеток из указанных клеток. В определенных вариантах осуществления гематопозитические клетки, например стволовые клетки или клетки-предшественники, используемые в процессах, описанных в настоящем раскрытии, расширяются и дифференцируются на первом этапе с использованием питающего слоя. В других вариантах осуществления гематопозитические клетки, например стволовые клетки или клетки-предшественники, расширяются и дифференцируются на первом этапе без использования питающего слоя.

Независимое от питающих клеток расширение и дифференцирование гематопозитических клеток может происходить в любом контейнере, подходящем для культивирования и расширения клеток, например колбе, пробирке, мензурке, кювете, многолуночном планшете, мешке и т.п. В конкретном варианте осуществления независимое от питающих клеток расширение гематопозитических клеток происходит в мешке, например гибком газопроницаемом фторуглеродном мешке для культивирования (например, от производства American Fluoroseal). В конкретном варианте осуществления контейнер, в котором расширяются гематопозитические клетки, является подходящим для транспортировки, например, в такое место, как больница или военная зона, где расширенные НК-клетки далее расширяются и дифференцируются.

В определенных вариантах осуществления гематопозитические клетки расширяются и дифференцируются, например, непрерывным образом, в первой культуральной среде. В одном из вариантов осуществления первая культуральная среда является не содержащей животных компонентов культуральной средой. Типовые не содержащие животных компонентов культуральные среды, полезные в процессах, описанных в настоящем раскрытии, включают, но не ограничены указанным, основную питательную среду Игла (BME), модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), минимальную поддерживающую среду Глазго (GMEM), модифицированную по способу Дульбекко среду Игла/питательную смесь F-12 Ham (DMEM/F-12), минимальную поддерживающую среду (MEM), среду Дульбекко, модифицированную по способу Исков (IMDM), питательную смесь F-10 Ham (F-10 Ham), питательную смесь F-12 Ham (F-12 Ham), среду RPMI-1640, среду Е Уильямса, STEMSPAN® (Cat. No.

Stem Cell Technologies, Ванкувер, Канада), основную питательную среду Glycostem (GBGM®), среду AIM-V® (Invitrogen), X-VIVO™ 10 (Lonza), X-VIVO™ 15 (Lonza), OPTIMIZER (Invitrogen), STEMSPAN® H3000 (STEMCELL Technologies), CELLGRO COMPLETE™ (Mediatech) или любые модифицированные варианты или комбинации указанного. В конкретном варианте осуществления любого из вариантов осуществления в настоящем изобретении среда не является GBGM®.

В предпочтительных вариантах осуществления первая культуральная среда содержит одну или более добавок к среде (например, питательные вещества, цитокины и/или факторы). Добавки к среде, подходящие для использования в процессах, описанных в настоящем раскрытии, включают в себя, например, но без ограничения, сыворотку, такую как человеческая сыворотка АВ, эмбриональная бычья сыворотка (FBS) или эмбриональная сыворотка теленка (FCS), витамины, бычий сывороточный альбумин (BSA), аминокислоты (например, L-глутамин), жирные кислоты (например, олеиновая кислота, линолевая кислота или пальмитиновая кислота) инсулин (например, рекомбинантный человеческий инсулин), трансферрин (насыщенный железом человеческий трансферрин), β-меркаптоэтанол, фактор стволовых клеток (SCF), лиганд Fms-подобной тирозинкиназы (Flt3-L), цитокины, такие как интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-15 (IL-15), тромбopoэтин (Тро), гепарин или О-ацетилкарнитин (также называемый ацетилкарнитин, О-ацетил-L-карнитин или ОАС). В конкретном варианте осуществления культуральная среда, используемая в настоящем раскрытии, содержит человеческую сыворотку АВ. В другом конкретном варианте осуществления культуральная среда, используемая в настоящем раскрытии, содержит FBS. В другом конкретном варианте осуществления культуральная среда, используемая в настоящем раскрытии, содержит ОАС.

В определенных вариантах осуществления первая культуральная среда не содержит одного или более из колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), колониестимулирующего фактора гранулоцитов/макрофага (GM-CSF) интерлейкина-6 (IL-6), воспалительного белка макрофагов 1α (MIP1α) или фактора, ингибирующего лейкемию (LIF).

Таким образом, в одном из аспектов в настоящем изобретении описан двухэтапный процесс продуцирования NK-клеток, в котором указанный первый этап включает в себя расширение и дифференциацию популяции гематopoэтических клеток в первой среде в отсутствие питающих клеток, при этом множество гематopoэтических клеток в пределах указанной популяции гематopoэтических клеток дифференцируется в NK-клетки во время указанного расширения, и при этом культуральная среда содержит SCF в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл, IL-2 в концентрации от около 50 до около 1500 межд.ед./мл, IL-7 в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл, IL-15 в концентрации от 1 до около 150 нг/мл и гепарин в концентрации от около 0,1 до около 30 межд.ед./мл, и при этом указанные SCF, IL-2, IL-7, IL-15 и гепарин не содержатся в пределах неопределенного компонента указанной среды (например, сыворотки). В определенных вариантах осуществления указанная среда содержит одно или более из О-ацетил-карнитина (также называемого ацетилкарнитин, О-ацетил-L-карнитин или ОАС) или соединения, которое воздействует на цикл ацетил-СоА в митохондриях, тиазовивина, Y-27632, pY-интегрина, ингибиторов Rho-киназы (ROCK), ингибиторов каспазы или других антиапоптотических соединений/пептидов, NOVA-RS (Sheffield Bio-Science) или других усилителей выращивания малых молекул. В определенных вариантах осуществления указанная среда содержит никотинамид. В определенных вариантах осуществления указанная среда содержит около 0,5-10 mM ОАС. В одном из вариантов осуществления указанная среда содержит Stemspan® H3000 и/или DMEM:F12 и около 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 mM ОАС. В конкретном варианте осуществления указанная среда представляет собой GBGM®. В другом конкретном варианте осуществления среда не является GBGM®. В другом конкретном варианте осуществления указанная среда содержит Stemspan® H3000 и около 5 mM ОАС. В другом конкретном варианте осуществления указанная среда содержит DMEM:F12 и около 5 mM ОАС. ОАС может быть добавлен в любое время во время процессов культивирования, описанных в настоящем раскрытии. В определенных вариантах осуществления указанный ОАС добавляют к первой среде и/или во время первого этапа культивирования. В некоторых вариантах осуществления указанный ОАС добавляют к первой среде в день 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 культивирования. В конкретном варианте осуществления указанный ОАС добавляют к первой среде в день 7 первого этапа культивирования. В более конкретном варианте осуществления указанный ОАС добавляют к первой среде в день 7 культивирования, и он присутствует в течение всего первого и второго этапов культивирования. В определенных вариантах осуществления указанный ОАС добавляют ко второй среде и/или во время второго этапа культивирования. В некоторых вариантах осуществления указанный ОАС добавляют ко второй среде в день 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 культивирования.

В другом конкретном варианте осуществления указанная среда представляет собой IMDM, дополненный около 5-20% BSA, около 1-10 мкг/мл рекомбинантного человеческого инсулина, около 10-50 мкг/мл насыщенного железом человеческого трансферрина и около 10-50 мкМ β-меркаптоэтанола. В другом конкретном варианте осуществления указанная среда не содержит одного или более или не содержит ничего из IL-11, IL-3, гомеобокса-B4 (HoxB4) и/или метилцеллюлозы.

В других конкретных вариантах осуществления указанная среда содержит SCF в концентрации от

около 0,1 до около 500 нг/мл; от около 5 до около 100 нг/мл или около 20 нг/мл. В других конкретных вариантах осуществления указанная среда содержит IL-2 в концентрации от около 10 до около 2000 межд.ед./мл; или от около 100 до около 500 межд.ед./мл; или около 200 межд.ед./мл. В других конкретных вариантах осуществления указанная среда содержит IL-7 в концентрации от около 0,1 до около 500 нг/мл; от около 5 до около 100 нг/мл или около 20 нг/мл. В других конкретных вариантах осуществления указанная среда содержит IL-15 в концентрации от около 0,1 до около 500 нг/мл; от около 5 до около 100 нг/мл или около 10 нг/мл. В других конкретных вариантах осуществления указанная среда содержит гепарин в концентрации от около 0,05 до около 100 ед/мл; или от около 0,5 до около 20 ед./мл; или около 1,5 ед/мл.

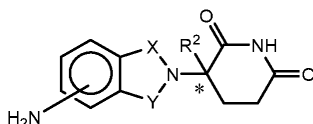
В еще одном конкретном варианте осуществления указанная среда дополнительно содержит лиганд Fms-подобной тирозинкиназы 3 (Flt-3L) в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл, тромбopoэтин (Тро) в концентрации от около 1 до около 150 нг/мл или комбинацию того и другого. В других конкретных вариантах осуществления указанная среда содержит Flt-3L в концентрации от около 0,1 до около 500 нг/мл; от около 5 до около 100 нг/мл или около 20 нг/мл. В других конкретных вариантах осуществления указанная среда содержит Тро в концентрации от около 0,1 до около 500 нг/мл; от около 5 до около 100 нг/мл или около 20 нг/мл.

В более конкретном варианте осуществления первая культуральная среда представляет собой GBGM®, которая содержит около 20 нг/мл SCF, около 20 нг/мл IL-7, около 10 нг/мл IL-15. В другом более конкретном варианте осуществления первая культуральная среда представляет собой GBGM®, которая содержит около 20 нг/мл SCF, около 20 нг/мл Flt3-L, около 200 межд.ед./мл IL-2, около 20 нг/мл IL-7, около 10 нг/мл IL-15, около 20 нг/мл Тро и около 1,5 ед/мл гепарина. В другом конкретном варианте осуществления указанная первая культуральная среда дополнительно содержит 10% человеческую сыворотку (например, человеческую сыворотку АВ) или эмбриональную сыворотку (например, FBS). В конкретном варианте осуществления любого из вариантов осуществления в настоящем изобретении культуральная среда не является GBGM®.

В другом варианте осуществления гематopoэтические клетки расширяются посредством культивирования указанных клеток, например, в указанной первой среде, в контакте с иммуномодулирующим соединением, например ингибирующим TNF-α соединением, в течение периода времени и в количестве, являющимися достаточными для вызывания детектируемого увеличения пролиферации гематopoэтических клеток за данный период времени, по сравнению с эквивалентным количеством гематopoэтических клеток, с которыми не контактирует иммуномодулирующее соединение. См., например, публикацию заявки на патент США № 2003/0235909, изобретение которой включено в настоящее изобретение посредством ссылки во всей его полноте. В определенных вариантах осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой аминозамещенный изоиндолин. В предпочтительном варианте осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой 3-(4-амино-1-оксо-1,3-дигидроизоиндол-2-ил)-пиперидин-2,6-дион; 3-(4'-аминоизоиндолин-1'-он)-1-пиперидин-2,6-дион; 4-(амино)-2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))-изоиндолин-1,3-дион или 4-амино-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндол-1,3-дион. В другом предпочтительном варианте осуществления иммуномодулирующее соединение представляет собой помалидомид или леналидомид.

Конкретные примеры иммуномодулирующих соединений включают, но не ограничены указанным, циано- и карбокси-производные замещенных стиролов, такие как раскрытые в патенте США № 5929117; 1-оксо-2-(2,6-диоксо-3-фторпиперидин-3-ил)изоиндолины и 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксо-3-фторпиперидин-3-ил)изоиндолины, такие как описанные в патенте США № 5874448; тетра-замещенные 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-охоизоиндолины, описанные в патенте США № 5798368; 1-оксо и 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолины (например, 4-метил-производные талидомида и ЕМ-12), включая раскрытые в патенте США № 5635517, но не ограничиваясь ими; и класс неполипептидных циклических амидов, раскрытых в патентах США № 5698579 и 5877200; аналоги и производные талидомида, включая продукты гидролиза, метаболиты, производные и предшественники талидомида, такие как описанные в патентах США № 5593990, 5629327 и 6071948 Д'Амато; аминоталидомид, а также аналоги, продукты гидролиза, метаболиты, производные и предшественники аминоталидомида, и замещенные 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)фталимиды и замещенные 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-охоизоиндолы, такие как описанные в патентах США № 6281230 и 6316471; изоиндол-имидные соединения, такие как описанные в заявке на патент США № 09/972487, поданной 5 октября 2001 г., заявке на патент США № 10/032286, поданной 21 декабря 2001 г., и международной заявке № PCT/US01/50401 (международная публикация № WO 02/059106). Каждый из патентов и заявок на патент, идентифицированных в настоящем раскрытии, включается в настоящее изобретение посредством ссылки во всей его полноте. Иммуномодулирующие соединения не включают талидомид.

В другом варианте осуществления иммуномодулирующие соединения включают, но не ограничены указанным, 1-оксо- и 1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)изоиндолины, аминозамещенные в бензольном кольце, как описано в патенте США № 5635517, который включен в настоящее изобретение посредством ссылки. Эти соединения имеют структуру



где один из X и Y представляет собой C=O;

другие из X и Y представляют собой C=O или CH₂;

R² представляет собой водород или нижний алкил,

или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, клатрат, зеркальный изомер, диастереоизомер, рацемат или смесь стереоизомеров указанного.

В другом варианте осуществления конкретные иммуномодулирующие соединения включают, но не ограничены указанным:

1-оксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-аминоизоиндолин;

1-оксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-5-аминоизоиндолин;

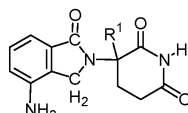
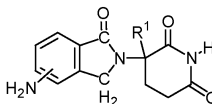
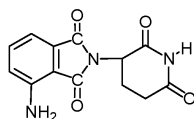
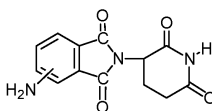
1-оксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-6-аминоизоиндолин;

1-оксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-7-аминоизоиндолин;

1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-4-аминоизоиндолин и

1,3-диоксо-2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-5-аминоизоиндолин.

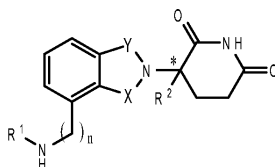
Другие конкретные иммуномодулирующие соединения принадлежат к классу замещенных 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)фталимидов и замещенных 2-(2,6-диоксопиперидин-3-ил)-1-оксоизоиндолов, такие как описанные в патентах США № 6281230; 6316471; 6335349; и 6476052 и международной заявке на патент № PCT/US97/13375 (международная публикация WO 98/03502), каждый из которых включается в настоящее изобретение посредством ссылки. Соединения, представляющие данный класс, имеют формулы:



где R¹ представляет собой водород или метил.

В отдельном варианте осуществления изобретение охватывает использование энантимерно чистых форм (например, оптически чистых (R) или (S) зеркальных изомеров) этих соединений.

Тем не менее другие конкретные иммуномодулирующие соединения принадлежат к классу изоиндол-имидов, раскрытых в заявке на патент США № 10/032286 и 09/972487 и международной заявке № PCT/US01/50401 (международная публикация WO 02/059106), каждая из которых включена в настоящее изобретение посредством ссылки. В одном представительном варианте осуществления указанное иммуномодулирующее соединение представляет собой соединение, имеющее структуру



где один из X и Y представляет собой C=O и другой представляет собой CH₂ или C=O;

R¹ представляет собой H, (C₁-C₈)алкил, (C₃-C₇)циклоалкил, (C₂-C₈)алкенил, (C₂-C₈)алкинил, бензил, арил, (C₀-C₄)алкил(C₁-C₆)гетероциклоалкил, (C₀-C₄)алкил(C₂-C₅)гетероарил, C(O)R³, C(S)R³, C(O)OR⁴, (C₁-C₈)алкил-N(R⁶)₂, (C₁-C₈)алкил-OR⁵, (C₁-C₈)алкил-C(O)OR⁵, C(O)NHR³, C(S)NHR³, C(O)NR³R^{3'}, C(S)NR³R^{3'} или (C₁-C₈)алкил-O(CO)R⁵;

R² представляет собой H, F, бензил, (C₁-C₈)алкил, (C₂-C₈)алкенил или (C₂-C₈) алкинил;

R³ и R^{3'} независимо представляют собой (C₁-C₈)алкил, (C₃-C₇)циклоалкил, (C₂-C₈)алкенил, (C₂-C₈)алкинил, бензил, арил, (C₀-C₄)алкил(C₁-C₆)гетероциклоалкил, (C₀-C₄)алкил(C₂-C₅)гетероарил,

(C_0-C_8) алкил- $N(R^6)_2$, (C_1-C_8) алкил- OR^5 , (C_1-C_8) алкил- $C(O)OR^5$, (C_1-C_8) алкил- $O(CO)R^5$ или $C(O)OR^5$;

R^4 представляет собой (C_1-C_8) алкил, (C_2-C_8) алкенил, (C_2-C_8) алкинил, (C_1-C_4) алкил- OR^5 , бензил, арил, (C_0-C_4) алкил- (C_1-C_6) гетероциклоалкил или (C_0-C_4) алкил- (C_2-C_5) гетероарил;

R^5 представляет собой (C_1-C_8) алкил, (C_2-C_8) алкенил, (C_2-C_8) алкинил, бензил, арил или (C_2-C_5) гетероарил;

каждый из R^6 независимо представляет собой H, (C_1-C_8) алкил, (C_2-C_8) алкенил, (C_2-C_8) алкинил, бензил, арил, (C_2-C_5) гетероарил или (C_0-C_8) алкил- $C(O)O-R^5$ или группы R^6 могут соединяться с формированием гетероциклоалкильной группы;

n равно 0 или 1;

* представляет хирально-углеродистый центр;

или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, клатрат, зеркальный изомер, диастереоизомер, рацемат или смесь стереоизомеров указанного.

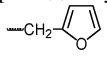
В конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, когда n равно 0, то R^1 представляет собой (C_3-C_7) циклоалкил, (C_2-C_8) алкенил, (C_2-C_8) алкинил, бензил, арил, (C_0-C_4) алкил- (C_1-C_6) гетероциклоалкил, (C_0-C_4) алкил- (C_2-C_5) гетероарил, $C(O)R^3$, $C(O)OR^4$, (C_1-C_8) алкил- $N(R^6)_2$, (C_1-C_8) алкил- OR^5 , (C_1-C_8) алкил- $C(O)OR^5$, $C(S)NHR^3$ или (C_1-C_8) алкил- $O(CO)R^5$;

R^2 представляет собой H или (C_1-C_8) алкил;

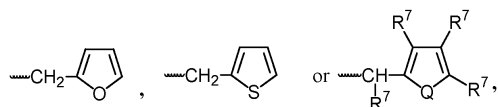
R^3 представляет собой (C_1-C_8) алкил, (C_3-C_7) циклоалкил, (C_2-C_8) алкенил, (C_2-C_8) алкинил, бензил, арил, (C_0-C_4) алкил- (C_1-C_6) гетероциклоалкил, (C_0-C_4) алкил- (C_2-C_5) гетероарил, (C_5-C_8) алкил- $N(R^6)_2$, (C_0-C_8) алкил- $NH-C(O)O-R^5$, (C_1-C_8) алкил- OR^5 , (C_1-C_8) алкил- $C(O)OR^5$, (C_1-C_8) алкил- $O(CO)R^5$ или $C(O)OR^5$ и другие переменные имеют те же самые определения.

В других конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, R^2 представляет собой H или (C_1-C_4) алкил.

В других конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, R^1 представляет собой (C_1-C_8) алкил или бензил.

В других конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, R^1 представляет собой H, (C_1-C_8) алкил, бензил, CH_2OCH_3 , $CH_2CH_2OCH_3$ или .

В другом варианте осуществления соединений, имеющих приведенную выше формулу, R^1 представляет собой



где Q представляет собой O или S и каждое из обозначений R^7 независимо представляет собой H, (C_1-C_8) алкил, бензил, CH_2OCH_3 или $CH_2CH_2OCH_3$.

В других конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, R^1 представляет собой $C(O)R^3$.

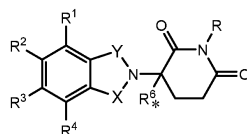
В других конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, R^3 представляет собой (C_0-C_4) алкил- (C_2-C_5) гетероарил, (C_1-C_8) алкил, арил или (C_0-C_4) алкил- OR^5 .

В других конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, гетероарил представляет собой пиридил, фурил или тиенил.

В других конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, R^1 представляет собой $C(O)OR^4$.

В других конкретных соединениях, имеющих приведенную выше формулу, $HC(O)NHC(O)$ может быть заменен на (C_1-C_4) алкил, арил или бензил.

В другом варианте осуществления указанное иммуномодулирующее соединение представляет собой соединение, имеющее структуру



где один из X и Y представляет собой $C=O$ и другой представляет собой CH_2 или $C=O$;

R представляет собой H или CH_2OCOR^4 ;

(i) каждый из R^1 , R^2 , R^3 или R^4 , независимо от других, представляет собой гало, алкил из 1-4 атомов углерода или алкокси из 1-4 атомов углерода или

(ii) один из R^1 , R^2 , R^3 или R^4 представляет собой нитро или $-NHR^5$, и остальные из R^1 , R^2 , R^3 или R^4 представляют собой водород;

R^5 представляет собой водород или алкил с 1-8 углеродами;

R^6 представляет собой водород, алкил с 1-8 атомами углерода, бензо, хлоро или фторо;

R^1 представляет собой $R^7-CHR^{10}-N(R^8R^9)$;

R^7 представляет собой m-фенилен или p-фенилен или $-(C_nH_{2n})$, где n имеет значение от 0 до 4;

каждый из R^8 и R^9 , взятые независимо друг от друга, представляет собой водород или алкил с 1-8 атомами углерода или R^8 и R^9 , взятые вместе, представляют собой тетраметилен, циклопентан, циклогексан или $-CH_2CH_2X_1CH_2CH_2-$, где X_1 представляет собой $-O-$, $-S-$ или $-NH-$;

R^{10} представляет собой водород, алкил с 8 атомами углерода или фенил;

* представляет хирально-углеродистый центр;

или фармацевтически приемлемую соль, гидрат, сольват, клатрат, зеркальный изомер, диастереоизомер, рацемат или смесь стереоизомеров указанного.

В конкретном варианте осуществления расширение гематопозитических клеток выполняют в IMDM, дополненной 20% BИTS (бычий сывороточный альбумин, рекомбинантный человеческий инсулин и трансферрин), SCF, лигандом Flt-3, IL-3 и 4-(амино)-2-(2,6-диоксо(3-пиперидил))изоиндолин-1,3-дионом (10 мкМ 0,05% DMSO). В более конкретном варианте осуществления около 5×10^7 гематопозитических клеток, например клеток $CD34^+$, расширяются в среде до количества от около 5×10^{10} до около 5×10^{12} клеток, которые ресуспендируют в 100 мл IMDM, с тем чтобы продуцировать популяцию расширенных гематопозитических клеток. Популяция расширенных гематопозитических клеток предпочтительно хранится замороженной в целях облегчения пересылки.

В различных конкретных вариантах осуществления по меньшей мере 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% гематопозитических клеток дифференцируются в клетки NK.

В определенных вариантах осуществления процесс расширения и дифференцирования гематопозитических клеток, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, включает в себя поддержание популяции клеток, содержащей указанные гематопозитические клетки в количестве между около 2×10^4 и около 2×10^5 клеток/мл во время расширения и дифференцирования. В определенных других вариантах осуществления процесс расширения и дифференцирования гематопозитических клеток, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, включает в себя поддержание популяции клеток, содержащей указанные гематопозитические клетки в количестве не более чем около 1×10^5 клеток/мл.

Время для расширения и дифференцирования гематопозитических клеток в NK-клетки может составлять, например, от около 3 до около 120 дней. В одном из вариантов осуществления время дифференцирования составляет от около 7 до около 75 дней. В другом варианте осуществления время дифференцирования составляет от около 14 до около 50 дней. В конкретном варианте осуществления время дифференцирования составляет от около 21 до около 28 дней.

5.2.7.2. Второй этап.

Гематопозитические клетки, например стволовые клетки или клетки-предшественники, и естественные клетки-киллеры, полученные на первом этапе, далее расширяются и дифференцируются на втором этапе, например, без использования питающего слоя или в присутствии питающих клеток. Культивирование клеток в соответствии с описанным в настоящем изобретении приводит к непрерывному расширению, дифференцированию, а также созреванию NK-клеток с первого этапа. Во втором этапе NK-клетки расширяются, дифференцируются и созревают непрерывным образом во второй культуральной среде, например, содержащей другие цитокины и/или биоактивные молекулы по сравнению с указанной первой средой. В определенных вариантах осуществления вторая культуральная среда представляет собой не содержащую животных компонентов среду. Типовые не содержащие животных компонентов клеточные культуральные среды описываются в раскрытии.

Таким образом, в одном из аспектов в настоящем изобретении описан процесс продуцирования активированных NK-клеток, включающий в себя расширение NK-клеток с первого этапа, описанного выше, во второй среде в присутствии питающих клеток и в контакте с интерлейкином-2 (IL-2). В конкретных вариантах осуществления указанная вторая среда содержит питательную среду роста клеток, содержащую IL-2, например от 10 до 1000 межд.ед./мл, и одно или более из следующего: человеческая сыворотка (например, человеческая сыворотка AB), эмбриональная бычья сыворотка (FBS) или эмбриональная сыворотка теленка (FCS), например, 5-15% FCS об./об.; трансферрин, например, от 10 до 50 мкг/мл; инсулин, например, от 5 до 20 мкг/мл; этаноламин, например, от 5×10^{-4} до 5×10^{-5} М; олеиновая кислота, например, от 0,1 до 5 мкг/мл; линолевая кислота, например, от 0,1 до 5 мкг/мл; пальмитиновая кислота, например, от 0,05 до 2 мкг/мл; бычий сывороточный альбумин (BSA), например, от 1 до 5 мкг/мл и/или фитогемагглютинин, например, от 0,01 до 1 мкг/мл. В более конкретном варианте осуществления указанная вторая среда содержит питательную среду роста клеток, содержащую FBS или FCS, например 10% FCS об./об., IL-2, трансферрин, инсулин, этаноламин, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, пальмитиновую кислоту, бычий сывороточный альбумин (BSA) и фитогемагглютинин. В более конкретном варианте осуществления указанная вторая среда содержит среду Дульбекко, модифицированную по способу Исков (IMDM), 10% FBS или FCS, 400 межд.ед. IL-2, 35 мкг/мл трансферрина, 5 мкг/мл инсулина, 2×10^{-5} М этаноламина, 1 мкг/мл олеиновой кислоты, 1 мкг/мл линолевой кислоты (Sigma-Aldrich), 0,2 мкг/мл пальмитиновой кислоты (Sigma-Aldrich), 2,5 мкг/мл BSA (Sigma-Aldrich) и 0,1 мкг/мл фитогемагглютинина.

В определенных вариантах осуществления вторая среда не содержит один или более из колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF), колониестимулирующего фактора гранулоци-

тов/макрофага (GM-CSF), интерлейкина-6 (IL-6), воспалительного белка макрофагов 1 α (MIP1 α) или фактора, ингибирующего лейкемию (LIF).

Питающие клетки, когда они используются, могут быть основаны на клетках различных типов. Примеры этих типов клеток включают в себя, без ограничения, фибробласты, стволовые клетки (например, прилипающие к культуре тканей плацентарные стволовые клетки), клетки крови (например, мононуклеары периферической крови (PBMC)) и раковые клетки (например, клетки хронической миелогенной лейкемии (CML), такие как K562). В конкретном варианте осуществления указанное культивирование в указанной второй среде включает в себя культивирование с использованием питающих клеток, например клеток K562 и/или мононуклеаров периферической крови (PBMC), например, в то время, когда клетки запускаются в указанную вторую среду или через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней после этого. В определенных вариантах осуществления питающие клетки, необязательно, являются клетками вида, отличного от вида клеток, которые они поддерживают. Например, человеческие NK-клетки могут поддерживаться мышиными эмбриональными фибробластами (из первичной культуры или теломеризованной линии).

В определенных вариантах осуществления питающие клетки, необязательно, деактивированные посредством облучения (например, γ -облучения) или обработки антимиотическим средством, таким как митомидин C, чтобы препятствовать тому, чтобы они переросли клетки, которые они поддерживают, но при этом допускать возможность синтеза важных факторов, которые поддерживают NK-клетки. Например, клетки могут быть облучены в такой дозе, чтобы ингибировать пролиферацию, но допустить возможность синтеза важных факторов, которые поддерживают человеческие эмбриональные стволовые клетки (hES) (гамма облучение около 4000 рад).

Культивирование NK-клеток для второго этапа может происходить в любом контейнере, совместимом с культивированием и расширением клеток, например колбе, пробирке, мензурке, кювете, многоручном планшете, мешке и т.п. В конкретном варианте осуществления зависящее от питающих клеток культивирование NK-клеток происходит в резервуаре, например гибком газопроницаемом фторуглеродном мешке для культивирования (например, производства American Fluoroseal). В конкретном варианте осуществления контейнер, в которой культивируются NK-клетки, является подходящим для пересылки, например, в такое место, как больница или военная зона, и в котором расширенные NK-клетки далее расширяются, дифференцируются и созревают.

Дифференцирование клеток с этапа 1 в активированные NK-клетки может быть оценено путем детектирования специфичных для NK-клеток маркеров, например, посредством проточной цитометрии. Специфичные для NK-клеток маркеры включают, но не ограничены указанным, CD56, CD94, CD117 и NKp46. Дифференцировка может также быть оценена по морфологическим характеристикам NK-клеток, например, большой размер, высокая активность синтеза белков в избыточном эндоплазматическом ретикулуме (ER) и/или с предварительно сформированными гранулами.

Время для расширения и дифференцирования клеток с этапа 1 в активированные NK-клетки может составлять, например, от около 3 до около 120 дней. В одном из вариантов осуществления время дифференцирования составляет от около 7 до около 75 дней. В другом варианте осуществления время дифференцирования составляет от около 14 до около 50 дней. В конкретном варианте осуществления время дифференцирования составляет от около 10 до около 21 дня.

Дифференцирование гематопозитических клеток в NK-клетки может быть оценено путем обнаружения маркеров, например, CD56, CD94, CD117, NKG2D, DNAM-1 и NKp46, например, посредством проточной цитометрии. Дифференцирование может также быть оценено по морфологическим характеристикам NK-клеток, например, большой размер, высокая активность синтеза белков в избыточном эндоплазматическом ретикулуме (ER) и/или с предварительно сформированными гранулами. Созревание NK-клеток (например, активированных NK-клеток) может быть оценено путем обнаружения одного или более функционально соответствующих маркеров, например, CD94, CD161, NKp44, DNAM-1, 2B4, NKp46, CD94, KIR и семейства NKG2 активирующих рецепторов (например, NKG2D). Созревание NK-клеток (например, активированных NK-клеток) может также быть оценено путем обнаружения конкретных маркеров в течение различных стадий развития. Например, в одном из вариантов осуществления, клетки рго-NK являются CD34⁺, CD45RA⁺, CD10⁺, CD117⁺ и/или CD161⁺. В другом варианте осуществления клетки рге-NK являются CD34⁺, CD45RA⁺, CD10⁺, CD117⁺ и/или CD161⁺. В другом варианте осуществления незрелые NK-клетки являются CD34⁺, CD117⁺, CD161⁺, NKp46⁺ и/или CD94/NKG2A⁺. В другом варианте осуществления, CD56^{bright} NK-клетки являются CD117⁺, NKp46⁺, CD94/NKG2A⁺, CD16⁺ и/или KIR⁺. В другом варианте осуществления, CD56^{dim} NK-клетки являются CD117⁺, NKp46⁺, CD94/NKG2A⁺, CD16⁺ и/или KIR⁺. В конкретном варианте осуществления созревание NK-клеток (например, активированных NK-клеток) определяют по проценту NK-клеток (например, активированных NK-клеток), которые являются CD161⁺, CD94⁺ и/или NKp46⁺. В более конкретном варианте осуществления по меньшей мере 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65 или 70% зрелых NK-клеток (например, активированных NK-клеток) являются NKp46⁺. В другом более конкретном варианте осуществления по меньшей мере 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% зрелых NK-клеток (например, активированных NK-клеток) являются CD94⁺. В

другом более конкретном варианте осуществления по меньшей мере 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% зрелых NK-клеток (например, активированных NK-клеток) являются CD161⁺.

В определенных вариантах осуществления дифференцирование гематопозитических клеток в NK-клетки оценивают путем детектирования уровня экспрессии, например, CD3, CD7 или CD127, CD10, CD14, CD15, CD16, CD33, CD34, CD56, CD94, CD117, CD161, NKp44, NKp46, NKG2D, DNAM-1, 2B4 или TO-PRO-3 с использованием, например, антител к одному или более из этих клеточных маркеров. Такие антитела могут быть конъюгированы с детектируемой меткой, например, такой как флуоресцентная метка, например FITC, R-PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, APC-Cy7 или APC-H7.

5.2.8. Способы продуцирования клеток TSPNK.

Клетки TSPNK могут быть продуцированы из гематопозитических клеток, которые описаны выше. В определенном варианте осуществления клетки TSPNK продуцируют из расширенных гематопозитических клеток, например гематопозитических стволовых клеток и/или гематопозитических клеток-предшественников.

В одном из вариантов осуществления клетки TSPNK продуцируют посредством трехэтапного процесса. В определенных вариантах осуществления процесс расширения и дифференцировки гематопозитических клеток, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, для продуцирования популяции клеток-предшественников NK или популяции NK-клеток согласно трехэтапному процессу, описанному в настоящем раскрытии, включает в себя поддержание популяции клеток, содержащей указанные гематопозитические клетки в количестве между около 2×10^4 и около 6×10^6 клеток/мл, например, между около 2×10^4 и около 2×10^5 клеток/мл, во время расширения и дифференцировки. В определенных вариантах осуществления процесс расширения и дифференцировки гематопозитических клеток, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, включает в себя поддержание популяции клеток, содержащей указанные гематопозитические клетки в количестве не более чем около 1×10^5 клеток/мл. В определенных других вариантах осуществления процесс расширения и дифференцировки гематопозитических клеток, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, включает в себя поддержание популяции клеток, содержащей указанные гематопозитические клетки в количестве не более чем около 1×10^5 клеток/мл, 2×10^5 клеток/мл, 3×10^5 клеток/мл, 4×10^5 клеток/мл, 5×10^5 клеток/мл, 6×10^5 клеток/мл, 7×10^5 клеток/мл, 8×10^5 клеток/мл, 9×10^5 клеток/мл, 1×10^6 клеток/мл, 2×10^6 клеток/мл, 3×10^6 клеток/мл, 4×10^6 клеток/мл, 5×10^6 клеток/мл, 6×10^6 клеток/мл, 7×10^6 клеток/мл, 8×10^6 клеток/мл или 9×10^6 клеток/мл.

В определенном варианте осуществления трехэтапный процесс включает в себя первый этап ("этап 1"), включающий в себя культивирование гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников, например CD34⁺ стволовых клеток или клеток-предшественников, в первой среде в течение заданного периода времени, например, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии. В определенных вариантах осуществления первая среда содержит один или более факторов, которые вызывают расширение гематопозитических клеток-предшественников, один или более факторов для иницирования лимфоидного дифференцирования в пределах расширяющейся популяции гематопозитической клеток-предшественников и/или один или более факторов, которые имитируют стромальную питательную поддержку. В определенных вариантах осуществления первая среда содержит один или более цитокинов (например, Flt3L, TPO, SCF). В определенных вариантах осуществления первая среда содержит IL-7. В определенных вариантах осуществления первая среда содержит суб-нг/мл концентрации G-CSF, IL-6 и/или GM-CSF. В конкретном варианте осуществления первая среда содержит цитокины Flt3L, TPO и SCF, IL-7 и суб-нг/мл концентрации G-CSF, IL-6 и GM-CSF. В конкретных вариантах осуществления в первой среде CD34⁺ клетки подвергаются расширению в линиеспецифические клетки-предшественники, которые затем становятся CD34⁺. В определенных вариантах осуществления это расширение происходит быстро. В определенных вариантах осуществления клетки CD34⁺ составляют более чем 50%, более чем 55%, более чем 60%, более чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80% или более от общей численности популяции в конце этапа 1. В более конкретном варианте осуществления, клетки CD34⁺ составляют более чем 80% общей численности популяции в конце этапа 1.

В определенных вариантах осуществления далее на "этапе 2" указанные клетки культивируют во второй среде в течение заданного периода времени, например, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии. В определенных вариантах осуществления вторая среда содержит факторы, которые могут способствовать дальнейшему расширению лимфоидных клеток-предшественников, факторы, которые могут внести вклад в развитие клеточной линии NK, и/или факторы, которые имитируют стромальную питательную поддержку. В определенных вариантах осуществления вторая среда содержит один или более цитокинов (например, Flt3L, SCF, IL-15 и/или IL-7). В определенных вариантах осуществления вторая среда содержит IL-17 и/или IL-15. В определенных вариантах осуществления вторая среда содержит суб-нг/мл концентрации G-CSF, IL-6 и/или GM-CSF. В конкретном варианте осуществления вторая среда содержит цитокины Flt3L, SCF, IL-15 и IL-7, IL-17 и IL-15 и суб-нг/мл концентрации G-CSF, IL-6 и GM-CSF.

В определенных вариантах осуществления далее на "этапе 3" указанные клетки культивируют в третьей среде в течение заданного периода времени, например, в соответствии с описанным в настоящем

раскрытии. В определенных вариантах осуществления третья среда содержит факторы, которые вызывают дифференцировку и функциональную активацию клеток $CD56^+CD3^+CD16^+$, которые могут являться клетками-предшественниками NK. В одном из вариантов осуществления такие факторы включают в себя IL2 и IL12 и IL18, IL12 и IL15, IL12 и IL18, IL2 и IL12 и IL15 и IL18 или IL2 и IL15 и IL18. В определенных вариантах осуществления третья среда содержит факторы, которые имитируют стромальную питающую поддержку. В определенных вариантах осуществления третья среда содержит один или более цитокинов (например, SCF, IL-15, IL-7, IL-2). В определенных вариантах осуществления третья среда содержит суб-нг/мл концентрации G-CSF, IL-6 и/или GM-CSF. В конкретном варианте осуществления третья среда содержит цитокины SCF, IL-15, IL-7, IL-2 и суб-нг/мл концентрации G-CSF, IL-6 и GM-CSF.

В конкретных вариантах осуществления трехэтапный процесс применяют для продуцирования популяций NK-клеток (например, зрелых клеток NK). В конкретных вариантах осуществления трехэтапный процесс применяют для продуцирования популяций клеток-предшественников NK. В определенных вариантах осуществления трехэтапный процесс проводят в отсутствие клеток стромальной питающей поддержки. В определенных вариантах осуществления трехэтапный процесс проводят в отсутствие добавленных экзогенным образом стероидов (например, кортизон, гидрокортизон или их производные).

В определенных вариантах осуществления первая среда, используемая в трехэтапных процессах, описанных в настоящем раскрытии, может содержать любой из компонентов первой или второй среды, описанных в разделе 5.2.4 в отношении двухэтапного способа. В определенных вариантах осуществления указанная первая среда, используемая в трехступенчатом процессе, включает питательную среду, содержащую одно или более из следующего: животная сыворотка, например человеческая сыворотка (например, человеческая сыворотка AB), эмбриональная бычья сыворотка (FBS) или эмбриональная сыворотка теленка (FCS), например, от 1 до 20% об./об. сыворотки, например от 5 до 20% об./об. сыворотки; фактор стволовых клеток (SCF), например, от 1 до 50 нг/мл SCF; лиганд FMS-подобной тирозинкиназы 3 (лиганд Flt-3), например, от 1 до 30 нг/мл лиганда Flt-3; интерлейкин-7 (IL-7), например, от 1 до 50 нг/мл IL-7; тромбопоэтин (TPO), например, от 1 до 100 нг/мл, например от 1 до 50 нг/мл TPO; интерлейкин-2 (IL-2), например, до 2000 межд.ед./мл, например от 50 до 500 межд.ед./мл; и/или гепарин, например легковесный гепарин (LWH), например, от 0,1 до 10 межд.ед./мл гепарина. В определенных вариантах осуществления указанная первая среда дополнительно содержит одно или более из следующего: антибиотики, такие как гентамицин; антиоксиданты, такие как трансферрин, инсулин и/или бета-меркаптоэтанол; селенистокислый натрий; аскорбиновая кислота; этаноламин и глутатион. В определенных вариантах осуществления указанная первая среда дополнительно содержит интерлейкин-6 (IL-6), фактор, ингибирующий лейкемию (LIF), G-CSF, GM-CSF и/или MIP-1 α . В определенных вариантах осуществления указанная первая среда дополнительно содержит один или более антиоксидантов, например голо-трансферрин, раствор инсулина, восстановленный глутатион, селенистокислый натрий, этаноламин, аскорбиновую кислоту, б-меркаптоэтанол, О-ацетил-L-карнитин, N-ацетилцистеин, (+/-) липоевую кислоту, никотинамид или резвератрол. В определенных вариантах осуществления среда, которая обеспечивает основу для первой среды, является культуральной средой клеток/тканей, известной специалистам в данной области техники, например, коммерчески доступной культуральной средой клеток/тканей, такой как GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенная DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640; или средой, которая содержит компоненты, обычно включаемые в известные культуральные среды клеток/тканей, такие как компоненты, включенные в GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенную DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640. В конкретном варианте осуществления любого из вариантов осуществления в настоящем изобретении среда не является GBGM®.

В определенных вариантах осуществления вторая среда, используемая в трехэтапных процессах, описанных в настоящем раскрытии, может содержать любой из компонентов первой или второй среды, описанных в разделе 5.2.4 в отношении двухэтапного способа. В определенных вариантах осуществления указанная вторая среда, используемая в трехступенчатом процессе, включает питательную среду, содержащую одно или более из следующего: животная сыворотка, например человеческая сыворотка (например, человеческая сыворотка AB), FBS или FCS, например, от 5 до 20% об./об. сыворотки; SCF, например, от 1 до 50 нг/мл SCF; лиганд Flt-3, например, от 1 до 30 нг/мл лиганда Flt-3; IL-7, например, от 1 до 50 нг/мл IL-7; интерлейкин-15 (IL-15), например, от 1 до 50 нг/мл IL-15 и/или гепарин, например LWH, например, от 0,1 до 10 межд.ед./мл гепарина. В определенных вариантах осуществления указанная вторая среда дополнительно содержит один или более следующего: антибиотики, такие как гентамицин; антиоксиданты, такие как трансферрин, инсулин и/или бета-меркаптоэтанол; селенистокислый натрий; аскорбиновая кислота; этаноламин; и глутатион. В определенных вариантах осуществления указанная

вторая среда дополнительно содержит ОАС. В определенных вариантах осуществления указанная вторая среда дополнительно содержит интерлейкин-6 (IL-6), фактор, ингибирующий лейкемию (LIF), G-CSF, GM-CSF и/или MIP-1 α . В определенных вариантах осуществления указанная вторая среда дополнительно содержит один или более антиоксидантов, например голо-трансферрин, раствор инсулина, восстановленный глутатион, селенистокислый натрий, этаноламин, аскорбиновую кислоту, б-меркаптоэтанол, О-ацетил-L-карнитин, N-ацетилцистеин, (+/-) липоевую кислоту, никотинамид или резвератрол. В определенных вариантах осуществления среда, которая обеспечивает основу для второй среды, является культуральной средой клеток/тканей, известной специалистам в данной области техники, например коммерчески доступной культуральной средой клеток/тканей, такой как GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенная DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640; или средой, которая содержит компоненты, обычно включаемые в известные культуральные среды клеток/тканей, такие как компоненты, включенные в GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенную DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640. В конкретном варианте осуществления любого из вариантов осуществления в настоящем изобретении среда не является GBGM®.

В определенных вариантах осуществления третья среда, используемая в трехэтапных процессах, описанных в настоящем раскрытии, может содержать любой из компонентов первой или второй культуральной среды, описанных в разделе 5.2.4 в отношении двухэтапного способа. В определенных вариантах осуществления указанная третья среда, используемая в трехэтапном процессе, включает питательную среду, содержащую одно или более из следующего: животная сыворотка, например, человеческая сыворотка (например, человеческая сыворотка AB), FBS или FCS, например, от 5 до 20% об./об. сыворотки; SCF, например, от 1 до 50 нг/мл SCF; лиганд Flt-3, например, от 1 до 30 нг/мл лиганда Flt-3; IL-7, например, от 1 до 50 нг/мл IL-7; IL-15, например, от 1 до 50 нг/мл IL-15 и интерлейкин-2 (IL-2), например, в диапазоне от 0 до 2000 межд.ед./мл, например от 50 до 1000 межд.ед./мл IL-2. В определенных вариантах осуществления указанная третья среда дополнительно содержит один или более следующего: антибиотики, такие как гентамицин; антиоксиданты, такие как трансферрин инсулин и/или бета-меркаптоэтанол; селенистокислый натрий; аскорбиновая кислота; этаноламин и глутатион. В определенных вариантах осуществления указанная третья среда дополнительно содержит ОАС. В определенных вариантах осуществления указанная вторая среда дополнительно содержит один или более следующего: антибиотики, такие как гентамицин; антиоксиданты, такие как трансферрин, инсулин и/или бета-меркаптоэтанол; селенистокислый натрий; аскорбиновая кислота; этаноламин и глутатион. В определенных вариантах осуществления указанная вторая среда дополнительно содержит ОАС. В определенных вариантах осуществления указанная третья среда дополнительно содержит интерлейкин-6 (IL-6), фактор, ингибирующий лейкемию (LIF), G-CSF, GM-CSF и/или MIP-1 α . В определенных вариантах осуществления указанная третья среда дополнительно содержит один или более антиоксидантов, например, голо-трансферрин, раствор инсулина, восстановленный глутатион, селенистокислый натрий, этаноламин, аскорбиновую кислоту, б-меркаптоэтанол, О-ацетил-L-карнитин, N-ацетилцистеин, (+/-) липоевую кислоту, никотинамид или резвератрол. В определенных вариантах осуществления среда, которая обеспечивает основу для третьей среды, является культуральной средой клеток/тканей, известной специалистам в данной области техники, например, коммерчески доступной культуральной средой клеток/тканей, такой как GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенная DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640; или средой, которая содержит компоненты, обычно включаемые в известные культуральные среды клеток/тканей, такие как компоненты, включенные в GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенную DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640. В конкретном варианте осуществления любого из вариантов осуществления в настоящем изобретении среда не является GBGM®.

В определенных вариантах осуществления в трехэтапных процессах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней до указанного культивирования в указанной второй среде. В определенных вариантах осуществления клетки, культивированные в указанной первой среде, культивируют в указанной второй среде в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней до указанного культивирования в указанной третьей среде. В определенных вариантах осуществления клетки, культивированные в указанной

первой среде и указанной второй среде, культивируют в указанной третьей среде в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 дней или более.

В определенных вариантах осуществления, в трехэтапных процессах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде в течение 2-12 дней, 3-11 дней, например 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10 или 9-11 дней, до указанного культивирования в указанной второй среде. В определенных вариантах осуществления клетки, культивируемые в указанной первой среде, культивируют в указанной второй среде в течение 1-10 дней, например 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8 или 7-9 дней, до указанного культивирования в указанной третьей среде. В определенных вариантах осуществления, клетки, культивируемые в указанной первой среде и указанной второй среде, культивируют в указанной третьей среде в течение 2-27 дней, например 3-25 дней, например в течение 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, 18-20, 19-21, 20-22, 21-23, 22-24 или 23-25 дней.

В конкретном варианте осуществления в трехэтапных процессах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде в течение 9 дней до указанного культивирования в указанной второй среде; культивируют в указанной второй среде в течение 5 дней до указанного культивирования в указанной третьей среде; и культивируют в указанной третьей среде в течение 7 дней, т.е. клетки культивируют в общей сложности 21 день.

В конкретном варианте осуществления в трехэтапных процессах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде в течение 7-9 дней до указанного культивирования в указанной второй среде; культивируют в указанной второй среде в течение 5-7 дней до указанного культивирования в указанной третьей среде; и культивируют в указанной третьей среде в течение 21-35 дней, т.е. клетки культивируют в общей сложности 35 дней. В более конкретном варианте осуществления в трехэтапных процессах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде в течение 9 дней до указанного культивирования в указанной второй среде; культивируют в указанной второй среде в течение 5 дней до указанного культивирования в указанной третьей среде; и культивируют в указанной третьей среде в течение 21 дня, т.е. клетки культивируют в общей сложности 35 дней.

5.2.9. Способы трехэтапного продуцирования НК-клеток.

Продуцирование НК-клеток и популяций НК-клеток посредством трехэтапного способа включает в себя расширение популяции гематопозитических клеток. Во время расширения клеток множество гематопозитических клеток в пределах популяции гематопозитических клеток дифференцируется в НК-клетки. В одном из аспектов в настоящем изобретении представлен способ продуцирования НК-клеток, включающий в себя культивирование гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников, например CD34⁺ стволовых клеток или клеток-предшественников, в первой среде, содержащей средство активации стволовых клеток и тромбопоэтин (Тро), с тем чтобы продуцировать первую популяцию клеток, далее культивирование указанной первой популяции клеток во второй среде, содержащей средство активации стволовых клеток и интерлейкин-15 (IL-15) и не содержащей Тро, с тем чтобы продуцировать вторую популяцию клеток, и далее культивирование указанной второй популяции клеток в третьей среде, содержащей IL-2 и IL-15 и не содержащей средство активации стволовых клеток и LMWH, с тем чтобы продуцировать третью популяцию клеток, при этом третья популяция клеток содержит естественные клетки-киллеры, которые являются CD56⁺, CD3⁺, и при этом по меньшей мере 70%, например 80%, естественных клеток-киллеров являются жизнеспособными в определенных вариантах осуществления, и такие естественные клетки-киллеры содержат естественные клетки-киллеры, которые являются CD16⁺. В определенных вариантах осуществления такие естественные клетки-киллеры содержат естественные клетки-киллеры, которые являются CD94⁺.

В одном из вариантов осуществления в настоящем изобретении представлен трехэтапный способ продуцирования популяций НК-клеток. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении способ расширения и дифференцировки гематопозитических клеток, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, для продуцирования популяции НК-клеток согласно трехэтапному способу, описанному в настоящем раскрытии, включает в себя поддержание популяции клеток, содержащей указанные гематопозитические клетки в количестве между около 2×10^4 и около 6×10^6 клеток/мл. В определенных аспектах указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники первоначально инокулируются в указанной первой среде в количестве от 1×10^4 до 1×10^5 клеток/мл. В конкретном аспекте указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники первоначально инокулируются в указанной первой среде в количестве около 3×10^4 клеток/мл.

В определенных вариантах осуществления указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники являются клетками млекопитающих. В конкретных вариантах осуществления указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники являются клетками человека. В конкретных вариантах осуществления указанные стволовые гематопозитические клетки или клет-

ки-предшественники являются клетками примата. В конкретных вариантах осуществления указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники являются клетками собаки. В конкретных вариантах осуществления указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники представляет собой клетки грызунов.

В определенных аспектах указанная первая популяция клеток первоначально инокулируется в указанную вторую среду в количестве от 5×10^4 до 5×10^5 клеток/мл. В конкретном аспекте указанная первая популяция клеток первоначально инокулируется в указанную вторую среду в количестве около 1×10^5 клеток/мл.

В определенных аспектах указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанную третью среду в количестве от 1×10^5 до 5×10^6 клеток/мл. В определенных аспектах указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанную третью среду в количестве от 1×10^5 до 1×10^6 клеток/мл. В конкретном аспекте указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанную третью среду в количестве около 5×10^5 клеток/мл. В более конкретном аспекте указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанную третью среду в количестве около 5×10^5 клеток/мл в центрифужной пробирке. В конкретном аспекте указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанную третью среду в количестве около 3×10^5 клеток/мл. В более конкретном аспекте указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанную третью среду в количестве около 3×10^5 клеток/мл в статической культуре.

В определенном варианте осуществления трехэтапный способ включает в себя первый этап ("этап 1"), включающий в себя культивирование гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников, например $CD34^+$ стволовых клеток или клеток-предшественников, в первой среде в течение заданного периода времени, например, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, для продуцирования первой популяции клеток. В определенных вариантах осуществления первая среда содержит средство активации стволовых клеток и тромбопоэтин (Тро). В определенных вариантах осуществления первая среда содержит, в дополнение к средству активации стволовых клеток и Тро, один или более из LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF. В конкретном варианте осуществления первая среда содержит, в дополнение к активации стволовых клеток и Тро, каждый из LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF.

В определенных вариантах осуществления, далее, на "этапе 2" указанные клетки культивируют во второй среде в течение заданного периода времени, например, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, для продуцирования второй популяции клеток. В определенных вариантах осуществления вторая среда содержит средство активации стволовых клеток и интерлейкин-15 (IL-15) и не содержит Тро. В определенных вариантах осуществления вторая среда содержит, в дополнение к средству активации стволовых клеток и IL-15, один или более из LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF. В определенных вариантах осуществления вторая среда содержит, в дополнение к средству активации стволовых клеток и IL-15, каждый из LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF.

В определенных вариантах осуществления, далее, на "этапе 3" указанные клетки культивируют в третьей среде в течение заданного периода времени, например, в соответствии с описанным в настоящем раскрытии, для продуцирования третьей популяции клеток, например, NK-клеток. В определенных вариантах осуществления третья среда содержит IL-2 и IL-15, и не содержит средство активации стволовых клеток и LMWH. В определенных вариантах осуществления третья среда содержит, в дополнение к IL-2 и IL-15, один или более SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF. В определенных вариантах осуществления третья среда содержит, в дополнение к IL-2 и IL-15, каждый из SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF.

В конкретном варианте осуществления трехэтапный способ применяют для продуцирования популяции NK-клеток. В определенных вариантах осуществления трехэтапный способ выполняют в отсутствие поддержки стромальными питающими клетками. В определенных вариантах осуществления трехэтапный способ выполняют в отсутствие экзогенным образом добавленных стероидов (например, кортизона, гидрокортизона или их производных).

В определенных аспектах указанная первая среда, используемая в трехэтапном способе, содержит средство активации стволовых клеток и тромбопоэтин (Тро). В определенных аспектах первая среда, используемая в трехэтапном способе, содержит, в дополнение к средству активации стволовых клеток и Тро, один или более из низкомолекулярного гепарина (LMWH), лиганда Flt-3 (Flt-3L), фактора стволовых клеток (SCF), IL-6, IL-7, колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF) или колониестимулирующего фактора гранулоцитов/макрофага. В определенных аспектах первая среда, используемая в трехэтапном способе, содержит, в дополнение к средству активации стволовых клеток и Тро, каждый из LMWH, Flt-3L, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF. В определенных аспектах указанный Тро присутствует в первой среде в концентрации от 1 до 100 нг/мл, от 1 до 50 нг/мл, от 20 до 30 нг/мл или около 25 нг/мл. В определенных аспектах в первой среде LMWH присутствует в концентрации от 1 до 10 ед/мл; Flt-3L присутствует в концентрации от 1 до 50 нг/мл; SCF присутствует в концентрации от 1 до 50 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации от 0,01 до 0,1 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации от 1 до 50 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации от 0,01 до 0,50 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концен-

трации от 0,005 до 0,1 нг/мл. В определенных аспектах в первой среде, LMWH присутствует в концентрации от 4 до 5 ед/мл; Flt-3L присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; SCF присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации от 0,04 до 0,06 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации от 0,20 до 0,30 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации от 0,005 до 0,5 нг/мл. В определенных аспектах в первой среде LMWH присутствует в концентрации около 4,5 ед/мл; Flt-3L присутствует в концентрации около 25 нг/мл; SCF присутствует в концентрации около 27 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации около 0,05 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации около 25 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации около 25 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации около 0,01 нг/мл. В определенных вариантах осуществления указанная первая среда дополнительно содержит одно или более из следующего: антибиотики, такие как гентамицин; антиоксиданты, такие как трансферрин, инсулин и/или бета-меркаптоэтанол; селенистокислый натрий; аскорбиновая кислота; этаноламин; и глутатион. В определенных вариантах осуществления среда, которая обеспечивает основу для первой среды, является культуральной средой клеток/тканей, известной специалистам в данной области техники, например, коммерчески доступной культуральной средой клеток/тканей, такой как GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенная DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640; или средой, которая содержит компоненты, обычно включаемые в известные культуральные среды клеток/тканей, такие как компоненты, включенные в GBGM®, AIM-V®, X-VIVOTM 10, X-VIVOTM 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенную DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640. В конкретном варианте осуществления любого из вариантов осуществления в настоящем изобретении среда не является GBGM®.

В определенных аспектах указанная вторая среда, используемая в трехэтапном способе, содержит средство активации стволовых клеток и интерлейкин-15 (IL-15) и не содержит Тро. В определенных аспектах вторая среда, используемая в трехэтапном способе, содержит, в дополнение к средству активации стволовых клеток и IL-15, один или более из LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF. В определенных аспектах вторая среда, используемая в трехэтапном способе, содержит, в дополнение к средству активации стволовых клеток и IL-15, каждый из LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF. В определенных аспектах указанный IL-15 присутствует в указанной второй среде в концентрации от 1 до 50 нг/мл, от 10 до 30 нг/мл или около 20 нг/мл. В определенных аспектах в указанной второй среде, LMWH присутствует в концентрации от 1 до 10 ед/мл; Flt-3L присутствует в концентрации от 1 до 50 нг/мл; SCF присутствует в концентрации от 1 до 50 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации от 0,01 до 0,1 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации от 1 до 50 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации от 0,01 до 0,50 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации от 0,005 до 0,1 нг/мл. В определенных аспектах во второй среде LMWH присутствует во второй среде в концентрации от 4 до 5 ед/мл; Flt-3L присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; SCF присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации от 0,04 до 0,06 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации от 0,20 до 0,30 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации от 0,005 до 0,5 нг/мл. В определенных аспектах во второй среде LMWH присутствует во второй среде в концентрации от 4 до 5 ед/мл; Flt-3L присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; SCF присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации от 0,04 до 0,06 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации от 0,20 до 0,30 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации от 0,005 до 0,5 нг/мл. В определенных аспектах во второй среде LMWH присутствует во второй среде в концентрации около 4,5 ед/мл; Flt-3L присутствует в концентрации около 25 нг/мл; SCF присутствует в концентрации около 27 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации около 0,05 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации около 25 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации около 0,25 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации около 0,01 нг/мл. В определенных вариантах осуществления указанная вторая среда дополнительно содержит одно или более из следующего: антибиотики, такие как гентамицин; антиоксиданты, такие как трансферрин, инсулин и/или бета-меркаптоэтанол; селенистокислый натрий; аскорбиновая кислота; этаноламин и глутатион. В определенных вариантах осуществления среда, которая обеспечивает основу для второй среды, является культуральной средой клеток/тканей, известной специалистам в данной области техники, например коммерчески доступной культуральной средой клеток/тканей, такой как GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенная DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640; или средой, которая содержит компоненты, обычно включаемые в известные культуральные среды клеток/тканей, такие как компоненты, включенные в GBGM®, AIM-V®, X-VIVOTM 10, X-VIVOTM 15, OPTMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™,

DMEM:Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенную DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640. В конкретном варианте осуществления любого из вариантов осуществления в настоящем изобретении среда не является GBGM®.

В определенных вариантах осуществления третья среда, используемая в трехэтапном способе, содержит среду. В определенных аспектах указанная третья среда, используемая в трехэтапном способе, содержит IL-2 и IL-15 и не содержит средство активации стволовых клеток и LMWH. В определенных аспектах третья среда, используемая в трехэтапном способе, содержит, в дополнение к IL-2 и IL-15, один или более из SCF, IL-6, IL-7, G-CSF или GM-CSF. В определенных аспектах третья среда, используемая в трехэтапном способе, содержит, в дополнение к IL-2 и IL-15, каждый из SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и GM-CSF. В определенных аспектах указанный IL-2 присутствует в указанной третьей среде в концентрации от 10 до 10000 ед/мл, и указанный IL-15 присутствует в указанной третьей среде в концентрации от 1 до 50 нг/мл. В определенных аспектах указанный IL-2 присутствует в указанной третьей среде в концентрации от 100 до 10000 ед/мл, и указанный IL-15 присутствует в указанной третьей среде в концентрации от 1 до 50 нг/мл. В определенных аспектах указанный IL-2 присутствует в указанной третьей среде в концентрации от 300 до 3000 ед/мл и указанный IL-15 присутствует в указанной третьей среде в концентрации от 10 до 30 нг/мл. В определенных аспектах указанные IL-2 присутствует в указанной третьей среде в концентрации около 1000 ед/мл и указанный IL-15 присутствует в указанной третьей среде в концентрации около 20 нг/мл. В определенных аспектах, в указанной третьей среде SCF присутствует в концентрации от 1 до 50 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации от 0,01 до 0,1 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации от 1 до 50 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации от 0,01 до 0,50 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации от 0,005 до 0,1 нг/мл. В определенных аспектах в указанной третьей среде SCF присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации от 0,04 до 0,06 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации от 20 до 30 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации от 0,20 до 0,30 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации от 0,005 до 0,5 нг/мл. В определенных аспектах в указанной третьей среде SCF присутствует в концентрации около 22 нг/мл; IL-6 присутствует в концентрации около 0,05 нг/мл; IL-7 присутствует в концентрации около 20 нг/мл; G-CSF присутствует в концентрации около 0,25 нг/мл; и GM-CSF присутствует в концентрации около 0,01 нг/мл. В определенных вариантах осуществления указанная третья среда дополнительно содержит одно или более следующего: антибиотики, такие как гентамицин; антиоксиданты, такие как трансферрин, инсулин и/или бета-меркаптоэтанол; селенистокислый натрий; аскорбиновая кислота; этаноламин; и глутатион. В определенных вариантах осуществления среда, которая обеспечивает основу для третьей среды, является культуральной средой клеток/тканей, известной специалистам в данной области техники, например, коммерчески доступной культуральной средой клеток/тканей, такой как GBGM®, AIM-V®, X-VIVO™ 10, X-VIVO™ 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM: Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенную DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640; или средой, которая содержит компоненты, обычно включаемые в известные культуральные среды клеток/тканей, такие как компоненты, включенные в GBGM®, AIM-V®, X-VIVOTM 10, X-VIVOTM 15, OPTIMIZER, STEMSPAN® H3000, CELLGRO COMPLETE™, DMEM:Ham's F12 ("F12") (например, в соотношении 2:1 или DMEM с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), улучшенную DMEM (Gibco), EL08-1D2, Myelocult™ H5100, IMDM и/или RPMI-1640. В конкретном варианте осуществления любого из вариантов осуществления в настоящем изобретении среда не является GBGM®.

Обычно конкретно указанные компоненты среды не относятся к возможным составляющим в неопределенном компоненте указанной среды. Например, указанные Тро, IL-2 и IL-15 не содержатся в пределах неопределенного компонента первой среды, второй среды или третьей среды, например указанные Тро, IL-2 и IL-15 не содержатся в пределах сыворотки. Кроме того, указанные LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и/или GM-CSF не содержатся в пределах неопределенного компонента первой среды, второй среды или третьей среды, например указанные LMWH, Flt-3, SCF, IL-6, IL-7, G-CSF и/или GM-CSF не содержатся в пределах сыворотки.

В определенных аспектах указанные первая среда, вторая среда или третья среда содержат человеческую сыворотку-AB. В определенных аспектах любая указанная первая среда, вторая среда или третья среда содержат от 1 до 20% человеческой сыворотки-AB, от 5 до 15% человеческой сыворотки-AB или около 2, 5 или 10% человеческой сыворотки-AB.

В определенных вариантах осуществления в трехэтапных способах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней. В определенных вариантах осуществления в трехэтапных способах, описанных в настоящем раскрытии, клетки культивируют в указанной второй среде в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней. В определенных вариантах осуществления в трехэтапных способах, описанных в

настоящем раскрытии, клетки культивируют в указанной третьей среде в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 дней или более.

В конкретном варианте осуществления в трехэтапных способах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде за 7-13 дней для продуцирования первой популяции клеток, до указанного культивирования в указанной второй среде; указанную первую популяцию клеток культивируют в указанной второй среде в течение 2-6 дней для продуцирования второй популяции клеток до указанного культивирования в указанной третьей среде; и указанную вторую популяцию клеток культивируют в указанной третьей среде в течение 10-30 дней, т.е. клетки культивируют в общей сложности 19-49 дней.

В конкретном варианте осуществления в трехэтапных способах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде в течение 8-12 дней для продуцирования первой популяции клеток, до указанного культивирования в указанной второй среде; указанную первую популяцию клеток культивируют в указанной второй среде в течение 3-5 дней для продуцирования второй популяции клеток до указанного культивирования в указанной третьей среде; и указанную вторую популяцию клеток культивируют в указанной третьей среде в течение 15-25 дней, т.е. клетки культивируют в общей сложности 26-42 дня.

В конкретном варианте осуществления в трехэтапных способах, описанных в настоящем раскрытии, указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники культивируют в указанной первой среде в течение около 10 дней для продуцирования первой популяции клеток, до указанного культивирования в указанной второй среде; указанную первую популяцию клеток культивируют в указанной второй среде в течение около 4 дней для продуцирования второй популяции клеток до указанного культивирования в указанной третьей среде; и указанную вторую популяцию клеток культивируют в указанной третьей среде в течение около 21 дня, т.е. клетки культивируют в общей сложности около 35 дней.

В определенных аспектах указанное культивирование в указанной первой среде, второй среде и третьей среде выполняют в статических условиях культивирования, например, в чашке для культивирования или колбе для культивирования. В определенных аспектах указанное культивирование по меньшей мере в одной из указанной первой среды, второй среды или третьей среды выполняют в центрифужной пробирке. В определенных аспектах указанное культивирование в указанной первой среде и указанной второй среде выполняется в статических условиях культивирования и указанное культивирование в указанной третьей среде выполняют в центрифужной пробирке.

В определенных аспектах указанное культивирование выполняют в центрифужной пробирке. В других аспектах указанное культивирование выполняют в устройстве G-Rex. В других аспектах указанное культивирование выполняют в биореакторе WAVE.

В определенных аспектах указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники первоначально инокулируются в указанной первой среде в количестве от 1×10^4 до 1×10^5 клеток/мл. В конкретном аспекте указанные стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники первоначально инокулируются в указанной первой среде в количестве около 3×10^4 клеток/мл.

В определенных аспектах указанная первая популяция клеток первоначально инокулируется в указанной второй среде в количестве от 5×10^4 до 5×10^5 клеток/мл. В конкретном аспекте указанная первая популяция клеток первоначально инокулируется в указанной второй среде в количестве около 1×10^5 клеток/мл.

В определенных аспектах указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанной третьей среде в количестве от 1×10^5 до 5×10^6 клеток/мл. В определенных аспектах указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанной третьей среде в количестве от 1×10^5 до 1×10^6 клеток/мл. В конкретном аспекте указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанной третьей среде в количестве около 5×10^5 клеток/мл. В более конкретном аспекте указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанной третьей среде в количестве около 5×10^5 клеток/мл в центрифужной пробирке. В конкретном аспекте указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанной третьей среде в количестве 3×10^5 клеток/мл. В более конкретном аспекте указанная вторая популяция клеток первоначально инокулируется в указанной третьей среде в количестве около 3×10^5 клеток/мл в статической культуре.

5.2.10. Изоляция клеток.

Способы изоляции NK-клеток известны в технике и могут применяться для изоляции естественных клеток-киллеров, например активированных NK-клеток или клеток TSPNK (например, клеток-предшественников NK), продуцированных с применением трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии. NK-клетки могут быть изолированы или обогащены посредством окрашивания клеток из источника ткани, например периферической крови, антителами к CD56 и CD3 и отбора клеток $CD56^+CD3^-$. NK-клетки, например активированные NK-клетки или клетки TSPNK, могут быть изолированы с применением коммерчески доступного набора, например набора для изоляции NK-клеток

(Miltenyi Biotec). NK-клетки, например активированные NK-клетки или клетки TSPNK, могут также быть изолированы или обогащены посредством удаления клеток, отличных от NK-клеток, из популяции клеток, которая содержит NK-клетки, например активированные NK-клетки или клетки TSPNK. Например, NK-клетки, например активированные NK-клетки или клетки TSPNK, могут быть изолированы или обогащены посредством деплеции клеток, демонстрирующих маркеры не являющихся NK клеток, например, антитела к одному или более из CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA DR и/или CD235a (гликофорин A). Отрицательная изоляция может быть выполнена с применением коммерчески доступного набора, например, набора для отрицательной изоляции NK-клеток (Dynal Biotech). Клетки, изолированные этими способами, могут быть дополнительно отсортированы, например, с тем чтобы разделить клетки CD16⁺ и CD16⁻.

Разделение клеток может быть выполнено, например, посредством проточной цитометрии, сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) или предпочтительно магнитной сортировки клеток с использованием микрогранул, конъюгированных со специфичными антителами. Клетки могут быть изолированы, например, с применением методики магнитно активируемой сортировки клеток (MACS), способа для разделения частиц на основании их способности связывать магнитные гранулы (например, около диаметром 0,5-100 мкм), которые содержат одно или более специфичных антител, например антител против CD56. Магнитное разделение клеток может быть выполнено и автоматизировано с применением, например, разделителя AUTOMACS[™] (Miltenyi). Множество полезных модификаций может быть выполнено на магнитных микросферах, включая ковалентное добавление антитела, которое специфично распознает конкретную молекулу поверхности клеток или гаптен. Гранулы затем смешивают с клетками, чтобы обеспечить возможность связывания. Клетки затем проходят через магнитное поле, с тем чтобы выделить клетки, имеющие конкретный маркер поверхности клеток. В одном из вариантов осуществления эти клетки могут затем быть изолированы и повторно смешаны с магнитными гранулами, соединенными с антителом против дополнительных маркеров поверхности клеток. Клетки снова проходят через магнитное поле, в результате чего выделяют клетки, которые связываются с обоими антителами. Такие клетки могут затем быть разведены в отдельных кюветах, такие как кюветы для микротитрования, в целях клональной изоляции.

В некоторых вариантах осуществления чистота изолированных или обогащенных NK-клеток может быть подтверждена посредством обнаружения одного или более из CD56, CD3 и CD16.

5.2.11. Хранение клеток/перфузата.

Клетки, например NK-клетки, продуцированные с применением способов, описанных в настоящем раскрытии, например активированные NK-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники NK), продуцированные с применением трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, или клетки плацентарного перфузата, включающие стволовые гематопоезические клетки или клетки-предшественники, или плацентарный перфузат могут храниться, т.е. размещаться в условиях, которые допускают длительное хранение, или в условиях, которые подавляют смерть клеток, например, в результате апоптоза или некроза.

Плацентарный перфузат может быть произведен путем прохождения композиции для сбора клеток по меньшей мере через часть плаценты, например через плацентарную сосудистую сеть. Композиция для сбора клеток содержит одно или более соединений, которые действуют для сохранения клеток, содержащихся в пределах перфузата. Такая композиция для сбора плацентарных клеток может содержать ингибитор апоптоза, ингибитор некроза и/или несущий кислород перфторуглерод, как описано в публикации родственной заявки на патент США № 20070190042, изобретение которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте.

В одном из вариантов осуществления перфузат или популяцию плацентарных клеток собирают из послеродовой плаценты млекопитающего, например человека, путем приведения перфузата или популяции клеток в близость с композицией для сбора клеток, содержащей ингибитор апоптоза и несущий кислород перфторуглерод, в которой указанный ингибитор апоптоза присутствует в количестве и в течение времени, являющимися достаточными для снижения или предотвращения апоптоза в популяции плацентарных клеток, например прилипающих плацентарных клеток, например плацентарных стволовых клеток или плацентарных мультипотентных клеток, по сравнению с популяцией клеток, которые не контактировали и не были приведены в близость с ингибитором апоптоза. Например, плацента может подвергаться перфузии композицией для сбора клеток, и плацентарные клетки, например тотальные имеющие ядро плацентарные клетки, изолируют из нее. В конкретном варианте осуществления ингибитор апоптоза является ингибитором каспазы. В другом конкретном варианте осуществления указанный ингибитор апоптоза является ингибитором JNK. В более конкретном варианте осуществления указанный ингибитор JNK не модулирует дифференцировку или пролиферацию прилипающих плацентарных клеток, например прилипающих плацентарных клеток или прилипающих плацентарных мультипотентных клеток. В другом варианте осуществления композиция для сбора клеток содержит указанный ингибитор апоптоза и указанный несущий кислород перфторуглерод в отдельных фазах. В другом варианте осуществления композиция для сбора клеток содержит указанный ингибитор апоптоза и указанный несущий кислород перфторуглерод в эмульсии. В другом варианте осуществления композиция для сбора клеток дополни-

тельно содержит эмульгатор, например лецитин. В другом варианте осуществления указанный ингибитор апоптоза и указанный перфторуглерод находятся при температуре между около 0 и около 25°C во время приведения плацентарных клеток в близость с композицией для сбора клеток. В другом более конкретном варианте осуществления указанный ингибитор апоптоза и указанный перфторуглерод находятся при температуре между около 2 и 10°C или между около 2 и около 5°C во время приведения плацентарных клеток в близость с композицией для сбора клеток. В другом более конкретном варианте осуществления указанное приведение в близость выполняют во время транспортировки указанной популяции клеток. В другом более конкретном варианте осуществления указанное приведение в близость выполняют во время замораживания и размораживания указанной популяции клеток.

В другом варианте осуществления плацентарный перфузат и/или плацентарные клетки могут быть собраны и сохранены путем приведения перфузата и/или клеток в близость с ингибитором апоптоза и сохраняющим органы соединением, при этом указанный ингибитор апоптоза присутствует в количестве и в течение времени, являющимися достаточными для снижения или предотвращения апоптоза клеток, по сравнению с перфузатом или плацентарными клетками, которые не входили в контакт и не приводили в близость с ингибитором апоптоза. В конкретном варианте осуществления сохраняющее органы соединение представляет собой раствор UW (описанный в патенте США № 4798824; также известный как VIASPAN™; см. также Southard et al., *Transplantation*, 49(2):251-257 (1990), или раствор, описанный в Sterne et al., патент США № 5552267, раскрытия которых включены в настоящее изобретение посредством ссылки во всей их полноте. В другом варианте осуществления указанная сохраняющая орган композиция представляет собой гидроксиэтиловый крахмал, лактобионовую кислоту, рафинозу или комбинацию указанного. В другом варианте осуществления плацентарная композиция для сбора клеток дополнительно содержит несущий кислород перфторуглерод или в двух фазах, или как эмульсию.

В другом варианте осуществления плацентарные клетки приводятся в близость с композицией для сбора клеток, содержащей ингибитор апоптоза и несущий кислород перфторуглерод, сохраняющее орган соединение или комбинацию указанного, во время перфузии. В другом варианте осуществления плацентарные клетки приводятся в близость с указанным соединением для сбора клеток после сбора посредством перфузии.

Как правило, во время сбора, обогащения и изоляции плацентарных клеток предпочтительно минимизировать или устранить клеточный стресс вследствие гипоксии и механического стресса. В другом варианте осуществления способа, таким образом, плацентарный перфузат или популяция плацентарных клеток подвергается воздействию состояния гипоксии во время сбора, обогащения или изоляции в течение менее 6 ч во время указанного хранения, при этом состояние гипоксии представляет собой концентрацию кислорода, которая составляет меньше, чем нормальная концентрация кислорода в крови. В более конкретном варианте осуществления указанный перфузат или популяция плацентарных клеток подвергаются воздействию указанного состояния гипоксии в течение менее двух ч во время указанного хранения. В другом более конкретном варианте осуществления указанная популяция плацентарных клеток подвергается воздействию указанного состояния гипоксии в течение менее 1 ч или менее 30 мин или не подвергается воздействию состояния гипоксии во время сбора, обогащения или изоляции. В другом конкретном варианте осуществления указанная популяция плацентарных клеток не подвергается воздействию механического напряжения во время сбора, обогащения или изоляции.

Клетки, например клетки плацентарного перфузата, гематопозитические клетки, например CD34⁺ стволовые гематопозитические клетки; NK-клетки, продуцированные с применением процессов, описанных в настоящем раскрытии, например активированные NK-клетки или клетки TSPNK (например, клетки-предшественники NK); изолированные прилипающие плацентарные клетки, представленные в настоящем раскрытии, могут быть подвергнуты криосохранению, например, в среде криоконсервации в малых емкостях, например ампулах или пробирках с перегородками. В конкретных вариантах осуществления клетки подвергаются или подвергались криосохранению в концентрации около 1×10^4 - 5×10^8 клеток/мл. В конкретных вариантах осуществления клетки подвергаются или подвергались криосохранению в концентрации около 1×10^6 - $1,5 \times 10^7$ клеток/мл. В более конкретных вариантах осуществления представленные в настоящем изобретении клетки подвергаются или подвергались криосохранению в концентрации около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , $1,5 \times 10^7$ клеток/мл. В определенных вариантах осуществления NK-клетки были подвергнуты криосохранению до введения. В определенных вариантах осуществления NK-клетки не были подвергнуты криосохранению до введения.

Подходящие среды для криоконсервации включают, но не ограничены указанным, нормальный солевой раствор, культуральную среду, включая, например, среду для выращивания или среду для замораживания клеток, например, коммерчески доступную среду для замораживания клеток, например C2695, C2639 или C6039 (Sigma); CryoStor® CS2, CryoStor® CS5 или CryoStor® CS10 (BioLife Solutions). В одном из вариантов осуществления культуральная среда для криоконсервации содержит DMSO (диметилсульфоксид) в концентрации, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% (об./об.). Среда для криоконсервации может содержать дополнительные средства, например метилцеллюлозу, декстран, белок (например, человеческий сывороточный альбумин), трегалозу и/или глицерин. В определенных вариантах

осуществления среда для криоконсервации содержит около 1-10% DMSO, около 25-75% декстрана и/или около 20-60% человеческого сывороточного альбумина (HSA). В определенных вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит около 1-10% DMSO около 25-75% трегалозы и/или около 20-60% человеческого HSA. В конкретном варианте осуществления среда для криоконсервации содержит 5% DMSO, 55% декстрана и 40% HSA. В более конкретном варианте осуществления среда для криоконсервации содержит 5% DMSO, 55% декстрана (10% вес./об. в нормальном солевом растворе) и 40% HSA. В другом конкретном варианте осуществления среда для криоконсервации содержит 5% DMSO, 55% трегалозы и 40% HSA. В более конкретном варианте осуществления среда для криоконсервации содержит 5% DMSO, 55% трегалозы (10% вес./об. в нормальном солевом растворе) и 40% HSA. В другом конкретном варианте осуществления среда для криоконсервации содержит CryoStor® CS5. В другом конкретном варианте осуществления среда для криоконсервации содержит CryoStor®CS10.

Клетки могут подвергаться криосохранению посредством любого из множества способов, известных в технике, и на любой стадии культивирования, расширения или дифференцировки клеток. Например, клетки, представленные в настоящем раскрытии, могут подвергаться криосохранению непосредственно после изоляции из исходных тканей или органов, например, плацентарного перфузата или пуповинной крови, или в течение, или после первого или после второго этапа способов, описанных выше. В определенных вариантах осуществления гематопозитические клетки, например стволовые гематопозитические клетки или клетки-предшественники, подвергаются криосохранению в течение около 1, 5, 10, 15, 20, 30, 45 мин или в течение около 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 или 24 ч после изоляции из исходных тканей или органов. В определенных вариантах осуществления указанные клетки подвергаются криосохранению в течение 1, 2 или 3 дней после изоляции из исходных тканей или органов. В определенных вариантах осуществления указанные клетки подвергаются криосохранению после культивирования в первой среде, как описано выше, в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней. В некоторых вариантах осуществления указанные клетки подвергаются криосохранению после культивирования в первой среде, как описано выше, в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней и во второй среде в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней, как описано выше. В некоторых вариантах осуществления, когда клетки TSPNK (например, клетки-предшественники NK) получают с применением трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, указанные клетки подвергаются криосохранению после культивирования в первой среде в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней; и/или культивирования во второй среде в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней; и/или культивирования в третьей среде в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 дней. В конкретном варианте осуществления клетки-предшественники NK получают с применением трехэтапного процесса, описанного в настоящем раскрытии, и указанные клетки подвергаются криосохранению после культивирования в первой среде в течение 9 дней; культивирования во второй среде в течение 5 дней и культивирования в третьей среде в течение 7 дней.

В одном из аспектов популяцию NK-клеток, например активированных NK-клеток, продуцируют посредством процесса, включающего в себя (а) отбор популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в первой среде, содержащей интерлейкин-15 (IL-15) и, необязательно, один или более из фактора стволовых клеток (SCF) и интерлейкина-7 (IL-7), при этом указанный IL-15 и необязательные SCF и IL-7 не содержатся в пределах неопределенного компонента указанной среды, в результате чего популяция расширяется и множество гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в пределах указанной популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников дифференцируется в NK-клетки во время указанного расширения; (b) расширение клеток с этапа (а) во второй среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2), с продуцированием популяции активированных NK-клеток и (с) охлаждение подвергаемых криосохранению NK-клеток с этапа (b) в среде для криоконсервации. В конкретном варианте осуществления указанный этап (с) дополнительно включает в себя (1) приготовления раствора суспензии клеток; (2) добавление среды для криоконсервации к раствору суспензии клеток с этапа (1), с тем чтобы получить подвергнутую криосохранению суспензию клеток; (3) охлаждение подвергнутой криосохранению суспензии клеток с этапа (3), чтобы получить подвергнутый криосохранению образец; и (4) хранение подвергнутого криосохранению образца при температуре ниже -80°C. В определенных вариантах осуществления способ не включает в себя промежуточные этапы между этапом (а) и (b) и между этапом (b) и (с) и/или какие-либо дополнительные этапы культивирования до этапа (а).

В другом варианте осуществления криосохранение популяции NK-клеток, например активированных NK-клеток или клеток TSPNK (например, клеток-предшественников NK), включает в себя (а) расширение популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в первой среде, содержащей один или более из фактора стволовых клеток (SCF), IL-2, интерлейкина-7 (IL-7) интерлейкина-15 (IL-15) и гепарина, и в которой указанные SCF, IL-2, IL-7 и IL-15 не содержатся в преде-

лах неопределенного компонента указанной среды, и при этом множество гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников в пределах указанной популяции гематопозитических стволовых клеток или клеток-предшественников дифференцируется в НК-клетки во время указанного расширения; (b) расширение клеток с этапа (a) во второй среде, содержащей интерлейкин-2 (IL-2) с продуцированием популяции активированных НК-клеток; и (c) охлаждение подвергаемых криосохранению НК-клеток с этапа (b) в среде для криоконсервации. В конкретном варианте осуществления указанный этап (c) дополнительно включает в себя (1) приготовление раствора суспензии клеток; (2) добавление среды для криоконсервации к раствору суспензии клеток с этапа (1), с тем чтобы получить подвергнутую криосохранению суспензию клеток; (3) охлаждение подвергнутой криосохранению суспензии клеток с этапа (3), чтобы получить подвергнутый криосохранению образец; и (4) хранение подвергнутого криосохранению образца при температуре ниже -80°C . В определенных вариантах осуществления способ не включает в себя промежуточные этапы между этапом (a) и (b) и между этапом (b) и (c) и/или какие-либо дополнительные этапы культивирования до этапа (a).

Клетки предпочтительно охлаждаются в программируемом криозамораживателе, например, около 0,1, 0,3, 0,5, 1 или $2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в течение криоконсервации. Предпочтительная температура криоконсервации составляет от около -80 до около -180°C , предпочтительно от около -125 до около -140°C . Криосохраненные клетки могут быть перенесены в жидкий азот до размораживания в целях использования. В некоторых вариантах осуществления, например, как только ампулы достигли около -90°C , их переносят в место хранения в жидком азоте. Криосохраненные клетки предпочтительно размораживают при температуре от около 25 до около 40°C , предпочтительно при температуре около 37°C . В определенных вариантах осуществления криосохраненные клетки размораживают после криоконсервации в течение около 1, 2, 4, 6, 10, 12, 18, 20 или 24 ч или около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней. В определенных вариантах осуществления криосохраненные клетки размораживают после криоконсервации в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 месяцев. В определенных вариантах осуществления криосохраненные клетки размораживают после криоконсервации в течение около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

Подходящая среда для размораживания содержит, но не ограничена указанным, нормальный солевой раствор, плазмалитическую культуральную среду, включая, например, среду для выращивания, например культуральную среду RPMI. В предпочтительных вариантах осуществления среда для размораживания содержит одну или более добавок к среде (например, питательные вещества, цитокины и/или факторы). Добавки к среде, подходящие для размораживания клеток, представленных в настоящем раскрытии, включают, например, но без ограничения, сыворотку, такую как человеческая сыворотка АВ, эмбриональная бычья сыворотка (FBS) или эмбриональная сыворотка теленка (FCS), витамины, человеческий сывороточный альбумин (HSA), бычий сывороточный альбумин (BSA), аминокислоты (например, L-глутамин), жирные кислоты (например, олеиновая кислота, линолевая кислота или пальмитиновая кислота) инсулин (например, рекомбинантный человеческий инсулин), трансферрин (насыщенный железом человеческий трансферрин), β -меркаптоэтанол, фактор стволовых клеток (SCF), лиганд Fms-подобной тирозинкиназы 3 (Flt3-L), цитокины, такие как интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-7 (IL-7), интерлейкин-15 (IL-15), тромбопоэтин (Тро) или гепарин. В конкретном варианте осуществления представленная в настоящем изобретении среда для размораживания, целесообразная для способов, содержит RPMI. В другом конкретном варианте осуществления указанная среда для размораживания содержит плазмалит. В другом конкретном варианте осуществления указанная среда для размораживания содержит около 0,5-20% FBS. В другом конкретном варианте осуществления указанная среда для размораживания содержит около 1, 2, 5, 10, 15 или 20% FBS. В другом конкретном варианте осуществления указанная среда для размораживания содержит около 0,5-20% HSA. В другом конкретном варианте осуществления указанная среда для размораживания содержит около 1, 2,5, 5, 10, 15 или 20% HSA. В более конкретном варианте осуществления указанная среда для размораживания содержит RPMI и около 10% FBS. В другом более конкретном варианте осуществления указанная среда для размораживания содержит плазмалит и около 5% HSA.

Способы криоконсервации, предоставленные в настоящем раскрытии, могут быть оптимизированы в целях обеспечения возможности длительного хранения или для условий, которые ингибируют некроз клеток, например апоптоз или некроз. В вариантах осуществления клетки после размораживания содержат более чем 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% жизнеспособных клеток, как определено, например, автоматическим устройством подсчета клеток или способом с окрашиванием трипановым синим. В другом варианте осуществления клетки после размораживания содержат около 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 или 25% мертвых клеток. В другом варианте осуществления клетки после размораживания содержат около 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 или 25% ранних апоптотических клеток. В другом варианте осуществления около 0,5, 1, 5, 10, 15 или 20% клеток после размораживания подвергаются апоптозу после 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28 дней после размораживания в соответствии с определенным, например, посредством анализа апоптоза (например, набор для анализа апоптоза TO-PRO3 или AnnV/PI). В определенных вариантах осуществления клетки после размораживания под-

вергаются повторному криосохранению после культивирования, расширения или дифференцировки с применением способов, представленных в настоящем раскрытии.

5.3. Генетически модифицированные НК-клетки.

В другом аспекте НК-клетки могут быть генетически модифицированы, чтобы повысить специфичность нацеливания и/или хоминг-специфичность.

В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные НК-клетки представляют собой НК-клетки, которые содержат химерный антигенный рецептор (CAR). CAR представляет собой искусственный мембраносвязанный белок, который направляет иммуноцит (например, Т-лимфоцит) к антигену и стимулирует иммуноцит на уничтожение клетки, демонстрирующей антиген. См., например, Эсхар, патент США № 7741465; публикацию заявки на патент США № 2012/0093842; публикацию международной заявки № WO 2014/100385 и публикацию международной заявки № WO 2014/124143. Как минимум CAR содержит внеклеточный домен, который связывается с антигеном, например антигеном на клетке, трансмембранный домен и внутриклеточный (эндоплазматический) сигнальный домен (т.е. внутриклеточный стимулирующий домен), который передает первичный сигнал активации иммуноциту. Если все другие условия удовлетворены, то, когда CAR экспрессируется на поверхности, например, Т-лимфоцита, например первичного Т-лимфоцита, и внеклеточный домен CAR связывается с антигеном, внутриклеточный сигнальный домен передает сигнал Т-лимфоциту на активацию и/или пролиферацию и, если антиген присутствует на поверхности клеток, на уничтожение клетки, экспрессирующей антиген. Поскольку некоторые иммуноциты, например Т-лимфоциты и НК-клетки, требуют двух сигналов, первичный сигнал активации и костимулирующий сигнал, для того чтобы максимально активироваться, то CAR могут также дополнительно содержать костимулирующий домен, в результате чего связывание антигена с внеклеточным доменом приводит к передаче и первичного сигнала активации, и костимулирующего сигнала.

Адаптивные иммунные ответы инициируются во вторичных лимфоидных органах, включая лимфатические узлы. В-клетки и Т-клетки изолируются в различных областях лимфатических узлов, называемых "зона В-клеток", расположенная во внешней коре лимфатического узла или фолликулах, и "зона Т-клеток", которая является более диффузно распределенной в области, окружающей фолликулы (также известной как паракортекс) соответственно. В-клетки и Т-клетки экспрессируют рецепторы, которые позволяют им перемещаться к этим соответствующим зонам, с тем чтобы они могли быть подвергнуты воздействию антигена. Интактные антигены присутствуют в зоне В-клеток, тогда как в зоне Т-клеток антигены представлены антигенпредставляющими клетками, такими как дендритные клетки. Интактные антигены, такие как антигены опухоли, также присутствуют в местоположении опухоли.

В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные НК-клетки представляют собой НК-клетки, которые содержат хоминг-рецептор, который вызывает перемещение клетки, содержащей указанный хоминг-рецептор, к специфической анатомической зоне, специфической ткани или специфическому типу клеток, например к зоне В-клеток лимфатических узлов, желудочно-кишечному тракту или коже.

В определенных вариантах осуществления генетически модифицированные НК-клетки представляют собой НК-клетки, которые содержат и CAR, и хоминг-рецептор в соответствии с описанным в настоящем раскрытии.

Не желая быть связанным каким-либо конкретным механизмом или теорией, считается, что, когда генетически модифицированные клетки по настоящему раскрытию экспрессируют хоминг-рецепторы, которые вызывают перемещение клетки, экспрессирующей указанный хоминг-рецептор, к специфической зоне, они имеют большую вероятность подвергнуться воздействию нативного антигена, где клетки, например, клетки, экспрессирующие CAR, могут стать активированными.

НК-клетки, которые содержат CAR и/или хоминг-рецептор, могут генерироваться любым способом, известным в технике. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки, содержащие CAR и/или хоминг-рецептор, сначала продуцируют, как описано в разделе 5.2 (например, посредством двухэтапного процесса или трехэтапного процесса), и затем конструируют таким образом, чтобы они экспрессировали CAR и/или хоминг-рецептор, путем внесения в НК-клетки (например, трансфекцией) одного или более векторов, содержащих последовательность(и) нуклеиновых кислот, кодирующую(ие) CAR и/или хоминг-рецептор. В некоторых вариантах осуществления клетки (например, CD34⁺ стволовые гематопозитические клетки), из которых могут быть продуцированы НК-клетки, сначала конструируют таким образом, чтобы они экспрессировали CAR и/или хоминг-рецептор, путем внесения в клетки (например, трансфекцией) одного или более векторов, содержащих последовательность(и) нуклеиновых кислот, кодирующую(ие) CAR и/или хоминг-рецептор, и затем применяют для получения НК-клеток, содержащих CAR и/или хоминг-рецептор посредством любого процесса, описанного в разделе 5.2 (например, посредством двухэтапного процесса или трехэтапного процесса).

5.3.1. Общая структура и внутриклеточный домен CAR.

В определенных вариантах осуществления внутриклеточный домен CAR представляет собой или содержит внутриклеточный домен или мотив белка, который экспрессируется на поверхности иммуноцитов и вызывает активацию и/или пролиферацию указанных НК-клеток. Такой домен или мотив спосо-

бен передавать первичный антигенсвязывающий сигнал, который является необходимым для активации NK-клетки в ответ на связывание антигена с внеклеточной частью CAR. Как правило, этот домен или мотив содержат или представляют собой ITAM (иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив). ITAM-содержащие полипептиды, подходящие для CAR, содержат, например, дзета-цепь CD3 (CD3 ζ) или ее ITAM-содержащие части. В конкретном варианте осуществления внутриклеточный домен представляет собой внутриклеточный сигнальный домен CD3 ζ . В других конкретных вариантах осуществления внутриклеточный домен состоит из цепи рецептора лимфоцитов, белкового комплекса TCR/CD3, субъединицы Fc-рецептора или субъединицы рецептора IL-2.

В определенных вариантах осуществления CAR дополнительно содержит один или более костимулирующих доменов или мотивов, например, в качестве части внутриклеточного домена полипептида. Один или более костимулирующих доменов или мотивов могут представлять собой или могут содержать одну или более последовательностей из последовательности костимулирующего полипептида CD27, последовательности костимулирующего полипептида CD28, последовательности костимулирующего полипептида OX40 (CD134), последовательности костимулирующего полипептида 4-1BB (CD137), последовательности костимулирующего индуцируемого Т-клеточного костимулирующего пептида (ICOS), последовательности костимулирующего полипептида PD-1, последовательности костимулирующего полипептида CTLA-4, последовательности костимулирующего полипептида NKp46, последовательности костимулирующего полипептида NKp44, последовательности костимулирующего полипептида NKp30, последовательности костимулирующего полипептида NKG2D, последовательности костимулирующего полипептида DAP10, последовательности костимулирующего полипептида DAP12 или другого костимулирующего домена или мотива.

Трансмембранная область может представлять собой произвольную трансмембранную область, которая может быть встроена в функциональный CAR, обычно, трансмембранную область из молекулы CD4 или CD8.

5.3.2. Внеклеточный домен CAR.

Внеклеточный домен полипептида связывается с необходимым антигеном. В определенных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит рецептор или часть рецептора, который(ая) связывается с указанным антигеном. Внеклеточный домен может представлять собой, например, рецептор или часть рецептора, который(ая) связывается с указанным антигеном. В определенных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит или представляет собой антитело или его антигенсвязывающую часть. В конкретных вариантах осуществления внеклеточный домен содержит или представляет собой одноцепочечный домен Fv. Одноцепочечный доменкером, Fv может содержать, например, V_L, соединенную с V_H гибким линкером, при этом указанные V_L и V_H взяты из антитела, которое связывает указанный антиген.

Антиген, с которым внеклеточный домен полипептида связывается, может представлять собой любой необходимый антиген, например может представлять собой антиген на опухолевой клетке или антиген на инфицированной клетке. Опухолевая клетка может являться, например, клеткой в солидной опухоли или клеткой рака крови. Антиген может представлять собой любой антиген, который экспрессируется на клетке любого типа опухоли или рака, например клетках лимфомы, рака легких, рака молочной железы, рака простаты, аденокарциномы рака, рака щитовидной железы, носоглоточного рака, меланомы, например, злокачественной меланомы, рака кожи, колоректального рака, десмоидной опухоли, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эндокринной опухоли, саркомы Юинга, периферической примитивной нейроэктодермальной опухоли, солидной эмбрионально-клеточной опухоли, гептобластомы, нейробластомы, не являющейся рабдомиосаркомой саркомы мягкой ткани, остеогенной саркомы, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, опухоли Вильмса, глиобластомы, миксомы, фибромы, липомы и т.п. В более конкретных вариантах осуществления указанная лимфома может представлять собой хронический лимфоцитарный лейкоз (лимфому из малых лимфоцитов), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоцитоз, лимфоплазматическую лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, лимфому маргинальной зоны селезенки, миеломная болезнь плазматических клеток, плазматомы, экстраклеточную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, лимфому MALT, нодальную В-клеточную лимфому из клеток маргинальной зоны, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантии, диффузную В-крупноклеточную лимфому, средостенную (тимусную) В-крупноклеточную лимфому, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфому Беркитта, Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз из больших гранулированных лимфоцитов, агрессивный NK-клеточный лейкоз, Т-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, экстраклеточную NK/Т-клеточную лимфому, носовой тип, Т-клеточный лейкоз энтеропатического типа, Т-клеточную лимфому печени и селезенки, бластическую NK-клеточную лимфому, фунгоидный микоз, синдром Сезари, первичную кожную анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфоматозный папулез, ангиоиммунобластическую лимфому Т-лимфоцитов, периферическую лимфому Т-лимфоцитов (неопределенную), анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому или множественную миелому.

В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой ассоциированный с опухолью антиген (ТАА) или специфичный для опухоли антиген (ТSA). В различных конкретных вариантах осуществления, без ограничения, ассоциированный с опухолью антиген (ТАА) или специфичный для опухоли антиген представляет собой Her2, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), альфа-фетопротеин (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), раковый антиген-125 (CA-125), CA19-9, калретицин, MUC-1, эпителиальный мембранный белок (EMA), эпителиальный антиген опухоли (ETA), тирозиназу, ассоциированный с меланомой антиген (MAGE), CD19, CD20, CD34, CD45, CD99, CD117, хромогранин, цитокератин, десмин, глиофибрилярный кислый белок (GFAP), белок жидкости макроскопического поликистоза (GCDFP-15), антиген HMB-45, высокомолекулярный ассоциированный с меланомой антиген (HMW-MAA), белок мелан-А (MART-1), мио-D1, мышечеспецифичный актин (MSA), нейрофиламент, нейрон-специфическую енолазу (NSE), плацентарную щелочную фосфатазу, синаптофизин, тиреоглобулин, транскрипционный фактор щитовидной железы-1, димерную форму изофермента пируваткиназы типа M2 (опухоль M2-PK), патологический gas-белок или патологический белок p53.

В определенных вариантах осуществления ТАА или TSA представляет собой антиген рака/яичек (CT), например BAGE, CAGE, CTAGE, FATE, GAGE, HCA661, HOM-TES-85, MAGEA, MAGEB, MAGEC, NA88, NY-ESO-1, NY-SAR-35, OY-TES-1, SPANXB1, SPA17, SSX, SYCP1 или TPTE.

В определенных других вариантах осуществления ТАА или TSA представляет собой углевод или ганглиозид, например fuc-GM1, GM2 (онкофетальный иммуногенный антиген-1; OFA-I-1); GD2 (OFA-I-2), GM3, GD3 и т.п.

В определенных других вариантах осуществления ТАА или TSA представляет собой альфа-актинин-4, Bage-1, BCR-ABL, слитый белок Bcr-Abl, бета-катенин, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA 50, CAM43, Casp-8, cdc27, cdk4, cdkn2a, CEA, coa-1, слитый белок dek-can, EBNA, EF2, антигены вируса Эпштейна-Барр, слитый белок ETV6-AML1, HLA-A2, HLA-A11, hsp70-2, KIAA0205, Mart2, Mum-1, 2 и 3, нео-PAP, миозин класса I, OS-9, слитый белок pml-RAR α , PTPRK, K-ras, N-ras, триозофосфатизомеразу, Gage 3, 4, 5, 6, 7, GnTV, Herv-K-mel, Lage-1, NA-88, NY-Eso-1/Lage-2, SP17, SSX-2, TRP2-Int2, gp100 (Pmel 17), тирозиназу, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, RAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15 (58), RAGE, SCP-1, Hom/Mel-40, PRAME, p53, H-Ras, HER-2/neu, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, антигены вируса папилломы человека (HPV) E6 и E7, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, 13-катенин, Mum-1, p16, TAGE, PSMA, CT7, теломеразу, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, 13HCG, BCA225, BTAA, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733 (EpCAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7 Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA 90, TAAL6, TAG72, TLP, TPS, CD19, CD22, CD27, CD30, CD70, GD2 (ганглиозид G2), EGFRvIII (вариант III эпидермального фактора роста), белок спермы 17 (Sp17), мезотелин, PAP (простатическая кислая фосфатаза), простенин, TARP (белок альтернативной рамки считывания гамма-цепи Т-клеточного рецептора), Tgpr8, STEAP1 (шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы-1), патологический gas-белок или патологический белок p53. В другом конкретном варианте осуществления указанный ассоциированный с опухолью антиген или специфичный для опухоли антиген представляет собой интегрин $\alpha\text{v}\beta 3$ (CD61), галактин, K-Ras (вирусный онкоген крысиной саркомы Кирстена V-Ki-ras2) или Ral-B.

В конкретных вариантах осуществления ТАА или TSA представляет собой CD20, CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138, ROR1, FAP, MUC1, PSCA, EGFRvIII, EPHA2 или GD2. В дальнейших конкретных вариантах осуществления ТАА или TSA представляет собой CD123, CLL-1, CD38 или CS-1. В конкретном варианте осуществления внеклеточный домен CAR связывает CS-1. В дальнейшем конкретном варианте осуществления внеклеточный домен содержит одноцепочечную версию элутузумаба и/или антигенсвязывающего фрагмента элутузумаба. В конкретном варианте осуществления внеклеточный домен CAR связывает CD20. В более конкретном варианте осуществления внеклеточный домен CAR представляет собой scFv или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с CD20.

Другие ассоциированные с опухолью и специфичные для опухоли антигены известны специалистам в данной области техники.

Антитела и scFv, которые связываются с TSA и ТАА, известны в технике, так же как и нуклеотидные последовательности, которые кодируют их.

В определенных конкретных вариантах осуществления антиген представляет собой антиген, который не считают являющимся TSA или ТАА, но который тем не менее ассоциирован с опухолевыми клетками или повреждениями, вызываемыми опухолью. В конкретных вариантах осуществления антиген представляет собой ассоциированный с микроокружением опухоли антиген (ТМАА). В определенных вариантах осуществления, например, ТМАА представляет собой, например, фактор роста, цитокин или интерлейкин, например фактор роста, цитокин или интерлейкин, ассоциированный с ангиогенезом или образованием и развитием сосудов. Такие факторы роста, цитокины или интерлейкины могут включать в себя, например, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), инсулиноподобный фактор ро-

ста (IGF) или интерлейкин-8 (IL-8). Опухоли могут также создавать гипоксическую среду, локальную для опухоли. Также в других конкретных вариантах осуществления ТМАО представляет собой ассоциированный с гипоксией фактор, например, HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α , HIF-2 β , HIF-3 α или HIF-3 β . Опухоли могут также вызывать повреждение здоровой ткани, вызывая высвобождение молекул, о которых известно, что они вызывают повреждение ассоциированных молекул молекулярных паттернов (DAMP; также известные как алармины). В определенных других конкретных вариантах осуществления, таким образом, ТМАО представляет собой DAMP, например белок теплового шока, хроматин-ассоциированный Box1-белок из группы белков высокой мобильности (HMGB1), S100A8 (MRP8, калгранулин А), S100A9 (MRP14, калгранулин В), сывороточный амилоид (SAA), или может представлять собой дезоксирибонуклеиновую кислоту, аденозинтрифосфат, мочевую кислоту или гепаринсульфат. В конкретных вариантах осуществления ТМАО представляет собой VEGF-A, EGF, PDGF, IGF или bFGF.

В конкретном варианте осуществления, в котором рак представляет собой желудочно-кишечный рак, например рак печени, рак желудка, рак пищевода, рак желчного пузыря, рак ободочной и прямой кишки, рак анального канала или рак поджелудочной железы, антиген представляет собой антиген, специфичный или ассоциированный с желудочно-кишечным раком. В конкретном варианте осуществления NK-клетки содержат желудочно-кишечный хоминг-рецептор и также содержат CAR с внеклеточным доменом, который связывается с антигеном, ассоциированным с желудочно-кишечным раком. В конкретном варианте осуществления внеклеточный домен CAR связывает CEA. В других конкретных вариантах осуществления внеклеточный домен CAR связывает Her2, CA242, MUC1, CA125 или CA19-9.

В конкретном варианте осуществления, в котором рак представляет собой рак кожи, например меланому, плоскоклеточную карциному или базально-клеточную карциному, антиген представляет собой антиген, специфичный или ассоциированный с раком кожи. В конкретном варианте осуществления NK-клетки содержат хоминг-рецептор для кожи и также содержат CAR с внеклеточным доменом, который связывается с антигеном, ассоциированным с раком кожи. В конкретном варианте осуществления внеклеточный домен CAR связывает HMW-MAA. В других конкретных вариантах осуществления внеклеточный домен CAR связывает Her2, GD2, GD3, CEA или SPAG9.

В определенных вариантах осуществления внеклеточный домен соединяется с указанным трансмембранным доменом посредством линкера, спейсера или шарнирной полипептидной последовательности, например, последовательностью из CD28.

5.3.3. Хоминг-рецепторы системы кровообращения.

В определенных вариантах осуществления хоминг-рецептор вызывает перемещение клетки, содержащей указанный хоминг-рецептор, в систему кровообращения. Такой рецептор в настоящем изобретении называют "хоминг-рецептор системы кровообращения". В различных вариантах осуществления хоминг-рецептор системы кровообращения является хемотаксическим рецептором. В конкретном варианте осуществления хемотаксический рецептор представляет собой CXCR4, VEGFR2 или CCR7.

В одном из вариантов осуществления хоминг-рецептор вызывает перемещение клетки, содержащей указанный хоминг-рецептор, в костный мозг. Такой рецептор в настоящем изобретении называют "хоминг-рецептор костного мозга". В конкретных вариантах осуществления хоминг-рецептор костного мозга представляет собой CXCR4, например, человеческий CXCR4. Под кодами доступа GenBankTM NM 001008540.1 и NM 003467.2 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого CXCR4. Под кодами доступа GenBankTM NP 001008540.1 и NP 003458.1 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого CXCR4. Типовые нуклеотидные и аминокислотные последовательности для человеческих хоминг-рецепторов можно найти в таблице.

В другом варианте осуществления хоминг-рецептор вызывает перемещение клетки, содержащей указанный хоминг-рецептор, к вторичному лимфоидному органу, например лимфатическому узлу. Такой рецептор в настоящем изобретении называют "хоминг-рецептор вторичного лимфоидного органа". В конкретных вариантах осуществления хоминг-рецептор вторичного лимфоидного органа представляет собой CCR7, например, человеческий CCR7. Под кодами доступа GenBankTM NM 001301714.1, NM 001301716.1, NM 001301717.1, NM 001301718.1 и NM 001838.3 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого CCR7. Под кодами доступа GenBankTM NP 001288643.1, NP 001288645.1, NP 001288646.1, NP 001288647.1 и NP 001829.1 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого CCR7. Типовые нуклеотидные и аминокислотные последовательности для человеческих хоминг-рецепторов можно найти в таблице.

В другом варианте осуществления хоминг-рецептор вызывает перемещение клетки, содержащей указанный хоминг-рецептор, в эндотелий сосудов. Такой рецептор в настоящем изобретении называют "хоминг-рецептор эндотелия сосудов". В конкретных вариантах осуществления хоминг-рецептор эндотелия сосудов представляет собой VEGFR2, например человеческий VEGFR2. Под кодом доступа GenBankTM NM 002253.2 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого VEGFR2. Под кодом доступа GenBankTM NP 002244.1 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого VEGFR2. Типовые нуклеотидные и аминокислотные последовательности для человеческих хоминг-рецепторов можно найти в таблице.

В другом варианте осуществления хоминг-рецептор вызывает перемещение клетки, содержащей указанный хоминг-рецептор, в зону В-клеток лимфатических узлов, например фолликулы лимфатического узла. Такой рецептор в настоящем изобретении называют "хоминг-рецептор зоны В-клеток". В конкретных вариантах осуществления хоминг-рецептор зоны В-клеток представляет собой CXCR5, например человеческий CXCR5. Под кодами доступа GenBank™ NM 001716.4 и NM 032966.2 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого CXCR5. Под кодами доступа GenBank™ NP 116743.1 и NP 001707.1 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого CXCR5. Типовые нуклеотидные и аминокислотные последовательности для человеческих хоминг-рецепторов можно найти в таблице.

В некоторых вариантах осуществления этап конструирования NK-клетки, содержащей хоминг-рецептор системы кровообращения, включает в себя этап введения в клетки одного или более векторов, содержащих последовательность(и) нуклеиновых кислот рецептора(ов), т.е. последовательность(и) нуклеиновых кислот, кодирующую(ие) рецептор(ы). В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CXCR4, CCR7, VEGFR2 или CXCR5. В определенном варианте осуществления этап конструирования NK-клетки, содержащей хоминг-рецептор системы кровообращения, выполняют любым способом, известным специалисту в данной области техники.

Также в настоящем изобретении описан способ генерации генно-инженерных NK-клеток, которые перемещаются в систему кровообращения, включающий в себя этап конструирования NK-клетки, содержащей хоминг-рецептор системы кровообращения, например CXCR4, CCR7, VEGFR2 или CXCR5, при этом указанный хоминг-рецептор системы кровообращения экспрессируется клеткой на достаточном уровне или в достаточном количестве, чтобы вызывать перемещение клетки в систему кровообращения. В некоторых вариантах осуществления этап конструирования NK-клетки, содержащей хоминг-рецептор системы кровообращения, включает в себя этап введения в клетки одного или более векторов, содержащих последовательность(и) нуклеиновых кислот рецептора(ов), т.е. последовательность(и) нуклеиновых кислот, кодирующую(ие) рецептор(ы). В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CXCR4, CCR7, VEGFR2 или CXCR5. В определенном варианте осуществления этап конструирования NK-клетки, содержащей хоминг-рецептор системы кровообращения, выполняют любым способом, известным специалисту в данной области техники.

5.3.4. Желудочно-кишечные хоминг-рецепторы.

В одном из вариантов осуществления хоминг-рецептор вызывает перемещение клетки, содержащей указанный хоминг-рецептор, к желудочно-кишечному тракту, например желудочно-кишечным органам, тканям или клеткам. Такой рецептор, который вызывает перемещение клетки к желудочно-кишечному тракту, в настоящем изобретении называют "желудочно-кишечный хоминг-рецептор". В определенных вариантах осуществления желудочно-кишечный хоминг-рецептор представляет собой CCR9 или интегрин $\alpha 4\beta 7$, например человеческий CCR9 или человеческий интегрин $\alpha 4\beta 7$. Под кодами доступа GenBank™ NM 031200.2 и NM001256369.1 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого CCR9. Под кодами доступа GenBank™ NP 112477.1 и NP 001243298.1 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого CCR9. Под кодами доступа GenBank™ NM 0008 85.4 и NM 000889.2 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого $\alpha 4$ и человеческого $\beta 7$ соответственно. Под кодами доступа GenBank™ NP 000876.3 и NP 000880.1 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого $\alpha 4$ и человеческого $\beta 7$ соответственно. Типовые нуклеотидные и аминокислотные последовательности для человеческих хоминг-рецепторов можно найти в таблице. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки дополнительно содержат второй желудочно-кишечный хоминг-рецептор. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат первый желудочно-кишечный хоминг-рецептор, при этом первый желудочно-кишечный хоминг-рецептор представляет собой CCR9, и дополнительно содержат второй желудочно-кишечный хоминг-рецептор, при этом второй желудочно-кишечный хоминг-рецептор представляет собой интегрин $\alpha 4\beta 7$. В других конкретных вариантах осуществления NK-клетки содержат желудочно-кишечный хоминг-рецептор CXCR3.

В определенных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие один или более желудочно-кишечных хоминг-рецепторов, расширяются, активируются или и расширяются, и активируются в присутствии метаболита витамина А. В конкретных вариантах осуществления расширение, активация или и расширение, и активация происходят *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. В конкретных вариантах осуществления метаболит витамина А представляет собой ретиноевую кислоту. В определенных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие один или более желудочно-кишечных хоминг-рецепторов, дополнительно содержат хоминг-рецептор зоны В-клеток. В конкретных вариантах осуществления хоминг-рецептор зоны В-клеток представляет собой CXCR5.

Также в настоящем изобретении описаны способы генерации генетически модифицированных NK-клеток, которые перемещаются к желудочно-кишечному тракту, например желудочно-кишечным органам, коже или ткани. В определенных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие один или более хоминг-рецепторов, которые вызывают перемещение клетки, содержащей один или более рецеп-

торов, к желудочно-кишечному тракту, например CCR9 или интегрин $\alpha 4\beta 7$, генерируют посредством способа, включающего в себя этап конструирования НК-клетки, экспрессирующей один или более желудочно-кишечных хоминг-рецепторов. В некоторых вариантах осуществления этап конструирования НК-клетки, содержащей один или более желудочно-кишечных хоминг-рецепторов, включает в себя введение в клетки одного или более векторов, содержащих последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую хоминг-рецептор. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR9, нуклеотидную последовательность для человеческого интегрин $\alpha 4\beta 7$, или обе последовательности.

В определенных вариантах осуществления НК-клетки, которые перемещаются к желудочно-кишечному тракту, генерируют посредством способа, включающего в себя этап обработки клеток молекулой, которая индуцирует экспрессию одного или более желудочно-кишечных хоминг-рецепторов, например CCR9 или $\alpha 4\beta 7$. В конкретных вариантах осуществления молекула представляет собой витамин А.

В определенных вариантах осуществления способ для генерации генетически модифицированных НК-клеток, которые содержат один или более рецепторов, которые вызывают перемещение клеток, содержащих эти один или более рецепторов, к желудочно-кишечному тракту, включает в себя этап расширения клеток, и данный этап выполняют в присутствии метаболита витамина А. В определенных вариантах осуществления способ для генерации генетически модифицированных НК-клеток, которые содержат один или более рецепторов, вызывающих перемещение к желудочно-кишечному тракту, включает в себя этап активирования клеток, и данный этап выполняют в присутствии метаболита витамина А. В определенных вариантах осуществления и этапы расширения, и этапы активирования выполняют в присутствии метаболита витамина А. В определенных вариантах осуществления метаболит витамина А представляет собой ретиноевую кислоту. В определенном варианте осуществления этап конструирования НК-клетки, содержащей желудочно-кишечный хоминг-рецептор, выполняют любым способом, известным специалисту в данной области техники.

5.3.5. Хоминг-рецепторы кожи.

В одном из вариантов осуществления хоминг-рецептор вызывает перемещение клетки, содержащей указанный хоминг-рецептор, в кожу, например ткани или клетки кожи. В определенных вариантах осуществления хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR10, CCR8, CCR4 или CLA, например человеческий CCR10, человеческий CCR8, человеческий CCR4 или человеческий CLA. Под кодами доступа GenBank™ NM 016602.2 и AF215981.1 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого CCR10. Под кодами доступа GenBank™ NP 057 686.2 и P46092.3 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого CCR10. Под кодами доступа GenBank™ NM 005201.3 и BC107159.1 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого CCR8. Под кодами доступа GenBank™ NP 005192.1 и AAI07160.1 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого CCR8. Под кодом доступа GenBank™ NM 005508.4 представлена типовая нуклеотидная последовательность для человеческого CCR4. Под кодом доступа GenBank™ P51679.1 представлена типовая аминокислотная последовательность для человеческого CCR4. Под кодами доступа GenBank™ NM 001206609.1 и NM 003006.4 представлены типовые нуклеотидные последовательности для человеческого CLA. Под кодами доступа GenBank™ NP 001193538.1 и NP 002997.2 представлены типовые аминокислотные последовательности для человеческого CLA. Типовые нуклеотидные и аминокислотные последовательности для человеческих хоминг-рецепторов можно найти в таблице. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки дополнительно содержат второй хоминг-рецептор кожи. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки содержат первый хоминг-рецептор кожи, при этом первый хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR10, и дополнительно содержат второй хоминг-рецептор кожи, при этом второй хоминг-рецептор кожи представляет собой CLA. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки содержат первый хоминг-рецептор кожи, при этом первый хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR10, и дополнительно содержат второй хоминг-рецептор кожи, при этом второй хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR4. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки содержат первый хоминг-рецептор кожи, при этом первый хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR4, и дополнительно содержат второй хоминг-рецептор кожи, при этом второй хоминг-рецептор кожи представляет собой CLA. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки содержат первый хоминг-рецептор кожи, при этом первый хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR10, дополнительно содержат второй хоминг-рецептор кожи, при этом второй хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR4, и дополнительно содержат третий хоминг-рецептор кожи, при этом третий хоминг-рецептор кожи представляет собой CLA. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки содержат первый хоминг-рецептор кожи, при этом первый хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR8, и дополнительно содержат второй хоминг-рецептор кожи, при этом второй хоминг-рецептор кожи представляет собой CLA, CCR4 или CCR10. В некоторых вариантах осуществления НК-клетки содержат первый хоминг-рецептор кожи, при этом первый хоминг-рецептор кожи представ-

ляет собой CCR8, и дополнительно содержат второй хоминг-рецептор кожи, при этом второй хоминг-рецептор кожи представляет собой CLA, CCR4 или CCR10, и дополнительно содержат третий хоминг-рецептор кожи, при этом третий хоминг-рецептор кожи отличается от второго хоминг-рецептора кожи и выбирается из группы, состоящей из CLA, CCR4 и CCR10. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки дополнительно содержат третий хоминг-рецептор кожи. В некоторых вариантах осуществления NK-клетки содержат первый хоминг-рецептор кожи, при этом первый хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR10, дополнительно содержат второй хоминг-рецептор кожи, при этом второй хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR4, дополнительно содержат третий хоминг-рецептор кожи, при этом третий хоминг-рецептор кожи представляет собой CLA, и дополнительно содержат четвертый хоминг-рецептор кожи, при этом четвертый хоминг-рецептор кожи представляет собой CCR8. В определенных вариантах осуществления NK-клетки содержат один или более хоминг-рецепторов кожи. В других конкретных вариантах осуществления NK-клетки содержат хоминг-рецептор кожи CCR6.

В определенных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие один или более хоминг-рецепторов кожи, расширяются, активируются или и расширяются, и активируются в присутствии метаболита витамина D. В конкретных вариантах осуществления расширение, активация или и расширение, и активация происходят *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. В конкретных вариантах осуществления метаболит витамина D представляет собой 1,25-дигидроксисолекальциферол ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). В определенных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие один или более хоминг-рецепторов кожи, расширяются, активируются или и расширяются, и активируются в присутствии IL-12. В конкретных вариантах осуществления расширение, активация или и расширение, и активация происходят *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. В более конкретных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие один или более хоминг-рецепторов кожи, расширяются, активируются или и расширяются, и активируются в присутствии метаболита витамина D и IL-12. В конкретных вариантах осуществления расширение, активация или и расширение, и активация происходят *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. В определенных вариантах осуществления NK-клетки, содержащие один или более хоминг-рецепторов кожи, дополнительно содержат хоминг-рецептор зоны В-клеток. В конкретных вариантах осуществления хоминг-рецептор зоны В-клеток представляет собой CXCR5.

Также в настоящем изобретении описаны способы генерации генетически модифицированных NK-клеток, которые перемещаются в кожу, например ткани или клетки кожи. В определенных вариантах осуществления NK-клетки, которые перемещаются в кожу, генерируют посредством способа, включающего в себя этап конструирования NK-клетки, содержащей хоминг-рецептор кожи, например CCR4, CCR8, CCR10 или CLA. В некоторых вариантах осуществления этап конструирования NK-клетки, содержащей хоминг-рецептор кожи, включает в себя введение в клетки одного или более векторов, содержащих последовательность(и) нуклеиновых кислот рецептор(ов), т.е. последовательность(и) нуклеиновых кислот, кодирующую(ие) рецептор(ы). В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR10, нуклеотидную последовательность для человеческого CLA, или обе последовательности. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR4 и, необязательно, содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CLA. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR4 и нуклеотидную последовательность для человеческого CCR10. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR10, нуклеотидную последовательность для человеческого CCR4 и нуклеотидную последовательность для человеческого CLA. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR8. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR8 и, необязательно, нуклеотидную последовательность для человеческого CLA. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR8 и нуклеотидную последовательность для человеческого CCR10. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR8, нуклеотидную последовательность для человеческого CCR4 и нуклеотидную последовательность для человеческого CLA. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR8, нуклеотидную последовательность для человеческого CCR10 и нуклеотидную последовательность для человеческого CLA. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR8, нуклеотидную последовательность для человеческого CCR4 и нуклеотидную последовательность для человеческого CCR10. В конкретных вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность для человеческого CCR8, нуклеотидную последовательность для человеческого CCR4, нуклеиновую кислоту для CCR10 и нуклеотидную последовательность для человеческого CLA.

В определенных вариантах осуществления клетки, например NK-клетки, которые перемещаются к коже, генерируют посредством способа, включающего в себя этап обработки клеток, например NK-клеток, молекулой, которая индуцирует, например повышает, экспрессию одного или более хоминг-рецепторов кожи, например CCR4, CCR10, CCR8 или CLA. В конкретных вариантах осуществления мо-

лекула представляет собой витамин D. В определенных вариантах осуществления индуцированию экспрессии хоминг-рецепторов кожи способствуют посредством обработки клеток, например НК-клеток, IL-12, например контактирования клеток с IL-12 в количестве и в течение периода времени, являющихся достаточными для повышения экспрессии одного или более из CCR4, CCR8, CCR10 или CLA указанными клетками.

В определенных вариантах осуществления способ для генерации НК-клеток, которые содержат один или более хоминг-рецепторов, которые вызывают перемещение клетки, содержащей один или более этих рецепторов, в кожу, включает в себя этап расширения клеток, и этот этап выполняют в присутствии метаболита витамина D и, необязательно, IL-12. В определенных вариантах осуществления способ для генерации НК-клеток, которые содержат один или более рецепторов, которые вызывают перемещение клетки, содержащей один или более этих рецепторов, к желудочно-кишечному тракту, включает в себя этап активирования клеток, и этот этап выполняют в присутствии метаболита витамина D и, необязательно, IL-12. В определенных вариантах осуществления и этапы расширения, и этапы активирования выполняют в присутствии метаболита витамина D и, необязательно, IL-12. В определенных вариантах осуществления метаболит витамина D представляет собой 1,25(OH)₂D₃. В определенном варианте осуществления этап конструирования НК-клетки, содержащей хоминг-рецептор кожи, выполняют любым способом, известным специалисту в данной области техники.

Типовые нуклеотидные и аминокислотные последовательности
для человеческих хоминг-рецепторов

ID SEQ NO:	Код доступа GenBank и описание	Последовательность
1	NM_001008540.1 Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая изоформу человека CXCR4	1 ttttttttct tcctctagtg gggcggggca gaggagtttag ccaagatgtg actttgaaac 61 cctcagcgtc tcagtgcct tttgttctaa acaaagaatt ttgtaattgg ttctacaaa 121 gaaggatata atgaagtcac tatgggaaaa gatggggagg agagttgtag gattctacat 181 taattctctt gtgcccttag ccactactt cagaatttcc tgaagaaagc aagcctgaat 241 tggtttttta aattgcttta aaaatttttt ttaactgggt taatgcttgc tgaattggaa 301 gtgaatgtcc attcctttgc ctcttttgca gatatacact tcagataact acaccgagga 361 aatgggctca ggggactatg actccatgaa ggaaccctgt ttccgtgaag aaaatgctaa 421 tttcaataaa atcttcctgc ccaccatcta ctccatcatc ttcttaactg gcattgtggg 481 caatggattg gtcacctctg tcatgggtta ccagaagaaa ctgagaagca tgacggacaa 541 gtacaggctg cacctgtcag tggccgacct cctctttgtc atcacgcttc ccttctgggc 601 agttgatgcc gtggcaaaact ggtactttgg gaacttctta tgcaaggcag tccatgtcat 661 ctacacagtc aacctctaca gcagtgtcct catcctggcc ttcatcagtc tggaccgcta

721	cctggccatc	gtccacgcca	ccaacagtca	gaggccaagg
	aagctgttgg	ctgaaaaggt		
781	ggtctatgtt	ggcgtctgga	tccctgccct	cctgctgact
	attcccgact	tcattctttgc		
841	caacgtcagt	gaggcagatg	acagatatat	ctgtgaccgc
	ttctaccca	atgacttgtg		
901	ggtggttgtg	ttccagtttc	agcacatcat	ggttggcctt
	atcctgcctg	gtattgtcat		
961	cctgtcctgc	tattgcatta	tcattctcaa	gctgtcacac
	tccaagggcc	accagaagcg		
1021	caaggccctc	aagaccacag	tcattcctcat	cctggctttc
	ttcgctgtt	ggctgcctta		
1081	ctacattggg	atcagcatcg	actccttcat	cctcctggaa
	atcatcaagc	aagggtgtga		
1141	gtttgagaac	actgtgcaca	agtggatttc	catcaccgag
	gccctagctt	tcttccactg		
1201	ttgtctgaac	cccatcctct	atgctttcct	tggagccaaa
	tttaaaacct	ctgcccagca		
1261	cgcactcacc	tctgtgagca	gagggtccag	cctcaagatc
	ctctccaaag	gaaagcgagg		
1321	tggacattca	tctgtttcca	ctgagtctga	gtcttcaagt
	tttcactcca	gctaacacag		
1381	atgtaaaaga	ctttttttta	tacgataaat	aacttttttt
	taagttacac	atttttcaga		
1441	tataaaagac	tgaccaatat	tgtacagttt	ttattgcttg
	ttggattttt	gtcttgtgtt		
1501	tcttttagtt	ttgtgaagtt	taattgactt	atttatataa
	attttttttg	tttcatattg		
1561	atgtgtgtct	aggcaggacc	tgtggccaag	ttcttagttg
	ctgtatgtct	cgtggtagga		
1621	ctgtagaaaa	gggaactgaa	cattccagag	cgtgtagtga
	atcacgtaaa	gctagaaatg		
1681	atccccagct	gtttatgcat	agataatctc	tccattcccg
	tggaaacgtt	ttcctgttct		
1741	taagacgtga	ttttgctgta	gaagatggca	cttataacca
	aagcccaaag	tggatatagaa		
1801	atgctgggtt	ttcagttttc	aggagtgggt	tgatttcagc

		acctacagtg tacagtcttg 1861 tattaagttg ttaataaaaag tacatgttaa acttaaaaaa aaaaaaaaaa aa
2	NM_003467. 2 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая изоформу b человеческ ого CXCR4	1 aacttcagtt tgttggtgc ggcagcaggt agcaaagtga cgccgagggc ctgagtgtc 61 cagtagccac cgcctctgga gaaccagcgg ttaccatgga ggggatcagt atatacaactt 121 cagataacta caccgaggaa atgggctcag gggactatga ctccatgaag gaacctgtt 181 tccgtgaaga aaatgctaatt ttcaataaaa tcttctgtcc caccatctac tccatcatct 241 tcttaactgg cattgtgggc aatggattgg tcatcctggt catgggttac cagaagaaac 301 tgagaagcat gacggacaag tacaggtcgc acctgtcagt ggccgacctc ctctttgtca 361 tcacgcttcc cttctgggca gttgatgccg tggcaaaactg gtactttggg aacttcctat 421 gcaaggcagt ccatgtcatc tacacagtca acctctacag cagtgtctc atcctggcct 481 tcatcagttc ggaccgctac ctggccatcg tccacgccac caacagtcag aggccaagga 541 agctgttggc tgaaaagggtg gtctatgttg gcgtctggat ccctgccctc ctgctgacta 601 ttcccgactt catctttgcc aacgtcagtg aggcagatga cagatatatc tgtgaccgct 661 tctaccccaa tgacttgtgg gtgggttgtgt tccagtttca gcacatcatg gttggcctta 721 tcctgcctgg tattgtcatc ctgtcctgct attgcattat catctccaag ctgtcacact 781 ccaagggcca ccagaagcgc aaggccctca agaccacagt catcctcatc ctggctttct 841 tcgcctgttg gctgccttac tacattggga tcagcatcga ctccttcac ctctggaaa 901 tcatcaagca aggggtgtgag tttgagaaca ctgtgcacaa gtggatttcc atcaccgagg 961 ccctagcttt cttccactgt tgtctgaacc ccatcctcta

		tgctttcctt ggagccaaat 1021 ttaaaacctc tgcccagcac gcactcacct ctgtgagcag aggggtccagc ctcaagatcc 1081 tctccaaagg aaagcgaggt ggacattcat ctgtttccac tgagtctgag tcttcaagtt 1141 ttcactccag ctaacacaga tgtaaaagac ttttttttat acgataaata actttttttt 1201 aagttacaca tttttcagat ataaaagact gaccaatatt gtacagtttt tattgcttgt 1261 tggatttttg tcttgtgttt ctttagtttt tgtgaagttt aattgactta tttatataaa 1321 ttttttttgt ttcattattga tgtgtgtcta ggcaggacct gtggccaagt tcttagttgc 1381 tgtatgtctc gtggtaggac tgtagaaaag ggaactgaac attccagagc gtgtagtga 1441 tcacgtaaag ctagaaatga tccccagctg tttatgcata gataatctct ccattcccgt 1501 ggaacgtttt tcctgttctt aagacgtgat tttgctgtag aagatggcac ttataaccaa 1561 agcccaaagt ggtatagaaa tgctggtttt tcagttttca ggagtgggtt gatttcagca 1621 cctacagtgt acagtcttgt attaagttgt taataaaagt acatgttaaa cttaaaaaaa 1681 aaaaaaaaaa a
3	NP_0010085 40.1 Типовая последоват ельность аминокисло т для изоформы а человеческ ого CXCR4	1 msiplppllqi ytsdnyteem gsgdydsmke pcfreenanf nkiflptiys iifltgivgn 61 glvilvmgyq kklrsmtdky rhlsvadll fvitlpfwav davanwyfgn flckavhviy 121 tvnlyssvli lafisl dryl aivhatnsqr prkllaekvv yvgvwipall ltipdfifan 181 vseaddryic drfypndl wv vvfqfqhimv glilpgivil scyciiiskl shskghqkrk 241 alkttvilil affacwlp yy igisidsfil leiikgqcef entvhkwisi tealaffhcc 301 lnpilyaflg akfktsaqha ltsvsrgssl kilskgkr gg hssvsteses ssfhss

4	NP_003458.1 Типовая последовательность аминокислот для изоформы b человеческого CXCR4	1 megisiytsd nyteemsgsd ydsmkepcfr eenanfknif lptiysiifl tgivnglvi 61 lvmgyqkklr smtdkyrlhl svadllfvit lpfwavdava nwyfgnflck avhvityvnl 121 yssvlilafi sldrylaivh atnsqrprkl laekvvvygv wipallltip dfifanvsea 181 ddryicdrfy pndlwwvfvq fqhimvglil pgivilscyc iiisklshsk ghqkrkalkt 241 tvililaffa cwlpyyigis idsfilleii kqgcefentv hkwisiteal affhcclnpi 301 lyafllgakfk tsaqhaltsv srgsslkils kgkrghhssv stesesssfh ss
5	NM_0013017.14.1 Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая изоформу b человеческого CCR7 b	1 cacttcctcc ccagacaggg gtagtgcgag gccgggcaca gccttcctgt gtggttttac 61 cgcccagaga gcgtcatgga cctgggtatg cctgtgtcaa gatgaggatca cggacgatta 121 catcggagac aacaccacag tggactacac tttgttcgag tctttgtgct ccaagaagga 181 cgtgcggaac tttaaagcct ggttcctccc tatcatgtac tccatcattt gtttcgtggg 241 cctactgggc aatgggctgg tcgtgttgac ctatatctat ttcaagagge tcaagaccat 301 gaccgatacc tacctgctca acctggcggt ggcagacatc ctcttcctcc tgacccttcc 361 cttctgggcc tacagcgagg ccaagtcctg ggtcttcggt gtccactttt gcaagctcat 421 ctttgccatc tacaagatga gcttcttcag tggcatgctc ctacttcttt gcatcagcat 481 tgaccgctac gtggccatcg tccaggctgt ctcagctcac cgccaccgtg ccgcgctcct 541 tctcatcagc aagctgtcct gtgtgggcat ctggatacta gccacagtgc tctccatccc 601 agagctcctg tacagtgacc tccagaggag cagcagtgag caagcgatgc gatgctctct 661 catcacagag catgtggagg cctttatcac catccagggtg gcccgatgg tgatcggtt

721	tctgggtccc	ctgctggcca	tgagcttctg	ttaccttgtc
	atcatccgca	cctgctcca		
781	ggcacgcaac	tttgagcgca	acaaggccat	caaggtgatc
	atcgctgtgg	tcgtggtctt		
841	catagtcttc	cagctgccct	acaatggggt	ggtcctggcc
	cagacggtgg	ccaacttcaa		
901	catcaccagt	agcacctgtg	agctcagtaa	gcaactcaac
	atcgccctacg	acgtcaccta		
961	cagcctggcc	tgcgtccgct	gctgcgtaa	ccctttcttg
	tacgccttca	tcggcgtaa		
1021	gttcgcaac	gatctcttca	agctcttcaa	ggacctgggc
	tgccctcagcc	aggagcagct		
1081	ccggcagtgg	tcttcctgtc	ggcacatccg	gcgctcctcc
	atgagtgtgg	aggccgagac		
1141	caccaccacc	ttctcccat	aggcgactct	tctgcctgga
	ctagagggac	ctctccagc		
1201	gtccctgggg	tggggatagg	gagcagatgc	aatgactcag
	gacatcccc	cgccaaaagc		
1261	tgctcagga	aaagcagctc	tcccctcaga	gtgcaagccc
	ctgctccaga	agatagcttc		
1321	accccaatcc	cagctacctc	aaccaatgcc	aaaaaaagac
	agggtgata	agctaacacc		
1381	agacagacaa	cactgggaaa	cagaggctat	tgtcccctaa
	acaaaaaact	gaaagtgaaa		
1441	gtccagaaac	tgttcccacc	tgctggagtg	aaggggccaa
	ggaggggtgag	tgcaaggggc		
1501	gtgggagtgg	cctgaagagt	cctctgaatg	aaccttctgg
	cctccacag	actcaaatgc		
1561	tcagaccagc	tcttcgaaa	accaggcctt	atctccaaga
	ccagagatag	tggggagact		
1621	tcttggttg	gtgaggaaaa	gcggacatca	gctggtcaaa
	caaactctct	gaaccctcc		
1681	ctccatcggt	ttcttcaactg	tcctccaagc	cagcgggaat
	ggcagctgcc	acgccgccct		
1741	aaaagcacac	tcacccctc	acttgccg	tcgccctccc
	aggctctcaa	caggggagag		
1801	tgtggtgttt	cctgcaggcc	aggccagctg	cctccgcgtg

		atcaaagcca cactctgggc 1861 tccagagtgg ggatgacatg cactcagctc ttggctccac tgggatggga ggagaggaca 1921 agggaaatgt caggggcggg gagggtgaca gtggccgccc aaggcccacg agcttggtct 1981 ttgttctttg tcacagggac tgaaaacctc tcctcatgtt ctgctttcga ttcgttaaga 2041 gagcaacatt ttaccacac acagataaag ttttcccttg aggaacaac agctttaaaa 2101 gaaaaagaaa aaaaaagtct ttggtaaag gcaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa
6	NM_0013017 16.1 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая изоформу с предшестве нника человеческ ого CCR7	1 ctctagatga gtcagtggag ggcgggtgga gcgttgaacc gtgaagagtg tggttgggcg 61 taaacgtgga cttaaaactca ggagctaagg ggtaattcag tgaaaaaggg gaatgagcgg 121 tggggagctc tgttgcaaca gggccaatc gcagcaggac tacaatgcc cgagcgagg 181 ctgggaacga ggggacagcg gctgcctgtc cccagaatag aaaatgcagc taggaagccc 241 tctttgagtg gacagcggag gactggactg ccaggccaag catcaggggc ttcacacctca 301 gggccggtta gagcccctga ggatttagga ggaaggga ccaatgaaaa gcgtgctggt 361 ggtggctctc cttgtcattt tccaggtatg cctgtgtcaa gatgaggtca cggacgatta 421 catcggagac aacaccacag tggactacac tttgttcgag tctttgtgct ccaagaagga 481 cgtgcggaac tttaaagcct ggttcctccc tatcatgtac tccatcattt gtttcgtggg 541 cctactgggc aatgggctgg tcgtgttgac ctatatctat ttcaagaggc tcaagaccat 601 gaccgatacc tacctgetca acctggcggg gcagacatc ctcttctcc tgacccttcc 661 cttctgggac tacagcggg ccaagtcctg ggtcttcggt gtccactttt gcaagctcat 721 ctttgccatc tacaagatga gcttcttcag tggcatgctc

		ctacttcttt gcatcagcat		
781	tgaccgctac	gtggccatcg	tccaggtgt	ctcagctcac
	cgccaccgtg	ccgcgtcct		
841	tctcatcagc	aagctgtcct	gtgtgggcat	ctggatacta
	gccacagtgc	tctccatccc		
901	agagctcctg	tacagtgacc	tccagaggag	cagcagttag
	caagcgatgc	gatgctctct		
961	catcacagag	catgtggagg	cctttatcac	catccaggtg
	gcccagatgg	tgatcggttt		
1021	tctggtcccc	ctgctggcca	tgagcttctg	ttaccttgtc
	atcatccgca	cctgctcca		
1081	ggcacgcaac	tttgagcgca	acaaggccat	caaggtgatc
	atcgctgtgg	tcgtggtctt		
1141	catagtcttc	cagctgccct	acaatggggt	ggtcctggcc
	cagacggtgg	ccaacttcaa		
1201	catcaccagt	agcacctgtg	agctcagtaa	gcaactcaac
	atgcctacg	acgtcaccta		
1261	cagcctggcc	tgcgtccgct	gctgcgtcaa	ccctttcttg
	tacgccttca	tcggcgtcaa		
1321	gttccgcaac	gatctcttca	agctcttcaa	ggacctgggc
	tgctcagcc	aggagcagct		
1381	ccggcagtgg	tcttcctgtc	ggcacatccg	gcgtccctcc
	atgagtgtgg	aggccgagac		
1441	caccaccacc	ttctcccat	aggcgactct	tctgcctgga
	ctagagggac	ctctcccagg		
1501	gtccctgggg	tggggatagg	gagcagatgc	aatgactcag
	gacatcccc	cgccaaaagc		
1561	tgctcaggga	aaagcagctc	tcccctcaga	gtgcaagccc
	ctgctccaga	agatagcttc		
1621	accccaatcc	cagctacctc	aaccaatgcc	aaaaaaagac
	agggtgata	agctaacacc		
1681	agacagacaa	cactgggaaa	cagaggctat	tgtcccctaa
	acaaaaaact	gaaagtgaaa		
1741	gtccagaaac	tgttcccacc	tgctggagtg	aaggggccaa
	ggagggtag	tgcaaggggc		
1801	gtgggagtgg	cctgaagagt	cctctgaatg	aaccttctgg
	cctcccacag	actcaaatgc		

		1861 tcagaccagc tcttcgaaa accaggcctt atctccaaga ccagagatag tggggagact 1921 tcttggttg gtgaggaaaa gcggacatca gctggtcaaa caaaactctct gaaccctcc 1981 ctccatcgtt ttcttactg tcctccaagc cagcggaat ggcagctgcc acgcccct 2041 aaaagcacac tcatcccctc acttgccgг tcgcccctcc aggctctcaa caggggagag 2101 tgtggtgtt cctgcaggcc aggcagctg cctccggtg atcaaagcca cactctggc 2161 tccagagtgg ggatgacatg cactcagctc ttgggtccac tgggatggga ggagaggaca 2221 agggaaatgt caggggcggg gaggtgaca gtggccgccc aaggcccacg agcttgttct 2281 ttgttcttg tcacaggac tgaaaacctc tcctcatgtt ctgctttcga ttogttaaga 2341 gagcaacatt ttaccacac acagataaag tttcccttg aggaaacaac agctttaaaa 2401 gaaaaagaaa aaaaaagtct ttggtaaatg gcaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa
7	NM_0013017 17.1 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая изоформу с предшестве нника человеческ ого CCR7	1 ctctagatga gtcagtggag ggcgggtgga gcgttgaacc gtgaagagtг tggttgggcg 61 taaacgtgga cttaaaactca ggagctaagg gggaaaccaa tgaaaagcgt gctggtggtg 121 gctctccttg tcattttcca ggtatgcctg tgtcaagatg aggtcacgga cgattacatc 181 ggagacaaca ccacagtgga ctacactttg ttcgagtctt tgtgctcaa gaaggacgtg 241 cggaacttta aagcctgggt cctccctatc atgtactcca tcatttggtt cgtggccta 301 ctgggcaatg ggctggtcgt gttgacctat atctatttca agaggctcaa gaccatgacc 361 gatacctacc tgctcaacct ggcgggtgca gacatcctct tcctcctgac ccttcccttc 421 tgggcctaca gcgcggccaa gtcctgggtc ttcggtgtcc acttttgcaa gctcatcttt

481	gccatctaca agatgagctt	cttcagtggc	atgctcctac
	ttctttgcat cagcattgac		
541	cgctacgtgg ccatcgcca	ggctgtctca	gctcaccgcc
	accgtgcccc cgctcttctc		
601	atcagcaagc tgtcctgtgt	gggcatctgg	atactagcca
	cagtgtcttc catcccagag		
661	ctcctgtaca gtgacctcca	gaggagcagc	agtgagcaag
	cgatgcgatg ctctctcatc		
721	acagagcatg tggaggcctt	tatcaccatc	cagggtggccc
	agatgggtgat cggctttctg		
781	gtccccctgc tggccatgag	cttctgttac	cttgtcatca
	tccgcaccct gctccaggca		
841	cgcaactttg agcgcaacaa	ggccatcaag	gtgatcatcg
	ctgtggtcgt ggtcttcata		
901	gtcttccagc tgccctacaa	tgggggtgtc	ctggcccaga
	cgggtggcaa cttcaacatc		
961	accagtagca cctgtgagct	cagtaagcaa	ctcaacatcg
	cctacgacgt cacctacagc		
1021	ctggcctgcg tccgctgctg	cgtcaaccct	ttcttctaag
	ccttcacatcg cgtcaagtcc		
1081	cgcaacgacg tcttcaagct	cttcaaggac	ctgggctgcc
	tcagccagga gcagctccgg		
1141	cagtggctct cctgtggcca	catcgggcgc	tcctccatga
	gtgtggaggc cgagaccacc		
1201	accaccttct ccccataggc	gactcttctg	cctggactag
	agggacctct ccaggggtcc		
1261	ctgggggtgg gatagggagc	agatgcaatg	actcaggaca
	tccccccgcc aaaagctgct		
1321	cagggaaaag cagctctccc	ctcagagtgc	aagcccctgc
	tccagaagat agcttcaccc		
1381	caatcccagc tacctcaacc	aatgccaaaa	aaagacaggg
	ctgataagct aacaccagac		
1441	agacaacact gggaaacaga	ggctattgtc	ccctaaacca
	aaaactgaaa gtgaaagtcc		
1501	agaaactggt cccacctgct	ggagtgaagg	ggccaaggag
	ggtgagtgc aggggcgtgg		
1561	gagtggcctg aagagtcctc	tgaatgaacc	ttctggcctc

		ccacagactc aaatgctcag 1621 accagctctt ccgaaaacca ggccttatct ccaagaccag agatagtggg gagacttctt 1681 ggcttgggga ggaaaagcgg acatcagctg gtcaaacaaa ctctctgaac ccctccctcc 1741 atcgttttct tcaactgtcct ccaagccagc gggaatggca gctgccacgc cgccctaaaa 1801 gcacactcat cccctcactt gccgcgtcgc cctcccaggc tctcaacagg ggagagtgtg 1861 gtgtttcctg caggccaggc cagctgcctc cgcgatgatca aagccacact ctgggctcca 1921 gagtggggat gacatgcact cagctcttgg ctccactggg atgggaggag aggacaaggg 1981 aaatgtcagg gccggggagg gtgacagtgg ccgccaagg cccacgagct tgttctttgt 2041 tctttgtcac agggactgaa aacctctcct catgttctgc tttcgattcg ttaagagagc 2101 aacattttac ccacacacag ataaagtttt cccttgagga aacaacagct ttaaaagaaa 2161 aagaaaaaaa aagtctttgg taaatggcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
8	NM_0013017 18.1 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, изоформу с предшестве нника человеческ ого CCR7	1 aggagaaggt gccttaaaca ggttcccacg catttcctgg cgctattgag ctggagctg 61 ccaagggcct gccttcactt gtggcatcgc agttactgac tctccagtgg gccaggccct 121 acctagctgg gacctgaggg tcaggatacg ggaagagggc tactgccgcc ctgacttgta 181 gggaaaccaa tgaaaagcgt gctgggtggg gctctccttg tcattttcca ggtatgcctg 241 tgtcaagatg aggtcacgga cgattacatc ggagacaaca ccacagtgga ctacactttg 301 ttcgagtctt tgtgtccaa gaaggacgtg cggaacttta aagcctggtt cctccctatc 361 atgtactcca tcatttggtt cgtgggccta ctgggcaatg ggctggtcgt gttgacctat 421 atctatttca agaggctcaa gaccatgacc gatacctacc

		tgctcaacct ggcggtggca		
481	gacatcctct	tcctcctgac	ccttcccttc	tgggcctaca
	gcgcggccaa	gtcctgggtc		
541	ttcgggtgtcc	acttttgcaa	gctcatcttt	gccatctaca
	agatgagctt	cttcagtggc		
601	atgctcctac	ttctttgcat	cagcattgac	cgctacgtgg
	ccatcgtcca	ggctgtctca		
661	gctcaccgcc	accgtgcccg	cgctcctctc	atcagcaagc
	tgtcctgtgt	gggcatctgg		
721	atactagcca	cagtgtctct	catcccagag	ctcctgtaca
	gtgacctcca	gaggagcagc		
781	agtgagcaag	cgatgcgatg	ctctctcatc	acagagcatg
	tggaggcctt	tatcaccatc		
841	cagggtggccc	agatggtgat	cggtcttctg	gtccccctgc
	tggccatgag	cttctgttac		
901	cttgtcatca	tccgcaccct	gctccaggca	cgcaactttg
	agcgaacaa	ggccatcaag		
961	gtgatcatcg	ctgtggtcgt	ggtcttcata	gtcttcagc
	tgcctacaa	tggggtggtc		
1021	ctggcccaga	cggtggccaa	cttcaacatc	accagtagca
	cctgtgagct	cagtaagcaa		
1081	ctcaacatcg	cctacgacgt	cacctacagc	ctggcctgcg
	tccgctgctg	cgtaaccct		
1141	ttcttgtagc	ccttcacg	cgtaagtcc	cgcaacgatc
	tcttcaagct	cttcaaggac		
1201	ctgggctgcc	tcagccagga	gcagctccgg	cagtggctct
	cctgtcggca	catccggcgc		
1261	tcctccatga	gtgtggaggc	cgagaccacc	accaccttct
	ccccataggc	gactcttctg		
1321	cctggactag	agggacctct	cccagggtcc	ctgggggtggg
	gatagggagc	agatgcaatg		
1381	actcaggaca	tccccccgcc	aaaagctgct	cagggaaaag
	cagctctccc	ctcagagtgc		
1441	aagcccctgc	tccagaagat	agcttcaccc	caatcccagc
	tacctcaacc	aatgccaaaa		
1501	aaagacaggg	ctgataagct	aacaccagac	agacaacact
	gggaaacaga	ggctattgtc		

		1561 ccctaaacca aaaactgaaa gtgaaagtcc agaaactgtt cccacctgct ggagtgaagg 1621 ggccaaggag ggtgagtgca aggggctgg gagtggcctg aagagtcctc tgaatgaacc 1681 ttctggcctc ccacagactc aaatgctcag accagctctt ccgaaaacca ggcttatct 1741 ccaagaccag agatagtggg gagacttctt ggcttggga ggaaaagcgg acatcagctg 1801 gtcaaacaaa ctctctgaac ccctccctcc atcgttttct tactgtcct ccaagccagc 1861 gggaatggca gctgccacgc cgcctaaaa gcacactcat cccctcactt gcgcgtcgc 1921 cctccaggc tctcaacagg ggagagtgtg gtgtttcctg caggccaggc cagctgctc 1981 cgcgtgatca aagccacact ctgggctcca gagggggat gacatgact cagctcttgg 2041 ctccactggg atgggaggag aggacaaggg aaatgtcagg ggcggggagg gtgacagtgg 2101 ccgccaagg cccacgagct tgttctttgt tctttgtcac agggactgaa aacctctcct 2161 catgttctgc tttcgattcg ttaagagagc aacattttac ccacacacag ataaagtttt 2221 cccttgagga aacaacagct ttaaagaaa aagaaaaaaa aagtctttgg taaatggcaa 2281 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa
9	NM_001838. 3 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая изоформу а предшестве нника	1 cacttcctcc ccagacaggg gtagtgcgag gccgggcaca gccttcctgt gtggttttac 61 cgcccagaga gcgtcatgga cctggggaaa ccaatgaaaa gcgtgctggt ggtggctctc 121 cttgtcattt tccaggtagt cctgtgtcaa gatgaggta cggacgatta catcgagac 181 aacaccacag tggactacac tttgttcgag tctttgtgct ссаагаагга сgtgcggaac 241 tttaaagcct ggttcctccc tatcatgtac tccatcattt gtttcgtggg cctactgggc 301 aatgggctgg tcgtgttgac ctatatctat ttcaagaggc

человеческ ого CCR7	tcaagacat gaccgatacc			
	361	tacctgetca acctggcggg	ggcagacatc	ctcttcctcc
		tgacccttcc cttctgggcc		
	421	tacagcgcg ccaagtcctg	ggtcttcggg	gtccactttt
		gcaagctcat ctttgccatc		
	481	tacaagatga gcttcttcag	tggcatgctc	ctacttcttt
		gcatcagcat tgaccgctac		
	541	gtggccatcg tccaggctgt	ctcagctcac	cgccaccgtg
		cccgcgtcct tctcatcagc		
	601	aagctgtcct gtgtgggcat	ctggatacta	gccacagtgc
		tctccatccc agagctcctg		
	661	tacagtgacc tccagaggag	cagcagttag	caagcgatgc
		gatgctctct catcacagag		
	721	catgtggagg cctttatcac	catccagggt	gcccagatgg
		tgatcggtt tctgtcccc		
	781	ctgctggcca tgagcttctg	ttaccttgtc	atcatccgca
		cctgtctcca ggcacgcaac		
	841	tttgagcgca acaaggccat	caaggatgatc	atcgctgtgg
		tcgtggtctt catagtcttc		
	901	cagctgcct acaatgggg	ggtcctggcc	cagacggtgg
		ccaacttcaa catcaccagt		
	961	agcacctgtg agctcagtaa	gcaactcaac	atcgctctacg
		acgtcaccta cagcctggcc		
	1021	tgcgccgct gctgcgtcaa	ccctttcttg	tacgccttca
		tcggcgtaa gttccgcaac		
	1081	gatctcttca agctcttcaa	ggacctgggc	tgctctagcc
		aggagcagct ccggcagtgg		
	1141	tcttctgtc ggcacatccg	gcgctcctcc	atgagtgtgg
		aggccgagac caccaccacc		
	1201	ttctcccat aggcgactct	tctgcctgga	ctagagggac
		ctctcccagg gtccctgggg		
	1261	tggggatagg gagcagatgc	aatgactcag	gacatcccc
		cgccaaaagc tgctcaggga		
	1321	aaagcagctc tcccctcaga	gtgcaagccc	ctgctccaga
		agatagcttc accccaatcc		
	1381	cagctacctc aaccaatgcc	aaaaaaagac	agggctgata
		agctaaccac agacagacaa		

		1441 cactgggaaa cagaggctat tgtcccctaa accaaaaact gaaagtgaaa gtccagaaac 1501 tgttcccacc tgctggagtg aaggggcaa ggagggtag tgcaaggggc gtgggagtgg 1561 cctgaagagt cctctgaatg aaccttctgg cctcccacag actcaaatgc tcagaccagc 1621 tcttccgaaa accaggcctt atctccaaga ccagagatag tggggagact tcttggttg 1681 gtgaggaaaa gcgacatca gctggtcaaa caaactctct gaaccctcc ctccatcgtt 1741 ttcttcactg tcctccaagc cagcggaat ggagctgcc acgccgcct aaaagcacac 1801 tcatccctc acttgccgcg tcgccctccc aggtctcaa caggggagag tgtgtgttt 1861 cctgcaggcc aggccagctg cctccgctg atcaaagcca cactctgggc tccagagtgg 1921 ggatgacatg cactcagctc ttggctccac tgggatggga ggagaggaca agggaaatgt 1981 cagggcggg gaggtgaca gtggccgcc aagggcacg agcttgttct ttgttctttg 2041 tcacaggac tgaaaacctc tcctcatgtt ctgctttcga ttcgtaaga gagcaacatt 2101 ttaccacac acagataaag tttcccttg aggaacaac agctttaaaa gaaaaagaaa 2161 aaaaaagtct ttgtaaatg gcaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaa
10	NP_0012886 43.1 Типовая последоват ельность аминокисло т для изоформы в человеческ ого CCR7	1 mysiiicfvgl lgnglvvlt yfykrlktmt dtyllnlava dilfltltpf waysaakswv 61 fgvhfcklif aiykmsffsg mllllcisiid ryvaiqvavs ahrhrarvll isklscvgiw 121 ilatvlsipe llysdqrss seqamrcsli tehveafiti qvaqmvgfl vpllamsfcy 181 lviirtllqa rnfernkaik viiavvvfi vfqlpyngvv laqtvanfni tsstcelskq 241 lniaydvty lacvrccvnp flyafigvkf rndlflklkd lgclsqeqlr qwsschirr 301 ssmsveaett ttfsp

11	NP_0012886 45.1 Типовая последоват ельность аминокисло т для изоформы с предшестве ника человеческ ого CCR7	1 mksvlvval vifqvcclcq d evtdyigdn ttvdytlfes lcskkdv rnf kawflpimys 61 iicfvglgn glvvltiyif krlktmtdty llnlavadil fltlp fway saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisidryv aivqavsahr hrarvllisk lscvgiwila 181 tvlsipelly sdlqrsseq amrcsliteh veafitiqua qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni 301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lfkfkdlgc lsqeqlrqws scrhrrssm 361 sveaettttf sp
12	NP_0012886 46.1 Типовая последоват ельность аминокисло т для для изоформы с предшестве ника человеческ ого CCR7	1 mksvlvval vifqvcclcq d evtdyigdn ttvdytlfes lcskkdv rnf kawflpimys 61 iicfvglgn glvvltiyif krlktmtdty llnlavadil fltlp fway saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisidryv aivqavsahr hrarvllisk lscvgiwila 181 tvlsipelly sdlqrsseq amrcsliteh veafitiqua qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni 301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lfkfkdlgc lsqeqlrqws scrhrrssm 361 sveaettttf sp
13	NP_0012886 47.1 Типовая последоват ельность аминокисло т для изоформы с предшестве ника	1 mksvlvval vifqvcclcq d evtdyigdn ttvdytlfes lcskkdv rnf kawflpimys 61 iicfvglgn glvvltiyif krlktmtdty llnlavadil fltlp fway saakswvfgv 121 hfcklifaiy kmsffsgmll llcisidryv aivqavsahr hrarvllisk lscvgiwila 181 tvlsipelly sdlqrsseq amrcsliteh veafitiqua qmvigflvpl lamsfcylvi 241 irtllqarnf ernkaikvii avvvvfivfq lpyngvvlaq tvanfnitss tcelskqlni

	человеческ ого CCR7	301 aydvtyslac vrccvnpfly afigvkfrnd lflklfdlgc lsqeqlrqws scrhrrssm 361 sveaettttf sp
14	NP_001829. 1 Типовая последоват ельность аминокисло т для изоформы а предшестве ника человеческ ого CCR7	1 mdlgkpmksv lvvallvifq vlcqdevtd dyigdnttvd ytlfeslcsk kdvrnfkawf 61 lpimysiicf vgllgnglvv ltyiyfkrklk tmtdtyllnl avadilfltl lpfwaysaak 121 swvfgvhfck lifaiykmsf fsgmllllci sidryvaivq avsahrhrar vllisklscv 181 giwilatvls ipellysdlq rrsseqamrc slitehveaf itiquaqmvi gflvpillams 241 fcylviirtl lqarnfernk aikviiavvv vfivfqlpyn gvvlaqtvan fnitsstcel 301 skqlniaydv tyslacvrcc vnpflyafig vkfrndlflk fkdlgclsqe qlrqwsscrh 361 irrssmsvea ettttfsp
15	NM_002253. 2 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая предшестве ник человеческ ого VEGFR2	1 actgagtcctc gggaccccg gagagcggtc aatgtgtggt cgctgcgttt cctctgcctg 61 cgccgggcat cacttgcgcg ccgcagaaag tccgtctggc agcctggata tcctctccta 121 ccggcacccg cagacgcccc tgcagccgcg gtcggcgccc gggctcccta gccctgtgcg 181 ctcaactgtc ctgcgctgcg gggtgccgcg agttccacct ccgcgcctcc ttctctagac 241 aggcgctggg agaaagaacc ggctcccag ttctgggcat ttcgcccggc tcgaggtgca 301 ggatgcagag caaggtgctg ctggccgctg ccctgtggct ctgcgtggag acccgggccg 361 cctctgtggg tttgcctagt gtttctcttg atctgccag gctcagcata caaaaagaca 421 tacttacaat taaggctaata acaactcttc aaattacttg caggggacag agggacttgg 481 actggctttg gcccaataat cagagtggca gtgagcaaag gggtggaggtg actgagtgca 541 gcgatggcct cttctgtaag aactcaca ttccaaaagt gatcggaat gacactggag

601	cctacaagtg	cttctaccgg	gaaactgact	tggcctcggg
	catttatgtc	tatgttcaag		
661	attacagatc	tccatttatt	gcttctgtta	gtgaccaaca
	tggagtcgtg	tacattactg		
721	agaacaaaaa	caaaactgtg	gtgattccat	gtctcgggtc
	catttcaaat	ctcaacgtgt		
781	cactttgtgc	aagataccca	gaaaagagat	ttgttcctga
	tggtaacaga	atttcctggg		
841	acagcaagaa	gggctttact	attcccagct	acatgatcag
	ctatgctggc	atggctcttct		
901	gtgaagcaaa	aattaatgat	gaaagttacc	agtctattat
	gtacatagtt	gtcgtttag		
961	ggtataggat	ttatgatgtg	gttctgagtc	cgtctcatgg
	aattgaacta	tctgttggag		
1021	aaaagcttgt	cttaaattgt	acagcaagaa	ctgaactaaa
	tgtggggatt	gacttcaact		
1081	gggaataccc	ttcttcgaag	catcagcata	agaaacttgt
	aaaccgagac	ctaaaaaccc		
1141	agtctgggag	tgagatgaag	aaatttttga	gcaccttaac
	tatagatggg	gtaaccgga		
1201	gtgaccaagg	attgtacacc	tgtgcagcat	ccagtgggct
	gatgaccaag	aagaacagca		
1261	catttgtcag	ggtccatgaa	aaacottttg	ttgettttgg
	aagtggcatg	gaatctctgg		
1321	tggaagccac	ggtgggggag	cgtgtcagaa	tccttgcgaa
	gtaccttggg	taccacccc		
1381	cagaaataaa	atggtataaa	aatggaatac	cccttgagtc
	caatcacaca	attaaagcgg		
1441	ggcatgtact	gacgattatg	gaagtgagtg	aaagagacac
	aggaaattac	actgtcatcc		
1501	ttaccaatcc	catttcaaag	gagaagcaga	gccatgtggg
	ctctctgggt	gtgtatgtcc		
1561	caccccagat	tggtgagaaa	tctctaattct	ctcctgtgga
	ttcctaccag	tacggcacca		
1621	ctcaaacgct	gacatgtacg	gtctatgcca	ttcctcccc
	gcatcacatc	cactgggtatt		
1681	ggcagttgga	ggaagagtgc	gccaacgagc	ccagccaagc

	tgtctcagtg acaaaccat			
1741	acccttgtga agaattggaga	agtgtggagg	acttccagg	aggaaataaa attgaagtta
1801	ataaaaaatca atttgctcta	attgaaggaa	aaaacaaaac	tgtaagtacc cttgttatcc
1861	aagcggcaaa tgtgtcagct	ttgtacaaat	gtgaagcgg	caacaaagtc gggagaggag
1921	agagggtgat ctcttccac	gtgaccagg	gtcctgaaat	tactttgcaa cctgacatgc
1981	agccactga gcaggagagc	gtgtctttgt	ggtgcactgc	agacagatct acgtttgaga
2041	acctcacatg gtacaagctt	ggcccacagc	ctctgccaat	ccatgtggga gagttgccca
2101	cacctgtttg caagaacttg	gatactcttt	ggaaattgaa	tgccaccatg ttctctaata
2161	gcacaaatga cattttgatc	atggagctta	agaatgcac	cttgcaggac caaggagact
2221	atgtctgcct tgctcaagac	aggaagacca	agaaaagaca	ttgcgtggtc aggcagctca
2281	cagtcttaga gcgtgtggca	cccacgatca	caggaaacct	ggagaatcag acgacaagta
2341	ttggggaaaag catcgaagtc	tcatgcacgg	catctgggaa	tccccctcca cagatcatgt
2401	ggtttaaaga taatgagacc	cttgtagaag	actcaggcat	tgtattgaag gatgggaacc
2461	ggaacctcac tatccgcaga	gtgaggaagg	aggacgaagg	cctctacacc tgccaggcat
2521	gcagtgttct tggctgtgca	aaagtggagg	catttttcat	aatagaaggt gccaggaaa
2581	agacgaactt ggaaatcatt	attctagtag	gcacggcgg	gattgccatg ttcttctggc
2641	tacttcttgt catcatccta	cggaccgtta	agcggggcaa	tgaggggaa ctgaagacag
2701	gctacttgct catcgatcatg	gatccagatg	aactccatt	ggatgaacat tgtgaacgac
2761	tgcttatga tgccagcaaa	tggaattcc	ccagagaccg	gctgaagcta ggtaagcctc

2821	ttggccgtgg	tgcctttggc	caagtgattg	aagcagatgc
	ctttggaatt	gacaagacag		
2881	caacttgacg	gacagtagca	gtcaaaatgt	tgaagaagg
	agcaacacac	agtgagcatc		
2941	gagctctcat	gtctgaactc	aagatcctca	ttcatattgg
	tcaccatctc	aatgtggtca		
3001	accttctagg	tgcctgtacc	aagccaggag	ggccactcat
	ggtgattgtg	gaattctgca		
3061	aatttggaag	cctgtccact	tacctgagga	gcaagagaaa
	tgaatttgtc	ccctacaaga		
3121	ccaaaggggc	acgattccgt	caagggaaag	actacgttgg
	agcaatccct	gtggatctga		
3181	aacggcgctt	ggacagcatc	accagtagcc	agagctcagc
	cagctctgga	tttgtggagg		
3241	agaagtcctt	cagtgatgta	gaagaagagg	aagctcctga
	agatctgtat	aaggacttcc		
3301	tgaccttgga	gcattctcatc	tgttacagct	tccaagtggc
	taagggcatg	gagttcttgg		
3361	catcgcgaaa	gtgtatccac	agggacctgg	cggcacgaaa
	tatcctctta	tcggagaaga		
3421	acgtgggtta	aatctgtgac	tttggcttgg	cccgggatat
	ttataaagat	ccagattatg		
3481	tcagaaaagg	agatgctcgc	ctccctttga	aatggatggc
	cccagaaaca	atTTTTgaca		
3541	gagtgtacac	aatccagagt	gacgtctggt	cttttgggtgt
	tttgcgtggtg	gaaatatttt		
3601	ccttaggtgc	ttctccatat	cctggggtaa	agattgatga
	agaattttgt	aggcgattga		
3661	aagaaggaac	tagaatgagg	gcccctgatt	atactacacc
	agaaatgtac	cagaccatgc		
3721	tggactgctg	gcacggggag	cccagtcaga	gacccacgtt
	ttcagagttg	tggaacatt		
3781	tgggaaatct	cttgcaagct	aatgctcagc	aggatggcaa
	agactacatt	gttcttccga		
3841	tatcagagac	tttgagcatg	gaagaggatt	ctggactctc
	tctgcctacc	tcacctgttt		
3901	cctgtatgga	ggaggaggaa	gtatgtgacc	ccaaattcca

	ttatgacaac acagcaggaa		
3961	tcagtcagta tctgcagaac	agtaagcgaa	agagccggcc
	tgtgagtgtg aaaacatttg		
4021	aagatatccc gttagaagaa	ccagaagtaa	aagtaatccc
	agatgacaac cagacggaca		
4081	gtggtatggt tcttgcctca	gaagagctga	aaactttgga
	agacagaacc aaattatctc		
4141	catcttttgg tggaatggtg	cccagcaaaa	gcagggagtc
	tgtggcatct gaaggctcaa		
4201	accagacaag cggctaccag	tccggatata	actccgatga
	cacagacacc accgtgtact		
4261	ccagtgagga agcagaactt	ttaaagctga	tagagattgg
	agtgcaaacc ggtagcacag		
4321	cccagattct ccagcctgac	tcggggacca	cactgagctc
	tctctctgtt taaaaggaag		
4381	catccacacc cccaactcct	ggacatcaca	tgagaggtgc
	tgctcagatt ttcaagtgtt		
4441	gttctttcca ccagcaggaa	gtagccgcat	ttgattttca
	tttcgacaac agaaaaagga		
4501	cctcggactg cagggagcca	gtcttctagg	catatcctgg
	aagaggcttg tgaccaaga		
4561	atgtgtctgt gtcttctccc	agtgttgacc	tgatcctctt
	tttcattcat ttaaaaagca		
4621	tttatcatgc cccctgctgc	gggtctcacc	atgggtttag
	aacaaagacg ttcaagaaat		
4681	ggcccatcc tcaaagaagt	agcagtacct	ggggagctga
	cacttctgta aaactagaag		
4741	ataaaccagg caatgtaagt	gttcgaggtg	ttgaagatgg
	gaaggatttg cagggctgag		
4801	tctatccaag aggctttgtt	taggacgtgg	gtcccaagcc
	aagccttaag tgtggaattc		
4861	ggattgatag aaaggaagac	taacgttacc	ttgctttgga
	gagtactgga gcctgcaaata		
4921	gcatttgtgt tgctctggtg	gaggtgggca	tggggctctgt
	tctgaaatgt aaagggttca		
4981	gacggggttt ctggtttttag	aaggttgcgt	gttcttcgag
	ttgggctaaa gtagagtctg		

		5041 ttgtgctgtt tctgactcct aatgagagtt ccttccagac cgttacgtgt ctctggcca 5101 agccccagga aggaaatgat gcagctctgg ctcttgtct cccaggctga tcctttattc 5161 agaataccac aaagaaagga cattcagctc aaggctccct gccgtgttga agagttctga 5221 ctgcacaaac cagcttctgg tttcttctgg aatgaatacc ctcatatctg tctgatgtg 5281 atatgtctga gactgaatgc gggaggttca atgtgaagct gtgtgtggtg tcaaagtttc 5341 aggaaggatt ttaccctttt gttcttcccc ctgtcccca cccactctca ccccgcaacc 5401 catcagtatt ttagttatctt ggcctctact ccagtaaacc tgattgggtt tgttcaactct 5461 ctgaatgatt attagccaga cttcaaaatt attttatagc ccaaattata acatctattg 5521 tattatttag acttttaaca tatagagcta tttctactga tttttgccct tgttctgtcc 5581 tttttttcaa aaaagaaat gtgttttttg tttggtacca tagtgtgaaa tgctgggaac 5641 aatgactata agacatgcta tggcacatat atttatagtc tgtttatgta gaaacaaatg 5701 taatatatta aagccttata tataatgaac tttgtactat tcacattttg tatcagtatt 5761 atgtagcata acaaaggatca taatgctttc agcaattgat gtcattttat taaagaacat 5821 tgaaaaactt gaaggaatcc ctttgcaagg ttgcattact gtacccatca tttctaaaat 5881 ggaagagggg gtggctgggc acagtggccg acacctaaaa accagcact ttggggggcc 5941 aaggtagggag gatcgcttga gcccaggagt tcaagaccag tctggccaac atggtcagat 6001 tccatctcaa agaaaaaagg taaaaataaa ataaaatgga gaagaaggaa tcaga
16	NP_002244. 1	1 mqskvllava lwlcvetraa svglpsvsld lprlsiqkdi ltikanttlq itcrgqrdld

Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая предшественник человеческого VEGFR2	61	wlwpnnqsgs	eqrvevtecs	dglfckltlti	pkvigndtga
		ykcfyretdl	asviyvvyqd		
	121	yrspfiavsv	dqhgvyvite	nknktvvipc	lgsisnlrvs
		lcarypekrf	vpdgnriswd		
	181	skkgftipsy	misvagmvfc	eakindesyq	simyivvvvg
		yriydvvlsp	shgielsvge		
	241	klvlncart	elnvgidfnw	eypsskhqhk	klvnrdlktq
		sgsemkkfls	tltidgvtrs		
	301	dgglytcaas	sglmtkknst	fvrvehkpfv	afgsgmeslv
		eatvgervri	pakylgyppp		
	361	eikwykngip	lesnhtikag	hvltimevse	rdtgnytvil
		tnpiskekqs	hvvslvvyvp		
	421	pqigekslis	pvdscyqgtt	qtlctctvyai	ppphihwyw
		gleecanep	sqavsvtnpy		
	481	pceewrsved	fqggnkievn	knqfaliegk	nktvstlviq
		aanvsalykc	eavnkvggrg		
	541	rvisfhvtrg	peitlqpdmq	pteqesvslw	ctadrstfen
		ltwyklgpqp	lpihvgelpt		
	601	pvcknldtlw	klnatmfsns	tndilimelk	naslqdgqdy
		vclaqdrktk	krhcvvrqlt		
	661	vlervaptit	gnlenqtsi	gesievscta	sgnpppqimw
		fkdneltved	sgivlkdgnr		
	721	nltirrvrke	deglytcqac	svlgcakvea	ffiiegagek
		tnleiilvg	taviamffwl		
	781	llviilrtvk	rangelktg	ylsivmdpde	lpldehcerl
		pydaskwefp	rdrlklgkpl		
	841	grgafgqvie	adafgidkta	tcrtvavkml	kegathsehr
		almselkili	highhlnvvn		
	901	llgactkpgg	plmvivefck	fgnlstylrs	krnefvpykt
		kgarfrqgkd	yvgaipvdlk		
	961	rrlsitssq	ssassgfvee	kslsdveeee	apedlykdfl
		tlehlicysf	qvakgmefla		
	1021	srkcihrdla	arnillsekn	vvkicdfgla	rdiykdpdyv
		rkgdarlplk	wmapetifdr		
	1081	vytiqsdvws	fgvllweifs	lgaspypgvk	ideefcrrlk
		egtrmrady	ttpemyqtml		
	1141	dcwhgepsqr	ptfselvehl	gnllqanaqq	dgkdyivlpi

		setlsmeeds glslptspvs 1201 cmeeeevcdp kfhydnrtagi sqylqnskrk srpvsvktfe dipleepvk vipddnqtds 1261 gmvaseelk tledrtklsp sfggmvpssk resvasegsn qtsqyqsyh sddtdttvys 1321 seeaellkli eigvqtgsta qilqpdsgtt lssppv
17	NM_001716.4 Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий CXCR5	1 aaaaaaaaaa agtgatgagt tgtgaggcag gtcgcggccc tactgcctca ggagacgatg 61 cgcagctcat ttgcttaaat ttgcagctga cggtgccac ctctctagag gcacctggcg 121 gggagcctct caacataaga cagtgaccag tctggtgact cacagccggc acagccatga 181 actaccgct aacgctggaa atggacctcg agaacctgga ggacctgttc tgggaactgg 241 acagattgga caactataac gacacctccc tgggtgaaaa tcattctctgc cctgccacag 301 agggggccct catggcctcc ttcaaggccg tggtcgtgcc cgtggcctac agcctcatct 361 tcctcctggg cgtgatcggc aacgtcctgg tgctggtgat cctggagcgg caccggcaga 421 cacgcagttc caccgagacc ttctgttcc acctggccgt ggccgacctc ctgctggtct 481 tcattctgcc ctttgccgtg gccgagggtc ctgtgggctg ggtcctgggg accttcctct 541 gcaaaactgt gattgccctg cacaagtca acttctactg cagcagcctg ctctggcct 601 gcatgcctgt ggaccgctac ctggccattg tccacgccgt ccatgcctac cgccaccgcc 661 gcctcctctc catccacatc acctgtggga ccatctggct ggtgggcttc ctcttgcct 721 tgccagagat tctcttcgcc aaagtcagcc aaggccatca caacaactcc ctgccacgtt 781 gcaccttctc ccaagagaac caagcagaaa cgcatgcctg gttcacctcc cgattcctct 841 accatgtggc gggattcctg ctgcccatgc tgggtatggg ctggtgctac gtgggggtag

901	tgcacaggtt	gcgccaggcc	cagcggcgcc	ctcagcggca
	gaaggcagtc	agggtggcca		
961	tcctggtgac	aagcatcttc	ttcctctgct	ggtcacccta
	ccacatcgtc	atcttcctgg		
1021	acaccctggc	gaggctgaag	gccgtggaca	atacctgcaa
	gctgaatggc	tctctccccg		
1081	tggccatcac	catgtgtgag	ttcctggggc	tggcccactg
	ctgcctcaac	cccatgctct		
1141	acactttcgc	cggcgtgaag	ttccgcagtg	acctgtcgcg
	gctcctgacg	aagctgggct		
1201	gtaccggccc	tgcctccctg	tgccagctct	tccctagctg
	gcgcaggagc	agtctctctg		
1261	agtcagagaa	tgccacctct	ctcaccacgt	tctaggtccc
	agtgtcccct	tttattgctg		
1321	cttttccttg	gggcaggcag	tgatgctgga	tgctccttcc
	aacaggagct	gggatccctaa		
1381	gggctcaccg	tggtctagag	tgtcctagga	gtatcctcat
	ttggggtagc	tagaggaacc		
1441	aacccccatt	tctagaacat	ccctgccagc	tcttctgcgc
	gccctggggc	taggctggag		
1501	cccagggagc	ggaaagcagc	tcaaaggcac	agtgaaggct
	gtccttacct	atctgcaccc		
1561	ccctgggctg	agagaacctc	acgcacctcc	catcctaate
	atccaatgct	caagaaacaa		
1621	cttctacttc	tgcccttgcc	aacggagagc	gcctgccctc
	cccagaacac	actccatcag		
1681	cttaggggct	gctgacctcc	acagcttccc	ctctctcctc
	ctgcccacct	gtcaaacaaa		
1741	gccagaagct	gagcaccagg	ggatgagtgg	aggtaaggc
	tgaggaaagg	ccagctggca		
1801	gcagagtgtg	gccttcggac	aactcagtcc	ctaaaaacac
	agacattctg	ccaggcccc		
1861	aagcctgcag	tcattcttgac	caagcaggaa	gctcagactg
	gttagattca	ggtagctgcc		
1921	cctggctctg	accgaaacag	cgctgggtcc	accccatgtc
	accggatcct	gggtggtctg		
1981	caggcagggc	tgactctagg	tgcccttgga	ggccagccag

		tgacctgagg aagcgtgaag 2041 gccgagaagc aagaaagaaa cccgacagag ggaagaaaag agctttcttc cgaacccca 2101 aggaggaga tggatcaatc aaaccgcgcg gtcccctccg ccaggcgaga tgggtgggg 2161 tggagaactc ctagggtggc tgggtccagg ggatgggagg ttgtgggcat tgatgggaa 2221 ggaggctggc ttgtcccctc ctactccct tcccataagc tatagaccg aggaaactca 2281 gagtcggaac ggagaaagggt ggactggaag gggcccgagg gagtcatctc aaccatcccc 2341 tccgtggcat caccttaggc agggaagtgt aagaaacaca ctgaggcagg gaagtcccca 2401 ggcccagga agccgtgccc tgcccctg aggatgtcac tcagatggaa ccgagggaag 2461 ctgctccgtg cttgtttgct cacctgggt gtgggaggcc cgtccggcag ttctgggtgc 2521 tcctaccac ctcccagcc tttgatcagg tggggagtca gggaccctg ccctgtccc 2581 actcaagcca agcagccaag ctcttgga gggccactg gggaaataac agctgtggct 2641 cacgtgagag tgtcttcacg gcaggacaac gaggaagccc taagacgtcc cttttttctc 2701 tgagtatctc ctgcaagct gggtaatcga tgggggagtc tgaagcagat gcaaagaggc 2761 aagaggctgg attttgaatt ttcttttaa taaaaggca cctataaaac aggtcaatac 2821 agtacaggca gcacagagac ccccggaaca agcctaaaaa ttgtttcaaa ataaaaacca 2881 agaagatgtc ttcacatatt gtataaaaaa aaaaaaaa
18	NM_032966. 2 Типовая последоват ельность нуклеиновы	1 ccactctaag gaatgcggtc cctttgacag gcgaaaaact gaagttggaa aagacaaagt 61 gatttgttca aaattgaaat ttgaaacttg acatttggtc agtgggccct atgtaggaaa 121 aaacctcaa gagagctagg gtcctctca gagaggaaag acaggtcctt aggtcctcac

х кислот, кодирующая человеческ ий CXCR5	181	cctcccgtct	ccttgccctt	gcagttcttg	gaactggaca
		gattggaca	ctataacgac		
	241	acctccctgg	tggaatatca	tctctgccct	gccacagagg
		ggccctcat	ggcctccttc		
	301	aaggccgtgt	tcgtgcccg	ggcctacagc	ctcatcttcc
		tcctgggcgt	gatcggaac		
	361	gtcctggtgc	tggtgatcct	ggagcggcac	cggcagacac
		gcagttccac	ggagaccttc		
	421	ctgttccacc	tgccctgggc	cgacctcctg	ctgggtcttca
		tcttgccctt	tgccgtggcc		
	481	gagggctctg	tgggctgggt	cctggggacc	ttcctctgca
		aaactgtgat	tgccctgcac		
	541	aaagtcaact	tctactgcag	cagcctgctc	ctggcctgca
		tcgcccgtga	ccgctacctg		
	601	gccattgtcc	acgccgtcca	tgccctaccg	caccgcccgc
		tcctctccat	ccacatcacc		
	661	tgtgggacca	tctggctgg	gggcttcctc	cttgccctgc
		cagagattct	cttcgccaaa		
	721	gtcagccaag	gccatcaca	caactccctg	ccagcttgca
		ccttctccca	agagaaccaa		
	781	gcagaaacgc	atgcctgggt	cacctccga	ttcctctacc
		atgtggcggg	attcctgctg		
	841	cccatgctgg	tgatgggctg	gtgctacgtg	ggggtagtgc
		acaggttgcg	ccaggcccag		
	901	cggcgccctc	agcggcagaa	ggcagtcagg	gtggccatcc
		tggtgacaag	catcttcttc		
	961	ctctgctgg	cacctacca	catcgtcatc	ttcctggaca
		cctggcgag	gctgaaggcc		
	1021	gtggacaata	cctgcaagct	gaatggctct	ctccccgtgg
		ccatcaccat	gtgtgagttc		
	1081	ctgggcctgg	ccactgctg	cctcaacccc	atgctctaca
		ctttcgccgg	cgtgaagttc		
	1141	cgcagtgacc	tgctcgggct	cctgacgaag	ctgggctgta
		ccggccctgc	ctccctgtgc		
	1201	cagctcttcc	ctagctggcg	caggagcagt	ctctctgagt
		cagagaatgc	cacctctctc		
	1261	accacgttct	aggtcccagt	gtcccccttt	attgctgctt

		ttccttgggg caggcagtga		
1321	tgctggatgc	tccttccaac	aggagctggg	atcctaaggg
	ctcaccgtgg	ctaagagtgt		
1381	cctaggagta	tcctcatttg	gggtagctag	aggaaccaac
	ccccatttct	agaacatccc		
1441	tgccagctct	tctgccggcc	ctggggctag	gctggagccc
	agggagcggg	aagcagctca		
1501	aaggcacagt	gaaggtgtc	cttaccatc	tgcaccccc
	tgggctgaga	gaacctcacg		
1561	cacctcccat	cctaatactc	caatgctcaa	gaaacaactt
	ctacttctgc	ccttgccaac		
1621	ggagagcgcc	tgcccctccc	agaacacact	ccatcagctt
	aggggctgct	gacctccaca		
1681	gcttcccctc	tctcctcctg	cccacctgtc	aaacaaagcc
	agaagctgag	caccagggga		
1741	tgagtggagg	ttaaggctga	ggaaaggcca	gctggcagca
	gagtgtggcc	ttcggacaac		
1801	tcagtcccta	aaaacacaga	cattctgcca	ggcccccaag
	cctgcagtca	tcttgaccaa		
1861	gcaggaagct	cagactggtt	gagttcaggt	agctgcccct
	ggctctgacc	gaaacagcgc		
1921	tgggtccacc	ccatgtcacc	ggatcctggg	tggctctgag
	gcagggetga	ctctaggtgc		
1981	ccttgagggc	cagccagtga	cctgaggaag	cgtgaaggcc
	gagaagcaag	aaagaaaccc		
2041	gacagaggga	agaaaagagc	tttcttcccg	aacccaaggg
	agggagatgg	atcaatcaaa		
2101	cccggcgggc	ccctccgcca	ggcgagatgg	ggtggggtgg
	agaactccta	gggtggctgg		
2161	gtccagggga	tgggaggttg	tgggcattga	tggggaagga
	ggctggcttg	tcccctcctc		
2221	actcccttcc	cataagctat	agacccgagg	aaactcagag
	tcggaacgga	gaaaggtgga		
2281	ctggaagggg	cccgtgggag	tcattctcaac	catcccctcc
	gtggcatcac	cttaggcagg		
2341	gaagtgtgag	aaacacactg	aggcaggga	gtccccaggc
	cccaggaagc	cgtgccctgc		

		2401 ccccgtagg atgtcactca gatggaaccg caggaagctg ctccgtgctt gtttgctcac 2461 ctgggggtgtg ggaggcccg cgggcagttc tgggtgctcc ctaccacctc cccagccttt 2521 gatcaggtgg ggagtcaggg acccctgccc ttgtcccact caagccaagc agccaagctc 2581 ctggggaggc cccactgggg aaataacagc tgtggctcac gtgagagtgt cttcacggca 2641 ggacaacgag gaagccctaa gacgtccctt ttttctctga gtatctcctc gcaagctggg 2701 taatcgatgg gggagtctga agcagatgca aagaggcaag aggctggatt ttgaattttc 2761 tttttaataa aaaggcacct ataaaacagg tcaatacagt acaggcagca cagagacccc 2821 cggaacaagc ctaaaaattg tttcaaaata aaaaccaaga agatgtcttc acatattgta 2881 aaaaaaaaaa aaaaaa
19	NP_116743. 1 Типовая последоват ельность аминокисло т для предшестве ника человеческ ого CXCR5	1 masfkavfvp vayslifllg vignvlvlvi lerhrqtrss tetflfhlav adlllvfilp 61 favaegsvgw vlgtflcktv ialhkvnfyc sslllaciav drylaivhav hayrhrlls 121 ihitcgtiwl vgflalpei lfakvsqghh nnsiprctfs qenqaethaw ftsrflyhva 181 gflpmlvmg wcyvgvvhrl rqaqrprqrq kavrvailvt sifflcwspy hivifldtla 241 rlkavdntck lngslpvait mceflglahc clnplytfa gvkfrsdlr lltklgctgp 301 aslcqlfsw rrsslseen atslttf
20	NP_001707. 1 Типовая последоват ельность аминокисло т для предшестве	1 mnypltlemd lenledlfwe ldrlndyndt slvenhlcpa tegplmasfk avfvpvaysl 61 ifllgvignv lvlvilerhr qtrsstetfl fhlaavadlll vfilpfavae gsvgwvlgtf 121 lcktvialhk vnfycsslll aciavdryla ivhavhayrh rrllsihitc gtiwlvgfl 181 alpeilfakv sqghhnnslp rctfsgenqa ethawftsrf lyhvagflp mlvmgwcyyg

	ника человеческ ого CXCR5	241 vvhlrlrqaqr rpqrqkavrv ailvtsiff1 cwspyhivif ldtlarl1kav dntcklngsl 301 pvaitmcefl glahcccln1pm lytfagvkfr sdlsrlltkl gctgpaslcq lfpswrss1 361 sesenatslt tf	
21	NM_031200, 2 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая человеческ ий CCR9	1 gcttcctttc tcgtgttggt atcgggtagc tgctgctca gaaccacaaa agcctgcccc 61 tcatcccagg cagagagcaa cccagctctt tcccagaca ctgagagctg gtggtgcctg 121 ctgtcccagg gagagttgca tcgccctcca cagagcaggc ttgcatctga ctgaccacc 181 atgacaccca cagacttcac aagccctatt cctaacatgg ctgatgacta tggctctgaa 241 tccacatctt ccatggaaga ctacgttaac ttcaacttca ctgacttcta ctgtgagaaa 301 aacaatgtca ggcagtttgc gagccatttc ctcccaccct tgtactggct cgtgttcatc 361 gtgggtgcct tgggcaacag tcttggtatc cttgtctact ggtactgcac aagagtgaag 421 accatgaccg acatgttcct tttgaattg gcaattgctg acctcctctt tcttgctact 481 ctccctctct gggccattgc tgctgctgac cagtggaaat tccagacctt catgtgcaag 541 gtggtcaaca gcatgtacaa gatgaacttc tacagctgtg tgttgctgat catgtgcatc 601 agcgtggaca ggtacattgc cattgccag gccatgagag cacatacttg gagggagaaa 661 aggcttttgt acagcaaaat gggttgcttt accatctggg tattggcagc tgctctctgc 721 atcccagaaa tcttatacag ccaaatcaag gaggaatccg gcattgctat ctgcaccatg 781 gtttacccta gcgatgagag caccaactg aagtcagctg tcttgaccct gaaggtcatt 841 ctggggttct tccttccctt cgtgggtcatg gcttgctgct ataccatcat cattcacacc 901 ctgatacaag ccaagaagtc ttccaagcac aaagccctaa	

		aagtgaccat cactgtcctg		
961	accgtctttg tcttgtctca	gtttccctac aactgcattt		
	tgttggtgca gaccattgac			
1021	gcctatgcca tgttcatctc	caactgtgcc gtttccacca		
	acattgacat ctgcttccag			
1081	gtcaccacaga ccatcgcctt	cttccacagt tgcctgaacc		
	ctgttctcta tgtttttgtg			
1141	ggtgagagat tccgccggga	tctcgtgaaa accctgaaga		
	acttggttg catcagccag			
1201	gcccagtggg tttcatttac	aaggagagag ggaagcttga		
	agctgtcgtc tatgttgctg			
1261	gagacaacct caggagcact	ctccctctga ggggtcttct		
	ctgaggtgca tggttctttt			
1321	ggaagaaatg agaaatacag	aaacagtttc cccactgatg		
	ggaccagaga gagtgaaga			
1381	gaaaagaaaa ctcagaaagg	gatgaatctg aactatatga		
	ttacttgtag tcagaatttg			
1441	ccaaagcaaa tatttcaaaa	tcaactgact agtgcaggag		
	gctgttgatt ggctcttgac			
1501	tgtgatgccc gcaattctca	aaggaggact aaggaccggc		
	actgtggagc accctggctt			
1561	tgccactcgc cggagcatca	atgccgctgc ctctggagga		
	gcccttgat tttctccatg			
1621	cactgtgaac ttctgtggct	tcagttctca tgctgcctct		
	tccaaaagg gacacagaag			
1681	cactggctgc tgctacagac	cgcaaaagca gaaagtttcg		
	tgaaaatgtc catctttggg			
1741	aaattttcta cctgtctctt	gagcctgata acccatgcca		
	ggtcttatag attcctgac			
1801	tagaaccttt ccaggcaatc	tcagacctaa tttccttctg		
	ttctccttgt tctgttctgg			
1861	gccagtgaag gtccttgctt	tgattttgaa acgatctgca		
	ggtcttgcca gtgaaccctt			
1921	ggacaactga ccacaccac	aaggcatcca aagtctgttg		
	gcttccaatc catttctgtg			
1981	tcctgctgga ggttttaacc	tagacaagga ttcogcttat		
	tccttggat ggtgacagtg			

		2041 tctctccatg gcctgagcag ggagattata acagctgggt tcgcaggagc cagccttggc 2101 cctggttag gcttgttctg ttgagtggca cttgctttgg gtccaccgtc tgtctgctcc 2161 ctagaaaatg ggctgggttct tttggccctc ttctttctga ggcccacttt attctgagga 2221 atacagttag cagatatggg cagcagccag gtagggcaaa ggggtgaagc gcaggccttg 2281 ctggaaggct atttacttcc atgcttctcc ttttcttact ctatagtggc aacattttaa 2341 aagcttttaa cttagagatt aggctgaaaa aaataagtaa tggaattcac ctttgcatct 2401 ttgtgtctt tcttatcatg atttgcaaa atgcatcacc tttgaaaata tttcacatat 2461 tggaaaagt ctttttaatg tgtatatgaa gcattaatta cttgtcactt tctttaccct 2521 gtctcaatat tttaagtgtg tgcaattaaa gatcaaatag atacatt
22	NM00125636 9.1 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая человеческ ий CCR9	1 gcttcctttc tcgtgttgtt atcgggtagc tgcctgctca gaaccacaaa agcctgcccc 61 tcatcccagg cagagagcaa cccagctctt tcccagaca ctgagagctg gtgggtgcctg 121 ctgtcccagg gagagttgca tcgccctcca cagagcaggc ttgcatctga ctgaccacc 181 atgacacca cagacttcac atctctcca ggccccgtc cagatcacct tccctcgctg 241 gcccaggaat ccatctcctt ccaggacctt agcccaggac taacacaagc cctattccta 301 acatggctga tgactatggc tctgaatcca catcttccat ggaagactac gttaacttca 361 acttcactga cttctactgt gagaaaaaca atgtcaggca gtttgcgagc catttcctcc 421 cacccttgta ctggctcgtg ttcacgtgg gtgccttggg caacagtctt gttatccttg 481 tctactggta ctgcacaaga gtgaagacca tgaccgacat gttccttttg aatttgcaa 541 ttgtgacct cctctttctt gtcactcttc cctctctgggc

	cattgctgct gctgaccagt			
601	ggaagttcca gaccttcatg	tgcaaggtgg	tcaacagcat	
	gtacaagatg aacttctaca			
661	gctgtgtgtt gctgatcatg	tgcatcagcg	tggacaggta	
	cattgccatt gccaggcca			
721	tgagagcaca tacttggagg	gagaaaaggc	ttttgtacag	
	caaaatggtt tgctttacca			
781	tctgggtatt ggcagctgct	ctctgcatcc	cagaaatcct	
	atacagccaa atcaaggagg			
841	aatcggcat tgctatctgc	accatggttt	accctagcga	
	tgagagcacc aaactgaagt			
901	cagctgtcct gaccctgaag	gtcattctgg	ggttcttcct	
	tcccttcgtg gtcattgctt			
961	gctgctatac catcatcatt	cacaccctga	tacaagccaa	
	gaagtcttcc aagcaciaag			
1021	ccctaaaagt gaccatcact	gtcctgaccg	tctttgtcct	
	gtctcagttt ccctacaact			
1081	gcattttgtt ggtgcagacc	attgacgcct	atgccatggt	
	catctccaac tgtgccgttt			
1141	ccaccaacat tgacatctgc	ttccaggcca	cccagaccat	
	cgccttcttc cacagttgcc			
1201	tgaaccctgt tctctatggt	tttgtgggtg	agagattccg	
	ccgggatctc gtgaaaacc			
1261	tgaagaactt gggttgcatc	agccaggccc	agtgggtttc	
	atttacaagg agagaggga			
1321	gcttgaagct gtcgtctatg	ttgctggaga	caacctcagg	
	agcactctcc ctctgagggg			
1381	tcttctctga ggtgcatggt	tcttttgga	gaaatgagaa	
	atacagaaac agtttcccca			
1441	ctgatgggac cagagagagt	gaaagagaaa	agaaaactca	
	gaaagggatg aatctgaact			
1501	atatgattac ttgtagtcag	aatttgccaa	agcaaatatt	
	tcaaaatcaa ctgactagt			
1561	caggaggctg ttgattggct	cttgactgtg	atgcccgcga	
	ttctcaaagg aggactaagg			
1621	accggcactg tggagcacc	tggttttgcc	actcgccgga	
	gcatcaatgc cgctgcctct			

		1681 ggaggagccc ttggattttc tccatgcact gtgaacttct gtggcttcag ttctcatgct 1741 gcctcttcca aaaggggaca cagaagcact ggctgctgct acagaccgca aaagcagaaa 1801 gtttcgtgaa aatgtccatc tttgggaaat tttctaccot gctcttgagc ctgataaccc 1861 atgccaggtc ttatagattc ctgatctaga acctttccag gcaatctcag acctaatttc 1921 cttctgttct ccttgttctg ttctgggcca gtgaaggtcc ttgttctgat tttgaaacga 1981 tctgcaggtc ttgccagtga acccctggac aactgaccac accacaagg catccaaagt 2041 ctggttgctt ccaatccatt tctgtgtcct gctggagggt ttaacctaga caaggattcc 2101 gcttattcct tggatggtg acagtgtctc tccatggcct gagcagggag attataacag 2161 ctgggttcgc aggagccagc cttggccctg ttgtaggctt gttctgttga gtggcacttg 2221 ctttggttc accgtctgtc tgctccctag aaaatgggct ggttcttttg gccctcttct 2281 ttctgaggcc cactttattc tgaggaatac agtgagcaga tatgggcagc agccaggtag 2341 ggcaaagggg tgaagcgag gccttgctgg aaggctattt acttccatgc ttctcctttt 2401 ctactctat agtggcaaca ttttaaaagc ttttaactta gagattagc tgaaaaaat 2461 aagtaatgga attcaccttt gcactctttg tgtctttctt atcatgattt ggcaaaatgc 2521 atcacctttg aaaatatttc acatattgga aaagtgtttt ttaatgtgta tatgaagcat 2581 taattacttg tcactttctt taccctgtct caatatttta agtgtgtgca attaaagatc 2641 aaatagatac att	
23	NP_112477. 1 Типовая	1 mtpdftspi pnmaddygse stssmedyvn fnftdfycek nnvrqfashf lpplywlvfi 61 vgalgnsuvi lvywyctrvk tmtdmfllnl aiadllflvt	

	последовательность аминокислот для предшественника человеческого CCR9	lpfwaiaaad qwkqtfmck 121 vvnsmykmnf yscvllimci svdryiaiaq amrahtwrek rllyskmvcf tiwvlaaalc 181 ipeilysqik eesgiaictm vypsdestkl ksavltlkvi lgfflpfvvm accytiit 241 liqakkskh kalkvtitvl tvfvlsqfpy ncillvqtid ayamfisnca vstnidicfq 301 vtqtiaffhs clnpvlyvfv gerfrrdlvk tlknlgcisq aqwvsftrre gslklssmll 361 ettsgalsl
24	NP_001243298.1 Типовая последовательность аминокислот для предшественника человеческого CCR9	1 maddygsest ssmedyvnfn ftdfyceknn vrqfashflp plywlvfivg algnslvilv 61 ywyctrvktm tdmfllnlai adllflvltlp fwaiiaadqw kfqtfmckvv nsmykmnfys 121 cvllimciv dryiaiaqam rahtwrekrl lyskmvcfti wvlaaalcip eilysqikee 181 sgiaictmvy psdestklks avltlkvilg fflpfvumac cytiitli qakkskhka 241 lkvtitvltv fvlsqfpync illvqtiday amfisncavs tnidicfqvt qtiaffhscl 301 npvlyvfvge rfrdlvktl knlgcisqaq wvsftrregs lklssmlllet tsgalsl
25	NM_000885.4 Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий $\alpha 4$	1 ataacgtcctt tgtcactaaa atgttcccca ggggccttcg gcgagtccttt ttgtttggtt 61 ttttggtttt aatctgtggc tcttgataat ttatctagt gttgctaca cctgaaaaac 121 aagacacagt gtttaactat caacgaaaga actggacggc tccccgccgc agtccactc 181 cccgagtttg tggctggcat ttgggccacg ccgggctggg cggtcacagc gaggggcgcg 241 cagtttgggg tcacacagct ccgcttctag gccccaaacca ccgttaaaag gggaagccc 301 tgcccatca ggtccgctct tgctgagccc agagccatcc cgcgctctgc gggctgggag 361 gcccgggcca ggacgcgagt cctgcgcagc cgaggttccc cagcgcccc tgacgcgcg

421	cgtaggcaga	gacggagccc	ggccctgcgc	ctccgcacca
	cgcccgggac	cccacccagc		
481	ggcccgtagc	cggagaagca	gcgcgagcac	ccgaagctcc
	cggtggcg	cagaaaccgg		
541	gagtggggcc	gggcgagtgc	gcggcatccc	aggccggccc
	gaacgctccg	cccgcggtgg		
601	gccgacttcc	cctcctcttc	cctctctect	tcctttagcc
	cgctggcgcc	ggacacgctg		
661	cgcctcatct	cttggggcgt	tcttcccgt	tggccaaccg
	tcgcatcccg	tgcaactttg		
721	gggtagtggc	cgtttagtgt	tgaatgttcc	ccaccgagag
	cgcatggctt	gggaagcgag		
781	gcgcgaaccc	ggccccgaa	gggccgccgt	ccgggagacg
	gtgatgctgt	tgtgtgcct		
841	gggggtcccg	accggccgcc	cctacaacgt	ggacactgag
	agcgcgctgc	tttaccagg		
901	ccccacaac	acgtgttgcg	gtactcgggt	cgtgctgcac
	agccacgggg	cgaaccgatg		
961	gctcctagt	ggtgcgcca	ctgccaactg	gctcgccaac
	gcttcagtga	tcaatcccgg		
1021	ggcgatttac	agatgcagga	tcggaaagaa	tcccggccag
	acgtgcgaac	agctccagct		
1081	gggtagccct	aatggagaac	cttgtggaaa	gaattgtttg
	gaagagagag	acaatcagt		
1141	gttgggggtc	acactttcca	gacagccagg	agaaaatgga
	tccatcgtga	cttgtgggca		
1201	tagatggaaa	aatatatttt	acataaagaa	tgaaaataag
	ctccccactg	gtggttgcta		
1261	tgagtgccc	cctgatttac	gaacagaact	gagtaaaaga
	atagctccgt	gttatcaaga		
1321	ttatgtgaaa	aaatttgag	aaaattttgc	atcatgtcaa
	gctggaatat	ccagttttta		
1381	cacaaaggat	ttaattgtga	tgggggcccc	aggatcatct
	tactggactg	gctctctttt		
1441	tgtctacaat	ataactacaa	ataaatacaa	ggctttttta
	gacaaacaaa	atcaagtaaa		
1501	atttggaggt	tatttaggat	attcagtcgg	agctgggtcat

		tttcggagcc agcatactac		
1561	cgaagtagtc	ggaggagctc	ctcaacatga	gcagattggt
	aaggcatata	tattcagcat		
1621	tgatgaaaaa	gaactaaata	tcttacatga	aatgaaaggt
	aaaaagcttg	gacgtactt		
1681	tgagcttct	gtctgtgctg	tggaacctca	tgcataggc
	ttctcagatc	tgctcgtggg		
1741	agcaccatg	cagagcacca	tcagagagga	aggaagagtg
	tttgtgtaca	tcaactctgg		
1801	ctcgggagca	gtaatgaatg	caatggaaac	aaacctcgtt
	ggaagtgaca	aatatgctgc		
1861	aagatttggg	gaatctatag	ttaatcttgg	cgacattgac
	aatgatggct	tgaagatgt		
1921	tgctatcgga	gctccacaag	aagatgactt	gcaagggtgt
	atttatattt	acaatggccg		
1981	tcgagatggg	atctcgtcaa	ccttctcaca	gagaattgaa
	ggacttcaga	tcagcaaata		
2041	gttaagtatg	tttgacagct	ctatatcagg	acaaattgat
	gcagataata	atggctatgt		
2101	agatgtagca	gttggtgctt	ttcgggtctga	ttctgtgtgc
	ttgctaagga	caagacctgt		
2161	agtaattggt	gacgcttctt	taagccaccc	tgagtcagta
	aatagaacga	aatttgactg		
2221	tggtgaaaat	ggatggcctt	ctgtgtgcat	agatctaaca
	ctttgtttct	catataaggg		
2281	caaggaagtt	ccagggtaca	ttgttttgtt	ttataacatg
	agtttggatg	tgaacagaaa		
2341	ggcagagtct	ccaccaagat	tctatttctc	ttctaattgga
	acttctgacg	tgattacagg		
2401	aagcatacag	gtgtccagca	gagaagctaa	ctgtagaaca
	catcaagcat	ttatgcggaa		
2461	agatgtgcgg	gacatcctca	ccccaattca	gattgaagct
	gcttaccacc	ttggctcctca		
2521	tgtcatcagt	aaacgaagta	cagaggaatt	cccaccactt
	cagccaattc	ttcagcagaa		
2581	gaaagaaaaa	gacataatga	aaaaaacaat	aaactttgca
	aggttttgtg	cccatgaaaa		

2641	ttgttctgct	gattttacagg	tttctgcaaa	gattggggtt
	ttgaagcccc	atgaaaataa		
2701	aacatatcct	gctgttgga	gtatgaagac	attgatgttg
	aatgtgtcct	tgtttaatgc		
2761	tggagatgat	gcatatgaaa	cgactctaca	tgtcaaaacta
	cccgtgggtc	tttatttcat		
2821	taagatttta	gagctggaag	agaagcaa	aaactgtgaa
	gtcacagata	actctggcgt		
2881	ggtacaactt	gactgcagta	ttggctatat	atatgtagat
	catctctcaa	ggatagatat		
2941	tagctttctc	ctggatgtga	gctcactcag	cagagcggaa
	gaggacctca	gtatcacagt		
3001	gcatgctacc	tgtgaaaatg	aagaggaaat	ggacaatcta
	aagcacagca	gagtgcactgt		
3061	agcaatacct	ttaaaatgat	aggttaagct	gactgttcat
	gggtttgtaa	acccaacttc		
3121	atttgtgtat	ggatcaaatg	atgaaaatga	gcctgaaacg
	tgcatgggtg	agaaaatgaa		
3181	cttaactttc	catgttatca	acactggcaa	tagtatggct
	cccaatgtta	gtgtggaaat		
3241	aatggtacca	aattctttta	gccccaaac	tgataagctg
	ttcaacattt	tgatgtcca		
3301	gactactact	ggagaatgcc	actttgaaa	ttatcaaaga
	gtgtgtgcat	tagagcagca		
3361	aaagagtga	atgcagacct	tgaaaggcat	agtccggttc
	ttgtccaaga	ctgataagag		
3421	gctattgtac	tgataaaaag	ctgatccaca	ttgttttaaat
	ttcttgtgta	attttgggaa		
3481	aatggaaagt	ggaaaagaag	ccagtgttca	tatccaactg
	gaaggccggc	catccatttt		
3541	agaaatggat	gagacttcag	cactcaagtt	tgaaataaga
	gcaacagggt	ttccagagcc		
3601	aaatccaaga	gtaattgaac	taaacaagga	tgagaatggt
	gcgcatgttc	tactggaagg		
3661	actacatcat	caaagacca	aacgttat	caccatagtg
	attatttcaa	gtagcttgct		
3721	acttggaact	attgtacttc	tgttgatctc	atatgttatg

		tggaaggctg gcttctttaa		
3781	aagacaatac	aaatctatcc	tacaagaaga	aaacagaaga
	gacagttgga	gttatatcaa		
3841	cagtaaaagc	aatgatgatt	aaggacttct	ttcaaattga
	gagaatggaa	aacagactca		
3901	ggttgtagta	aagaaattta	aaagacactg	tttacaagaa
	aaaatgaatt	ttgtttgac		
3961	ttcttttact	catgatcttg	tgacatatta	tgtcttcattg
	caaggggaaa	atctcagcaa		
4021	tgattactct	ttgagataga	agaactgcaa	aggtaataat
	acagccaaag	ataatctctc		
4081	agctttttaa	tggttagaga	aacactaaag	cattcaattt
	attcaagaaa	agtaagccct		
4141	tgaagatatc	ttgaaatgaa	agtataactg	agttaaatta
	tactggagaa	gtcttagact		
4201	tgaataacta	cttaccatat	gtgcttgcct	cagtaaaatg
	aacccactg	ggtgggcaga		
4261	ggttcatttc	aaatacatct	ttgatacttg	ttcaaaatat
	gttcttttaa	aatataattt		
4321	tttagagagc	tgttcccaa	ttttctaacg	agtgaccat
	tatcacttta	aagcccttta		
4381	tttataatac	atttcctacg	ggctgtgttc	caacaaccat
	tttttttcag	cagactatga		
4441	atattatagt	attataggcc	aaactggcaa	acttcagact
	gaacatgtac	actggtttga		
4501	gcttagtgaa	attacttctg	gataattatt	tttttataat
	tatggatttc	accatctttc		
4561	tttctgtata	tatacatgtg	tttttatgta	ggtatatatt
	taccattctt	cctatctatt		
4621	cttcctataa	cacaccttta	tcaagcatat	ccaggagtaa
	tcttcaaata	ttttgttata		
4681	ttctgaaaca	aaagattgtg	agtgttgac	tttacctgat
	acacgtgat	ttagaaaata		
4741	cagaaacat	acctcactaa	taactttaaa	atcaaagctg
	tgcaaagact	agggggccta		
4801	tacttcatat	gtattatgta	ctatgtaaaa	tattgactat
	cacacaacta	tttccttgga		

4861	tgtaattcctt	tgttaccctt	tacaagtata	agtgttacct
	tacatggaaa	cgaagaaaca		
4921	aaattcataa	atttaaattc	ataaatttag	ctgaaagata
	ctgattcaat	ttgtatacag		
4981	tgaatataaa	tgagacgaca	gcaaaatttt	catgaaatgt
	aaaatatttt	tatagtttgt		
5041	tcatactata	tgaggttcta	ttttaaata	ctttctggat
	tttaaaaaat	ttctttaaat		
5101	acaatcattt	ttgtaatatt	tattttatgc	ttatgatcta
	gataattgca	gaatatcatt		
5161	ttatctgact	ctgccttcac	aagagagctg	tggccgaatt
	ttgaacatct	gttataggga		
5221	gtgatcaaat	tagaaggcaa	tgtggaaaaa	caattctggg
	aaagatttct	ttatatgaag		
5281	tccctgccac	tagccagcca	tcctaattga	tgaaagttat
	ctgttcacag	gcctgcagt		
5341	atggtgagga	atgttctgag	atttgcgaag	gcatttgagt
	agtgaatgt	aagcacaaaa		
5401	cctcctgaac	ccagagtgtg	tatacacagg	aataaacttt
	atgacattta	tgtattttta		
5461	aaaaactttg	tatcgttata	aaaaggctag	tcattctttc
	aggagaacat	ctaggatcat		
5521	agatgaaaaa	tcaagcccg	atttagaact	gtcttctcca
	ggatggtctc	taaggaaatt		
5581	tacatttgg	tctttcctac	tcagaactac	tcagaaacaa
	ctatatattt	caggttatct		
5641	gagcacagt	aaagcagagt	actatgggtg	tccaacacag
	gcctctcaga	tacaagggga		
5701	acacaattac	atattgggct	agattttgcc	cagttcaaaa
	tagtatttgt	tatcaactta		
5761	ctttgttact	tgtatcatga	attttaaaac	cctaccactt
	taagaagaca	gggatgggtt		
5821	attctttttt	ggcaggtagg	ctatataact	atgtgatttt
	gaaatttaac	tgctctggat		
5881	tagggagcag	tgaatcaagg	cagacttatg	aaatctgtat
	tatatttgta	acagaatata		
5941	ggaaatttaa	cataattgat	gagctcaaat	cctgaaaaat

		gaaagaatcc aaattatctc 6001 agaattatct aggttaaata ttgatgtatt atgatggttg caaagttttt ttgtgtgtcc 6061 aataaacaca ttgtaaaaaa aa
26	NM_000889. 2 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая человеческ ий β7	1 aaatcttccc caccctgggg agtgtcactt cctcctctgc cgtctcccag atcagtacac 61 aaaggctgct gctgccgcca gaggaaggac tgctctgcac gcacctatgt ggaaactaaa 121 gccagagag aaagtctgac ttgcccaca gccagtgagt gactgcagca gcaccagaat 181 ctggctctgtt tcctgtttgg ctcttctacc actacggctt gggatctcgg gcatggtggc 241 tttgccaatg gtccttgttt tgctgctggt cctgagcaga ggtgagagtg aattggacgc 301 caagatccca tccacagggg atgccacaga atggcggaat cctcacctgt ccatgctggg 361 gtctctccag ccagccccct cctgccagaa gtgcatcctc tcacaccca gctgtgcatg 421 gtgcaagcaa ctgaacttca ccgcgtcggg agaggcggag gcgcggcgct gcgccgacg 481 agaggagctg ctggctcgag gctgcccgct ggaggagctg gaggagcccc gcggccagca 541 ggagggtgctg caggaccagc cgctcagcca gggcgccgc ggagagggtg caaccagct 601 ggcgccgag cggtccggg tcacgctgag gcctggggag ccccagcagc tccaggtccg 661 cttccttcgt gctgagggat acccggtgga cctgtactac cttatggacc tgagctactc 721 catgaaggac gacctggaac gcgtgcgcca gctcgggcac gctctgctgg tccggctgca 781 ggaagtcacc cattctgtgc gcattggttt tggttccttt gtggacaaaa cgggtgctgc 841 ctttgtgagc acagtaccct ccaaactcgg ccaccctgc cccaccggc tggagcgtg 901 ccagtcacca ttcagcttcc accatgtgct gtccctgacg ggggacgcac aagccttcga

961	gcgggaggtg	gggcgccaga	gtgtgtccgg	caatctggac
	tcgcctgaag	gtggcttcga		
1021	tgccattctg	caggctgcac	tctgccagga	gcagattggc
	tggagaaatg	tgtcccggct		
1081	gctggtgttc	acttcagacg	acacattcca	tacagctggg
	gacgggaagt	tgggcggcat		
1141	tttcatgccc	agtgatgggc	actgccactt	ggacagcaat
	ggcctctaca	gtcgcagcac		
1201	agagtttgac	tacccttctg	tgggtcaggt	agcccaggcc
	ctctctgcag	caaatatcca		
1261	gcccattctt	gctgtcacca	gtgccgcact	gcctgtctac
	caggagctga	gtaaactgat		
1321	tcctaagtct	gcagttgggg	agctgagtga	ggactccagc
	aacgtgttac	agctcatcat		
1381	ggatgcttat	aatagcctgt	cttcaccgt	gacccttgaa
	cactcttcac	tccctcctgg		
1441	ggtccacatt	tcttacgaat	cccagtgtga	gggtcctgag
	aagagggagg	gtaaggctga		
1501	ggatcgagga	cagtgcacc	acgtccgaat	caaccagacg
	gtgactttct	gggtttctct		
1561	ccaagccacc	cactgcctcc	cagagcccca	tctcctgagg
	ctccgggccc	ttggtttctc		
1621	agaggagctg	attgtggagt	tgcacacgct	gtgtgactgt
	aattgcagtg	acaccagcc		
1681	ccaggctccc	cactgcagtg	atggccaggg	acacctacaa
	tgtggtgtat	gcagctgtgc		
1741	ccctggccgc	ctaggtcggc	tctgtgagtg	ctctgtggca
	gagctgtcct	ccccagacct		
1801	ggaatctggg	tgccgggctc	ccaatggcac	agggcccctg
	tgcagtggaa	agggctcactg		
1861	tcaatgtgga	cgctgcagct	gcagtggaca	gagctctggg
	catctgtgcg	agtgtgacga		
1921	tgccagctgt	gagcgacatg	agggcatcct	ctgcggaggc
	tttggtcgct	gccaatgtgg		
1981	agtatgtcac	tgtcatgcca	accgcacggg	cagagcatgc
	gaatgcagtg	gggacatgga		
2041	cagttgcatc	agtcccaggg	gagggctctg	cagtgggcat

		ggacgctgca aatgcaaccg 2101 ctgccagtgc ttggacggct actatgggtgc tctatgcgac caatgcccag gctgcaagac 2161 accatgcgag agacaccggg actgtgcaga gtgtggggcc ttcaggactg gccactggc 2221 caccaactgc agtacagctt gtgcccatac caatgtgacc ctggccttgg cccctatctt 2281 ggatgatggc tggtgcaaag agcggaccct ggacaaccag ctgttcttct tcttggtgga 2341 ggatgacgcc agaggcacgg tcgtgctcag agtgagaccc caagaaaagg gagcagacca 2401 cacgcaggcc attgtgctgg gctgcgtagg gggcatcgtg gcagtggggc tggggctggt 2461 cctggcttac cggtctcgg tggaatcta tgaccgccg gaatacagtc gctttgagaa 2521 ggagcagcaa caactcaact ggaagcagga cagtaatcct ctctacaaaa gtgccatcac 2581 gaccaccatc aatcctcgct ttcaagaggc agacagtccc actctctgaa ggaggagg 2641 acacttacc aaggctcttc tccttgagg acagtgggaa ctggaggggtg agaggaagg 2701 tgggtctgta agaccttgg aggggactaa ttcactggcg aggtgcggcc accaccctac 2761 ttcattttca gactgacacc caagagggt gcttcccatg cctgcaacct tgcattccatc 2821 tgggctaccc cacccaagta tacaataaag tcttacctca gaccacaaaa aaaaaaaa
27	NP_000876. 3 Типовая последоват ельность аминокисло т для предшестве ника	1 mawearrepg prraavretv mlllclgvpt grpynvdes allyqgphnt lfgysvvlhs 61 hganrwillvg aptanwlana svinpgaiyr crigknpggt ceqlqlgspn gepcgktcle 121 erdnqwlgt lsrqpgengs ivtcghrwkn ifyiknenkl ptggcygvpp dlrtelskri 181 apcyqdyvkk fgenfascqa gissfytkdl ivmgapgssy wtgslfvyni ttnkykafld 241 kqnqvkgfsy lgysvgaghf rsqhttevvg gapqheqigk

	человеческ ого α4	ayifsideke lnilhemkgk 301 klgsyfgasv cavdlnadgf sdllvgapmq stireegrvf vyinsgsgav mnametnlvg 361 sdkyaarfge sivnlgidn dgfedvaiga pqeddlggai yiynggradgi sstfsqrieg 421 lqiskslsmf gqsisgqida dnngyvdivav gafrsdsavl lrtrpvvivd aslshpesvn 481 rtkfcdveng wpsvcidltl cfsykgkevp gyivlfynms ldvnrkaesp prfyfssngt 541 sdvitgsiqv ssreancrth qafmrkdvrd iltpiqieaa yhlghvisk rsteefpplq 601 pilqqkkekd imkktinfar fcahencsad lqvsakigfl kphenktyla vgsmtlmln 661 vslnagdda yettlhvklp vglyfikile leekqincev tdnsgvvqld csigiyvdh 721 lsridisfll dvsslsraee dlsitvhatc eneeemdnlk hsrvtvaipk kyevkltvhg 781 fvnptsfvyg sndenepetc mvekmnlthf vintgnsmap nvsveimvpn sfspqtdklf 841 nildvqtttg echfenyqrv caleqqksam qtlkgivrfll sktdkrllyc ikadphclnf 901 lcnfgkmesg keasvhiqle grpsilemde tsalkfeira tgfpepnprv ielnkdenva 961 hvllleglhhq rpkryftivi issl1llgli vlllisymw kagffkrqyk silqeenrrd 1021 swsyinsksn dd
28	NP_000880, 1 Типовая последоват ельность аминокисло т для предшестве нника человеческ	1 mvalpmvlvl llvlsrgese ldakipstgd atewrnpnhs mlgscqpaps cqkcilshps 61 cawckqlnft asgeaearrc arreellarg cpleelepr gqgevlqdp lsqgargega 121 tqlapqrvrv tlrpgepqq l qvrflraegy pvdlylmdl sysmkddler vrqlghallv 181 rlgvthsvr igfgsfvdk vlpfvstvps klrhpcptrl ercqspfsfh hvslstgdaq 241 aferevgrqs vsgnldspeg gfdailqaal cqeigwrv srllvftsdd tfhtagdgl

	оро β7	301 ggifmpsdgh chldsnglys rstefdypsv gqvaqalsaa niqpifavts aalpvqgels 361 klipksavge lsdssnvvq limdaynsls stvtlehssl ppgvhisyes qcegpekreg 421 kaedrgqcnh vringtvtfw vslqathclp ephllrlral gfseelivel htldcncsd 481 tqpgaphcsd ggghlqcgvc scapgrlgrl cecsvaelss pdlesgcrap ngtgplcsgk 541 ghcqcgrcsc sgqssghlce cddascerhe gilcggfgrc qcgvchchan rtgracecsg 601 dmdscispeg glcsgghrck cnrcqcldgy ygalcdqcpq cktpcerhrd caecgafrtg 661 platncstac ahtnvtlala pildgwkce rtldnqlfff lveddargtv vlrvrpqekg 721 adhtqaivlg cvggivavgl glvlayrlsv eiyrreysr fekeqqqlnw kqdsnpkyks 781 aitttinprf qeadsptl
29	NM_016602.2 Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий CCR10	1 agagatgggg acggaggcca cagagcaggt ttcttggggc cattactctg gggatgaaga 61 ggacgcatac tcggctgagc cactgccgga gctttgtctac aaggccgatg tccaggcctt 121 cagccgggcc ttccaaccca gtgtctccct gaccgtggct gcgctgggtc tggccggcaa 181 tggcctgggc ctggccaccc acctggcagc ccgacgcgca gcgcgctcgc ccacctctgc 241 ccacctgctc cagctggccc tggccgacct cttgtgtggc ctgactctgc ctttcgcggc 301 agcaggggct cttcagggct ggagtctggg aagtgccacc tgccgcacca tctctggcct 361 ctactcgcc tccttcacg ccggcttctt cttcttggcc tgtatcagc ccgaccgcta 421 cgtggccatc gcgcgagcgc tcccagccgg gcccgggccc tccactcccg gccgcgcaca 481 cttgggtctc gtcacgtgt ggctgtgtc actgtctctg gcgtgcctg cgctgtctt 541 cagccaggat gggcagcggg aaggccaacg acgtgtctgc

		ctcatcttcc cagagggcct 601 cacgcagacg gtgaaggggg cgagcgccgt ggcgcaggtg gccctgggct tcgcgtgcc 661 gctgggcgtc atggtagcct gctacgcgt tctgggccgc acgtgctgg ccgccagggg 721 gcccgagcgc cggcgtgcgc tgcgcgtcgt ggtggctctg gtggcggcct tcgtggtgct 781 gcagctgccc tacagcctcg ccctgctgct ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgcga 841 gcggagctgc cctgccagca aacgcaagga tgtcgactg ctggtgacca gcggttggc 901 cctcgccgc tgtggcctca atcccgttct ctacgccttc ctgggcctgc gcttcgccca 961 ggacctgcgg aggctgctac ggggtgggag ctgccccca qqccctcaac cccqccqcg 1021 ctgccccgc cggccccgcc tttcttcctg ctgagctccc acggagaccc acagtctctc 1081 ctgggacaac tagggctgcg aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tgggaaagg 1141 gagtaggtgg gggaacactg agaaagaggc agggacctaa agggactacc tctgtgcctt 1201 gccacattaa attgataaca tggaaatgag atgcaacca acaa
30	AF215981.1 Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий CCR10	1 agagatgggg acggaggcca cagagcaggt ttcttggggc cattactctg gggatgaaga 61 ggacgcatac tcggctgagc cactgccgga gctttgtac aaggccgatg tccaggcctt 121 cagccggggc ttccaacca gtgtctccct gaccgtggct gcgctgggtc tggccggcaa 181 tggcctggtc ctggccaccc acctggcagc ccgacgcgca gcgcgctcgc ccacctctgc 241 ccacctgctc cagctggccc tggccgacct cttgctggcc ctgactctgc ccttcgcggc 301 agcaggggct cttcagggt ggagtctggg aagtgccacc tgccgcacca tctctggcct 361 ctactcgcc tccttcacg ccggcttcct cttcctggcc tgtatcagcg ccgaccgcta

		421 cgtggccatc gcgcgagcgc tcccagccgg gccgcggccc tccactcccg gccgcgcaca 481 cttgggtctcc gtcacgtgtt ggctgctgtc actgctcctg gcgctgcctg cgctgctctt 541 cagccaggat gggcagcggg aaggccaacg acgctgtcgc ctcatcttcc ccgagggcct 601 cacgcagacg gtgaaggggg cgagcgccgt ggcgaggtg gccctgggct tcgcgctgcc 661 gctgggcgtc atggtagcct gctacgcgtc tctgggccgc acgctgctgg ccgccagggg 721 gcccgagcgc cggcgtgcgc tgcgcgtcgt ggtggctctg gtggcggcct tcgtggtgct 781 gcagctgccc tacagcctcg ccctgctgct ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgcga 841 gcggagctgc cctgccagca aacgaagga tgtcgcactg ctggtgacca gcggcttggc 901 cctcgccgcg tgtggcctca atcccgttct ctacgccttc ctgggcctgc gcttccgcca 961 ggacctgcgg aggtgctac ggggtgggag ctcgccctca gggcctcaac cccgccgcgg 1021 ctgccccgcg cggccccgcc tttcttctg ctcagctccc acggagaccc acagtctctc 1081 ctgggacaac tagggctgcg aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tgggaaaggg 1141 gagtaggtgg gggaacactg agaaagaggc agggacctaa agggactacc tctgtgcctt 1201 gccacattaa attgataaca tggaaatgaa aaaaaaaaaa aaaa
31	NP_057686. 2 Типовая последоват ельность аминокисло т для предшестве нника	1 mgteateqvs wghysgdeed aysaeplpel cykadqvafs rafqpsvslt vaalglagng 61 lvlathlaar raarsptsah llqlaladll laltlpfaaa galqgwslgs atcrtisgly 121 sasfhagflf lacisadryv aiaralpagp rpstpgrahl vsvivwllsl llalpallfs 181 qdggregqrr crlifpeglt qtvkgasava qvalgfalpl gvmvacyall grtllaargp 241 errralrvvv alvaafvvlq lpyslallld tadllaarer

	человеческ ого CCR10	scpaskrkdv allvtsglal 301 arcglnpvly aflglrfrqd lrlllrggsc psgpqprrgc prprlsscs aptethslsw 361 dn
32	P46092.3 Типовая последоват ельность аминокисло т для предшестве нника человеческ ого CCR10	1 mgteateqvs wghysgdeed aysaeplpel cykadvqafs rafqpsvslt vaalglagng 61 lvlathlaar raarsptsah llqlaladll laltlpfaaa galqgwsllgs atcertisgly 121 sasfhagflf lacisadryv aiaralpagp rpstpgrahl vsvivwllsl llalpallfs 181 qdggregqrr crlifpeglt qtvkgasava qvalgfalpl gvmvacyall grtllaargp 241 errralrvvv alvaafvvlq lpyslallld tadllaarer scpaskrkdv allvtsglal 301 arcglnpvly aflglrfrqd lrlllrggsc psgpqprrgc prprlsscs aptethslsw 361 dn
33	NM_005201. 3 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот, кодирующая человеческ ий CCR8	1 tttgtagtgg gaggatacct ccagagaggc tgtgtgctcat tgagctgcac tcacatgagg 61 atacagactt tgtgaagaag gaattggcaa cactgaaacc tccagaacaa aggctgtcac 121 taagggtccc ctgccttgat ggattataca cttgacctca gtgtgacaac agtgaccgac 181 tactactacc ctgatatctt ctcaagcccc tgtgatgcgg aacttattca gacaaatggc 241 aagttgctcc ttgctgtctt ttattgcctc ctgtttgtat tcagtcttct gggaacagc 301 ctggatcatc tggtccttgt ggtctgcaag aagctgagga gcatcacaga tgtatactc 361 ttgaacctgg ccctgtctga cctgcttttt gtcttctcct tcccctttca gacctactat 421 ctgctggacc agtgggtggt tgggactgta atgtgcaaag tggtgtctgg cttttattac 481 attggcttct acagcagcat gtttttcatc accctcatga gtgtggacag gtacctggct 541 gttgtccatg ccgtgtatgc cctaaagggtg aggacgatca

		ggatgggcac aacgctgtgc 601 ctggcagtat ggctaaccgc cattatggct accatcccat tgctagtgtt ttaccaagtg 661 gcctctgaag atggtgttct acagtgttat tcattttaca atcaacagac tttgaagtgg 721 aagatcttca ccaacttcaa aatgaacatt ttaggcttgt tgatcccatt caccatcttt 781 atgttctgct acattaaaat cctgcaccag ctgaagaggt gtcaaaacca caacaagacc 841 aaggccatca ggttggtgct catttgtggtc attgcatctt tacttttctg ggtcccattc 901 aacgtggttc ttttcctcac ttccttgcac agtatgcaca tcttggtggtg atgtagcata 961 agccaacagc tgacttatgc caccatgtc acagaaatca tttcctttac tcaactgctgt 1021 gtgaaccctg ttatctatgc tttgttggg gagaagttca agaaacacct ctcagaaata 1081 tttcagaaaa gttgcagcca aatcttcaac tacctaggaa gacaaatgcc tagggagagc 1141 tgtgaaaagt catcatcctg ccagcagcac tcctcccgtt cctccagcgt agactacatt 1201 ttgtgaggat caatgaagac taaatataaa aaacattttc ttgaatggca tgctagtagc 1261 agtgagcaaa ggtgtgggtg tgaaaggttt ccaaaaaaag ttcagcatga aggatgccat 1321 atatgttgtt gccaacactt ggaacacaat gactaaagac atagttgtgc atgcctggca 1381 caacatcaag cctgtgattg tgtttattga tgatgttgaa caagtggtaa ctttaaagga 1441 ttctgtatgc caagtgaaaa aaaaagatgt ctgacctcct tacatat
34	BC107159.1 Типовая последоват ельность нуклеиновы х кислот,	1 ctttgtgaag aaggaattgg caaactgaa acctccagaa caaaggctgt cactaaggtc 61 ccgctgcctt gatggattat acacttgacc tcagtgtgac aacagtgacc gactactact 121 accctgatat cttctcaagc ccctgtgatg cggaacttat tcagacaaat ggcaagttgc

кодирующая человеческ ий CCR8	181	tccttgctgt	cttttattgc	ctcctgtttg	tattcagtcct
		tctgggaaac	agcctgggtca		
	241	tcctgggcct	tgtggctctgc	aagaagctga	ggagcatcac
		agatgtatac	ctcttgaacc		
	301	tgccctgtc	tgacctgctt	tttgtcttct	ccttcccctt
		tcagacctac	tatctgctgg		
	361	accagtgggt	gtttgggact	gtaatgtgca	aagtgggtgc
		tggttttat	tacattggct		
	421	tctacagcag	catgtttttc	atcacccctca	tgagtgtgga
		caggtagctg	gctgttgtcc		
	481	atgccgtgta	tgccctaaag	gtgaggacga	tcaggatggg
		cacaacgctg	tgccctggcag		
	541	tatggctaac	cgccattatg	gctaccatcc	cattgctagt
		gttttaccaa	gtggcctctg		
	601	aagatgggtg	tctacagtgt	tattcatttt	acaatcaaca
		gactttgaag	tggaagatct		
	661	tcaccaactt	caaaatgaac	attttaggct	tgttgatccc
		attcaccatc	tttatgttct		
	721	gctacattaa	aatcctgcac	cagctgaaga	ggtgtcaaaa
		ccacaacaag	accaaggcca		
	781	tcaggttggg	gctcattgtg	gtcattgcat	ctttactttt
		ctgggtccca	ttcaacgtgg		
	841	ttcttttcct	cacttccttg	cacagtatgc	acatcttgga
		tggtgtagc	ataagccaac		
	901	agctgactta	tgccacccat	gtcacagaaa	tcatttcctt
		tactcactgc	tgtgtgaacc		
	961	ctgttatcta	tgtttttgtt	ggggagaagt	tcaagaaaca
		cctctcagaa	atatttcaga		
	1021	aaagttgcag	ccaaatcttc	aactacctag	gaagacaaat
		gcctagggag	agctgtgaaa		
	1081	agtcatcatc	ctgccagcag	cactcctccc	gttcctccag
		cgtagactac	atthttgtgag		
	1141	gatcaatgaa	gactaaatat	aaaaaacatt	ttcttgaatg
		gcatgctagt	agcagtgcgc		
	1201	aaaggtgtgg	gtgtgaaagg	tttccaaaaa	aagttcagca
		tgaaggatgc	cgtgtgtgtt		
	1261	gttgccaaca	cttggaacac	gatgactggg	gacgtgggtg

		tgcattgctg gcacaacatc 1321 aagcctgtga ttgtgtttat tgatgatgtt gaacaagtgg tggctttgga ggattctgta 1381 tgccaagtga aaggggagat gtctgacctc cttcatatag
35	NP_005192.1 Типовая последовательность аминокислот для предшественника человеческого CCR8	1 mdytldlsvt tvtdyyypdi fsspcdaeli qtngklallav fycllfvfvsl lgnsilvilvl 61 vvckklrsit dvyllnlals dllfvfsfpf qtyylldqgwv fgtvmckvvs gfyigfyss 121 mffitlmsvd rylavvhavy alkvtirmg ttlclavwlt aimatipllv fyqvasedgv 181 lqcysfynqq tlkwkiftnf kmnilgllip ftifmfcyik ilhqlkrcqn hnktkairlv 241 livviasllf wvpfnvvlfl tslhsmhild gcsisqqilty athvteiisf thccvnpviy 301 afvgekfkhh lseifqkscs qifnylgrqm presceksss cqghssrsss vdyil
36	AAI07160.1 Типовая последовательность аминокислот для предшественника человеческого CCR8	1 mdytldlsvt tvtdyyypdi fsspcdaeli qtngklallav fycllfvfvsl lgnsilvilvl 61 vvckklrsit dvyllnlals dllfvfsfpf qtyylldqgwv fgtvmckvvs gfyigfyss 121 mffitlmsvd rylavvhavy alkvtirmg ttlclavwlt aimatipllv fyqvasedgv 181 lqcysfynqq tlkwkiftnf kmnilgllip ftifmfcyik ilhqlkrcqn hnktkairlv 241 livviasllf wvpfnvvlfl tslhsmhild gcsisqqilty athvteiisf thccvnpviy 301 afvgekfkhh lseifqkscs qifnylgrqm presceksss cqghssrsss vdyil
37	NM_005508.4 Типовая последовательность нуклеиновых кислот,	1 gctcacagga agccacgcac ccttgaaagg caccgggtcc ttcttagcat cgtgcttcct 61 gagcaagcct ggcattgcct cacagacctt cctcagagcc gctttcagaa aagcaagctg 121 cttctggttg ggcccagacc tgccttgagg agcctgtaga gttaaaaaat gaacccacg 181 gatatagcag acaccaccct cgatgaaagc atatacagca

кодирующая человеческ ий CCR4	attactatct gtatgaaagt			
	241	atccccaagc	cttgaccaa	agaaggcatc aaggcatttg
	gggagctctt cctgccccca			
	301	ctgtattcct	tggtttttgt	atttggtctg cttggaaatt
	ctgtggtggt tctggtcctg			
	361	ttcaaataca	agcggctcag	gtccatgact gatgtgtacc
	tgctcaacct tgccatctcg			
	421	gatctgctct	tctgtttttc	cctccctttt tggggctact
	atgcagcaga ccagtgggtt			
	481	tttgggctag	gtctgtgcaa	gatgatttcc tggatgtact
	tggtgggctt ttacagtggc			
	541	atattctttg	tcatgtctcat	gagcattgat agatacctgg
	caattgtgca cgcggtgttt			
	601	tccttgaggg	caaggacctt	gacttatggg gtcacacca
	gtttggctac atggctcagt			
	661	gctgtgttcg	cctcccttcc	tggcctttctg ttcagcaactt
	gttatactga gcgcaacct			
	721	acctactgca	aaaccaagta	ctctctcaac tccacgacgt
	ggaaggttct cagctccctg			
	781	gaaatcaaca	ttctcggatt	ggtgatcccc ttagggatca
	tgctgttttg ctactccatg			
	841	atcatcagga	ccttcagca	ttgtaaaaat gagaagaaga
	acaaggcggg gaagatgatc			
	901	tttgccgtgg	tggtcctctt	ccttgggttc tggacacctt
	acaacatagt gctcttcta			
	961	gagaccctgg	tgagctaga	agtccttcag gactgcacct
	ttgaaagata cttggactat			
	1021	gccatccagg	ccacagaaac	tctggcctttt gttcactgct
	gccttaatcc catcatctac			
	1081	ttttttctgg	gggagaaatt	tcgcaagtac atcctacagc
	tcttcaaaac ctgcaggggc			
	1141	ctttttgtgc	tctgccaata	ctgtgggctc ctccaaattt
	actctgctga cccccccagc			
	1201	tcatcttaca	cgcagtccac	catggatcat gatctccatg
	atgctctgta gaaaaatgaa			
	1261	atggtgaaat	gcagagtcaa	tgaactttcc acattcagag
	cttacttaaa attgtatttt			

		1321 agtaagagat tcctgagcca gtgtcaggag gaaggcttac accacagtg gaaagacagc 1381 ttctcatcct gcaggcagct ttttctctcc cactagacaa gtccagcctg gcaagggttc 1441 acctgggctg aggcacacct cctcacacca ggcttgctg caggcatgag tcagtctgat 1501 gagaactctg agcagtgtt gaagaagt gtaggtaata ttgcaaggca aagactattc 1561 ccttctaacc tgaactgatg gggttctcca gaggggaattg cagagtactg gctgatggag 1621 taaatcgcta ccttttgctg tggcaaatgg gccctct
38	P51679.1 Типовая последовательность аминокислот для предшественника человеческого CCR4	1 mnptdiadt ldesiysny lyesipkpct kegikafgel flpplyslvf vfgllgnsvv 61 vlvlfkykrl rsmtdvlln laisdllfvf slpfwggyaa dqwvfglgc kmiswmylv 121 fysgiffvml msidrylaiv havfslrart ltygvitsla twsvavfasl pgflfstcyt 181 ernhtycktk yslnsttwkv lssleini lg lviplgimlf cysmiirtlq hckneknka 241 vkmifavvvl flgfwtpyni vlftletlvel evlqdcfer yldyaiqate tlaflvhccln 301 piyfflgek frkyilqlfk tcrglfvlcq ycgllqiysa dtpsssyts tmdhldhal
39	NM_001206609.1 Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий CLA	1 aatcatccga gaaccttga gggtggacag tgcccccttt acagatgaga aaactgaggc 61 ttgaagggga gaagcagctg cctctggcgg catggcttct ggctgcagga tgcccatgga 121 gtctgtgtg accctaggcc tgtgtctcgg cttcctttgc tgaacttgaa caggaagatg 181 gcagtggggg ccagtgtct agaaggagat aagatggctg gtgccatgcc tctgcaactc 241 ctctgttgc tgatcctact ggccctggc aacagcttgc agctgtggga cacctgggca 301 gatgaagccg agaaagcctt gggtcccctg cttgccggg accggagaca ggccaccgaa 361 tatgagtacc tagattatga tttcctgcca gaaacggagc

		ctccagaaat gctgaggaac		
421	agcactgaca ccactcctct	gactgggcct	ggaacccctg	
	agtctaccac tgtggagcct			
481	gctgcaaggc gttctactgg	cctggatgca	ggaggggcag	
	tcacagagct gaccacggag			
541	ctggccaaca tggggaacct	gtccaaggat	tcagcagcta	
	tggagataca gaccactcaa			
601	ccagcagcca cggaggcaca	gaccactcaa	ccagtgccca	
	cggaggcaca gaccactcca			
661	ctggcagcca cagaggcaca	gacaactcga	ctgacggcca	
	cggaggcaca gaccactcca			
721	ctggcagcca cagaggcaca	gaccactcca	ccagcagcca	
	cggagcaca gaccactcaa			
781	cccacaggcc tggaggcaca	gaccactgca	ccagcagcca	
	tggaggcaca gaccactgca			
841	ccagcagcca tggaagcaca	gaccactcca	ccagcagcca	
	tggaggcaca gaccactcaa			
901	accacagcca tggaggcaca	gaccactgca	ccagaagcca	
	cggaggcaca gaccactcaa			
961	cccacagcca cggaggcaca	gaccactcca	ctggcagcca	
	tggaggccct gtccacagaa			
1021	cccagtgccca cagaggccct	gtccatggaa	cctactacca	
	aaagaggtct gttcataccc			
1081	ttttctgtgt cctctgttac	tcacaagggc	attcccatgg	
	cagccagcaa ttgtccgtc			
1141	aactacccag tgggggcccc	agaccacatc	tctgtgaagc	
	agtgcctgct ggccatccta			
1201	atcttggcgc tggtagccac	tatcttcttc	gtgtgcaactg	
	tggtagctggc ggtccgctc			
1261	tcccgaagg gccacatgta	ccccgtgcgt	aattactccc	
	ccaccgagat ggtctgcac			
1321	tcacccctgt tgctgatgg	gggtgagggg	ccctctgccca	
	cagccaatgg gggcctgtcc			
1381	aaggccaaga gcccgggcct	gacgccagag	cccagggagg	
	accgtgaggg ggatgacctc			
1441	accctgcaca gcttcctccc	ttagctcact	ctgccatctg	
	ttttggcaag accccacctc			

1501	cacgggctct cctgggccac	cctgagtg	ccagaccca
	ttccacagct ctgggcttcc		
1561	tcggagaccc ctggggatgg	ggatcttcag	ggaaggaact
	ctggccaccc aaacaggaca		
1621	agagcagcct ggggccaagc	agacgggcaa	gtggagccac
	ctctttcctc cctccgcgga		
1681	tgaagcccag ccacatttca	gccgaggtcc	aaggcaggag
	gccatttact tgagacagat		
1741	tctctccttt ttctgtccc	ccatcttctc	tgggtccctc
	taacatctcc catggtctc		
1801	ccgcttctc ctgggtcactg	gagtctcctc	cccatgtacc
	caaggaagat ggagctcccc		
1861	catccacac gcactgcact	gccattgtct	tttggttgcc
	atggtcacca aacaggaagt		
1921	ggacattcta agggaggagt	actgaagagt	gacggacttc
	tgaggctgtt tctgtctgt		
1981	cctctgactt ggggcagctt	gggtcttctt	gggcacctct
	ctgggaaaac ccagggtgag		
2041	gttcagcctg tgagggtctg	gatgggtttc	gtgggcccac
	gggcagacct ttctttggga		
2101	ctgtgtggac caaggagctt	ccatctagt	acaagtgacc
	cccagctatc gcctcttgcc		
2161	ttccctgtg gccactttcc	aggggtggact	ctgtcttggt
	cactgcagta tcccaactgc		
2221	aggtccagt caggcaataa	atatgtgatg	gacaaaacgat
	agcggaatcc ttcaagggtt		
2281	caaggctgtc tccttcaggc	agccttccc	gaattctcca
	tcctcagtg caggatggg		
2341	gctggtcctc agctgtctgc	cctcagcccc	tggcccccca
	ggaagcctct ttcattgggt		
2401	gttaggttga cttcagtttt	gcctcttgga	caacaggggg
	tcttgtagat ccttgggtga		
2461	ccaggaaaag ttcaggctat	ggggggccaa	agggagggct
	gccccttccc caccagtgc		
2521	cactttattc cacttctctc	attaccag	tttgccccac
	agagtttggg cccccccaaa		
2581	cctcggacca atatccctct	aaacatcaat	ctatcctcct

		gttaaagaaa aaaaaaaaa			
40	NM_003006.4 Типовая последовательность нуклеиновых кислот, кодирующая человеческий CLA	1	acacacagcc attgggggtt gctcggatcc gggactgccg caggggggtgc cacagcagtg		
		61	cctggcagcg tgggctggga ccttgctact aaagcagaga agccacttct tctgggcca		
		121	cgaggcagct gtcccatgct ctgctgagca cggtggtgcc atgcctctgc aactcctcct		
		181	gttgctgac ctactgggcc ctggcaacag cttgcagctg tgggacacct gggcagatga		
		241	agccgagaaa gccttgggtc ccctgcttgc ccgggaccgg agacaggcca ccgaatatga		
		301	gtacctagat tatgatttcc tgccagaaac ggagcctcca gaaatgctga ggaacagcac		
		361	tgacaccact cctctgactg ggcttggaa ccttgagtct accactgtgg agcctgctgc		
		421	aaggcgttct actggcctgg atgcaggagg ggcagtcaca gagctgacca cggagctggc		
		481	caacatgggg aacctgtcca cggattcagc agctatggag atacagacca ctcaaccagc		
		541	agccacggag gcacagacca ctcaaccagt gccacggag gcacagacca ctccactggc		
		601	agccacagag gcacagacaa ctcgactgac ggccacggag gcacagacca ctccactggc		
		661	agccacagag gcacagacca ctccaccagc agccacggaa gcacagacca ctcaaccac		
		721	aggcctggag gcacagacca ctgcaccagc agccatggag gcacagacca ctgcaccagc		
		781	agccatggaa gcacagacca ctccaccagc agccatggag gcacagacca ctcaaacccac		
		841	agccatggag gcacagacca ctgcaccaga agccacggag gcacagacca ctcaaacccac		
		901	agccacggag gcacagacca ctccactggc agccatggag gccctgtcca cagaaccacg		
		961	tgccacagag gccctgtcca tggaacctac taccaaaaga ggctctgttca tacccttttc		
		1021	tgtgtcctct gttactcaca agggcattcc catggcagcc		

	agcaatttgt cegtcaacta		
1081	cccagtgagg gccccagacc	acatctctgt	gaagcagtg
	ctgctggcca tcctaattct		
1141	ggcgctggtg gccactatct	tcttcgtgtg	cactgtggtg
	ctggcgggtcc gctctcccg		
1201	caagggccac atgtaccccg	tgcgtaatta	ctccccacc
	gagatggtct gcattctatc		
1261	cctgttgctt gatgggggtg	aggggccctc	tgccacagcc
	aatggggggc tgtccaaggc		
1321	caagagcccg ggcctgacgc	cagagcccag	ggaggaccgt
	gagggggatg acctcaccct		
1381	gcacagcttc ctcccttagc	tcactctgcc	atctgttttg
	gcaagacccc acctccacgg		
1441	gtctctctgg gccacccctg	agtcccaga	ccccattcca
	cagctctggg ctctctcgga		
1501	gacccctggg gatggggatc	ttcagggaag	gaactctggc
	cacccaaaca ggacaagagc		
1561	agcctggggc caagcagacg	ggcaagtgga	gccacctctt
	tcctccctcc gcggatgaag		
1621	cccagccaca tttcagccga	ggtccaaggc	aggaggccat
	ttacttgaga cagattctct		
1681	ccttttttct gtccccatc	ttctctgggt	ccctctaaca
	ttctccatgg ctctcccg		
1741	ttctctggtt cactggagtc	tcctcccat	gtaccaagg
	aagatggagc tccccatcc		
1801	cacacgcact gcactgcat	tgtcttttgg	ttgcatggt
	caccaaacag gaagtggaca		
1861	ttctaaggga ggagtactga	agagtgcagg	acttctgagg
	ctgtttctct ctgctctct		
1921	gacttggggc agcttgggtc	ttcttgggca	cctctctggg
	aaaaccaggt gtgaggttca		
1981	gcctgtgagg gctgggatgg	gttctgtggg	cccaagggca
	gacctttctt tgggactgtg		
2041	tggaaccaag agcttccatc	tagtgacaag	tgacccccag
	ctatcgctc ttgccttccc		
2101	ctgtggccac tttccagggt	ggactctgtc	ttgttcaact
	cagtatcca actgcaggtc		

		2161 cagtgcaggc aataaatatg tgatggacaa acgatagcgg aatccttcaa ggtttcaagg 2221 ctgtctcctt caggcagcct tcccgaatt ctccatccct cagtgcagga tgggggctgg 2281 tcctcagctg tctgccctca gcccttgccc cccaggaag cctctttcat gggctgttag 2341 gttgacttca gttttgcctc ttggacaaca gggggtcttg tacatccttg ggtgaccagg 2401 aaaagttcag gctatggggg gccaaaggga gggctgcccc ttccccacca gtgaccactt 2461 tattccactt cctccattac ccagttttgg cccacagagt ttgggtcccc ccaaacctcg 2521 gaccaatatc cctctaaaca tcaatctatc ctctgttaa agaaaaaaaa aaa
41	NP_0011935 38.1 Типовая последовательность аминокислот для предшественника человеческого CLA	1 mavgasleg dkmagamlq llllllllp gnsllqldtw adeaekalgp llardrrgat 61 eyeyldydfi peteppemlr nstdtptltg pgtpesttve paarrstgld aggavteltt 121 elanmgnlst dsaameiqtt qpaateaqt qvppteaqtt plaateaqt rltateaqt 181 plaateaqt ppaateaqt qptgleaqt apaameaqt apaameaqt ppaameaqt 241 qttameaqt apeateaqt qptateaqt plaamealst epsatealsm epttkrglfi 301 pfsvssvthk gipmaasnls vnypvgapdh isvkqcllai lilalvatif fvctvvlavr 361 lsrkghmypv rnysptemvc issllpdgge gpsatanggl skakspgltp epredregdd 421 ltlhsflp
42	NP_002997. 2 Типовая последовательность аминокислот для	1 mplqllllli llpggnsllq wdwadeaek algpllardr rqateyeyld ydfipetep 61 emlrnstdtt pltgpgtpes ttvepaarrs tgldaggavt elttelanmg nlstdsaame 121 iqtqpaaate aqttqpvppte aqttplaate aqtrltate aqttplaate aqttppaate 181 aqttqptgle aqttapaame aqttapaame aqttppaame
	предшественника человеческого CLA	aqttqtame aqttapeate 241 aqttqtate aqttplaame alstepsate alsmepttkr glfipfsvss vthkgipmaa 301 snlsvnypvg apdhisvkqc llaililalv atiffvctvv lavrlsrkgh myprnyspt 361 emvcissllp dggegpsata ngglskasp gltpepredr egddltlshf lp

5.3.6. Полинуклеотид для генерации CAR и/или хоминг-рецептора.

В настоящем изобретении описаны полинуклеотидные последовательности (т.е. последовательности нуклеиновых кислот), которые кодируют химерные рецепторы и хоминг-рецепторы. Полинуклеотиды могут содержаться в пределах любого полинуклеотидного вектора, подходящего для трансформации иммунных клеток, например, NK-клеток. Например, NK-клетки могут быть трансформированы с применением синтетических векторов, лентивирусных или ретровирусных векторов, автономно реплицирующихся плазмид, вируса (например, ретровируса, лентивируса, аденовируса или вируса герпеса) и т.п., содержащих полинуклеотиды, кодирующие первый и второй полипептиды (например, химерные рецепторы). Лентивирусные векторы, подходящие для трансформации NK-клеток, включают, но не ограничены указанным, например, лентивирусные векторы, описанные в патентах США № 5994136; 6165782; 6428953; 7083981 и 7250299, раскрытия которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте. Векторы ВИЧ, подходящие для трансформации NK-клеток, включают, но не ограничены ука-

занным, например векторы, описанные в патенте США № 5665577, изобретение которого включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте.

Нуклеиновые кислоты, пригодные для продуцирования полипептидов, описанных в настоящем раскрытии, например, в пределах НК-клетки включают ДНК, РНК или аналоги нуклеиновых кислот. Аналоги нуклеиновых кислот могут быть модифицированы в основном компоненте, сахарном компоненте или фосфатном остове и могут содержать замену дезоксиуридина на дезокситимидин, 5-метил-2'-дезокситимидин или замену 5-бромо-2'-дезокситимидина на дезокситимидин. Модификации сахарного компонента могут включать в себя модификацию 2'-гидроксила сахара рибозы с формированием 2'-О-метил или 2'-О-аллил сахаров. Дезоксирибозный фосфатный остов может быть модифицирован с целью получения морфолино нуклеиновых кислот, в которых каждый основной компонент соединен с 6-членным морфолино-кольцом, или пептидных нуклеиновых кислот, в которых дезоксифосфатный остов заменен на псевдопептидный остов, и четыре основания сохраняются. См., например, Summerton and Weller (1997), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:187-195; и Нугур и соавт. (1996), *Bioorgan. Med. Chain.* 4:5-23. Кроме того, дезоксифосфатный остов может быть заменен, например, на тиофосфатный или дитиофосфатный остов, фосфороамидатный или алкил-фосфотриэфирный остов.

Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, описанный в настоящем раскрытии, может быть введена в клетки-хозяева как часть вектора, такого как, например, экспрессионный вектор. Кроме того, полипептид, описанный в настоящем раскрытии, может быть продуцирован посредством трансфицирования клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, кодирующей такой полипептид, и такая нуклеиновая кислота может являться частью вектора. В конкретном варианте осуществления вектор представляет собой экспрессионный вектор, который способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, описанный в настоящем раскрытии. Неограничивающие примеры экспрессионных векторов включают в себя, но не ограничены указанным, плазмиды и вирусные векторы, такие как дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, вирус псевдоочумы, вирус корьей оспы и бакуловирусы. Стандартные методики молекулярной биологии могут применяться для введения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, описанный в настоящем раскрытии, в экспрессионный вектор.

Экспрессионный вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, описанный в настоящем раскрытии, в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине или не являющемся человеком субъекте. В конкретном варианте осуществления экспрессионный вектор содержит одну или более регуляторных последовательностей, выбранных на основе клеток-хозяев, которые будут использоваться для экспрессии, которые являются функционально связанными с нуклеиновой кислотой, которая должна быть экспрессирована. В пределах описания экспрессионного вектора предполагается, что термин "функционально связанный" означает, что интересующая нуклеиновая кислота связана с регуляторной(ыми) последовательность(ями) таким образом, который позволяет осуществлять экспрессию нуклеиновой кислоты (например, в системе транскрипции/трансляции *in vitro* или в клетке-хозяине, когда вектор вводится в клетку-хозяина). Регуляторные последовательности включают в себя промоторы, энхансеры и другие управляющие экспрессией элементы (например, сигналы полиаденилирования). Регуляторные последовательности включают последовательности, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеиновой кислоты во многих типах клеток-хозяев, последовательности, которые направляют экспрессию нуклеиновой кислоты только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности), и последовательности, которые направляют экспрессию нуклеиновой кислоты после стимуляции конкретным средством (например, индуцибельные регуляторные последовательности). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конструкция экспрессионного вектора может зависеть от таких факторов, как, например, выбор клетки-хозяина, которая будет подвергнута трансформации, уровень экспрессии требуемого белка и т.д.

Экспрессионный вектор может быть введен в клетки-хозяева через обычные методики трансформации или трансфекции. Такие методики включают в себя, но не ограничены указанным, соосаждение фосфатом кальция или хлоридом кальция, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, липофекцию и электропорацию.

Соответствующие способы для трансформирования или трансфекции клеток-хозяев можно найти в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, New York и в других лабораторных справочниках. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин подвергается транзientной трансфекции экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, описанный в настоящем раскрытии. В других вариантах осуществления клетка-хозяин подвергается стабильной трансфекции экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, описанный в настоящем раскрытии.

Клетки, содержащие любой полинуклеотид, могут быть выбраны с использованием одного или более селективируемых маркеров.

5.4. Способы лечения гематологических нарушений или солидных опухолей.

В настоящем изобретении представлены способы лечения гематологического нарушения или солидной опухоли с применением НК-клеток или генетически модифицированных НК-клеток (например,

НК-клеток, содержащих CAR и/или хоминг-рецептор), в соответствии с описанным выше.

5.4.1. Комбинированная терапия НК.

В одном из аспектов, представленных в настоящем раскрытии, способы лечения гематологического нарушения или солидной опухоли у нуждающегося в этом субъекта включают в себя:

(а) введение указанному субъекту изолированной популяции естественных клеток-киллеров (НК) или фармацевтической композиции с ней или изолированной популяции генетически модифицированных НК-клеток (например, НК-клеток, содержащих CAR и/или хоминг-рецептор) или фармацевтической композиции с ней; и

(б) введение указанному субъекту второго средства или фармацевтической композиции с ним. Второе средство может представлять собой любое фармацевтически приемлемое средство, которое может применяться для лечения гематологического нарушения или солидной опухоли, и включает, но не ограничено указанным, антитело (например, моноклональное антитело), биспецифичный активатор клеток-киллеров (BiKE), противовоспалительное средство, иммуномодулирующее средство (например, иммуномодулирующее соединение в соответствии с описанным в разделе 5.2.7.1), цитотоксическое средство, вакцину против рака, химиотерапевтическое средство, ингибитор HDAC или мПНК.

5.4.1.1. Комбинации НК с антителами.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

При использовании в настоящем изобретении термины "антитело", и "иммуноглобулин", и "Ig" являются терминами данной области техники и могут использоваться взаимозаменяемо в настоящем изобретении и относятся к молекуле с сайтом связывания антигена, который специфично связывает антиген.

Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, рекомбинантно продуцированные антитела, моноспецифичные антитела, мультиспецифичные антитела (включая биспецифичные антитела), человеческие антитела, гуманизированные антитела, такие как композитные человеческие антитела или деиммунизированные антитела, мышинные антитела (например, антитела мыши или крысы), химерные антитела, синтетические антитела и тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелых цепи и две молекулы легкой цепи. В конкретных вариантах осуществления антитела могут включать в себя, но не ограничены указанным, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела, внутриклеточные антитела, гетероконъюгатные антитела, однодоменные антитела и моновалентные антитела. В конкретном варианте осуществления антитела могут включать в себя антигенсвязывающие фрагменты или эпитопсвязывающие фрагменты, такие как, но не ограниченные указанным, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv) (например, включая моноспецифичные, биспецифичные и т.д.), камелизированные антитела, аффитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты F(ab')₂ и дисульфид-связанные Fv (sdFv). В конкретных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем раскрытии, относятся к моноклональным антителам.

Антитела могут иметь любой тип (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любой класс (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ или IgA₂) или любой подкласс (например, IgG_{2a} или IgG_{2b}) молекулы иммуноглобулина. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем раскрытии, являются антителами IgG или их классом (например, человеческий IgG₁, IgG₂ или IgG₄) или подклассом. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем раскрытии, являются антителами IgG₂ (например, человеческими IgG₂) или их подклассом (например, человеческими IgG_{2a}, или человеческими IgG_{2b}, или их смесью). В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем раскрытии, являются антителами IgG₁ (например, человеческими IgG₁) или их подклассом. В определенных вариантах осуществления антитела IgG₁, описанные в настоящем раскрытии, содержат одну или более аминокислотных замен и/или делеций в константной области.

При использовании в настоящем изобретении термин "моноклональное антитело" является термином, хорошо известным в технике, который относится к антителу, полученному из популяции гомогенных или по существу гомогенных антител. Термин "моноклональное" не ограничен каким-либо конкретным способом создания антитела. Обычно популяция моноклональных антител может генерироваться клетками, популяциями клеток или клеточной линией. В конкретных вариантах осуществления "моноклональное антитело" при использовании в настоящем изобретении является антителом, продуцированным единственной клеткой или клеточной линией, при этом антитело иммуноспецифично связывается с эпитопом, что определяют, например, посредством ELISA или другой реакции связывания антигена или конкурентно-связывающим анализом, известным в технике. В конкретных вариантах осуществления моноклональное антитело может являться химерным антителом или гуманизированным антителом. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело является моновалентным антителом или поливалентным (например, бивалентным) антителом.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связывается с ассоциированным с опухолью антигеном (ТАА), который описывается в разделе 5.3.2. В дальнейшем конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CS-1. В более конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязы-

вающий фрагмент представляет собой элутузмаб или его антигенсвязывающий фрагмент. В дальнейшем конкретном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD20.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связывается с ассоциированным с микроокружением опухоли антигеном (ТМАО), который описывается в разделе 5.3.2.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связывается и противодействует активности белка иммунной контрольной точки. В более конкретных вариантах осуществления белок иммунной контрольной точки представляет собой CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 или LAG-3. В более конкретных вариантах относящийся к иммунной контрольной точке белок представляет собой BTLA, KIR, TIM-3, A2aR, B7-H3 или B7-H4. В других конкретных вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфично связывается и противодействует активности костимулирующего сигнального белка. В более конкретных вариантах осуществления костимулирующий сигнальный белок представляет собой ICOS, CD28, 4-1BB, OX40, CD27 или CD40.

5.4.1.2. Комбинации NK с биспецифичными активаторами клеток-киллеров.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой биспецифичный активатор клеток-киллеров (BiKE).

BiKE представляют собой реагенты, которые содержат два одноцепочечных вариабельных фрагмента (scFv) и специфично активируют как клетки-мишени (например, опухолевые клетки или инфицированные клетки), так и NK-клетки, с тем чтобы опосредовать уничтожение клеток-мишеней. Они применяются для локализации клеток-мишеней (например, опухолевых клеток или инфицированных клеток) с NK-клетками и, таким образом, запуска опосредованной NK-клетками антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC). BiKE могут генерироваться любым способом, известным в технике, например, в соответствии с описанным в Gleason, M.K., et al., *Mol Cancer Ther*, 11:2674-2684 (2012); Vallera, D.A., et al., *Cancer Biother Radiopharm*, 28:274-282 (2013); Wiernik, A., et al., *Clin Cancer Res*, 19:3844-3855 (2013); Reiners, K.S., et al., *Mol. Ther.*, 21:895-903 (2013); Singer, H., et al., *J. Immunother.*, 33:599-608 (2010); or Gleason, M.K., et al., *Blood*, 123:3016-3026 (2014). Один scFv BiKE специфично связывается с антигеном на поверхности клеток-мишеней (например, опухолевых клеток или инфицированных клеток), и другой scFv специфично связывается с рецептором (например, Fc-рецептором, таким как CD16) на клетках NK.

В конкретных вариантах осуществления BiKE содержит первый scFv, который специфично связывается с ТАА, который описывается в разделе 5.3.2. В дальнейших конкретных вариантах осуществления BiKE содержит второй scFv, который специфично связывается с CD16.

5.4.1.3. Комбинации NK с другими противораковыми средствами.

Другие противораковые средства, которые могут быть применены в качестве второго средства, известны в технике и включают в себя противовоспалительные средства, иммуномодулирующие средства, цитотоксические средства, вакцины против рака, химиотерапевтические средства, ингибиторы HDAC и мiРНК. Конкретные противораковые средства, которые могут быть введены индивиду, имеющему рак, например индивиду, имеющему опухолевые клетки, в дополнение к клеткам NK, продуцированным с применением способов, описанных в настоящем раскрытии, и, необязательно, перфузату, клеткам перфузата, естественным клеткам-киллерам, отличным от NK-клеток, продуцированных с применением способов, описанных в настоящем раскрытии, включают в себя, но не ограничены указанным, ацивизин; акларубин; акодазола гидрохлорид; акронин; адозелезин; алдеслейкин; альтретамин; амбомицин; амелантрона ацетат; амсакрин; анастрозол; антрамицин; аспарагиназу (например, из *Erwinia chrysae*; *Erwinaze*); асперлин; авастин (бевацизумаб); азацитидин; азетеп; азотомидин; батимастат; бензодепу; бикалутамид; бисантрена гидрохлорид; биснафид димезилат; бизелизин; блеомицина сульфат; бреквинар натрия; бропиримин; бусульфид; кактиномицин; калустерон; карацемид; карбетимера; целекоксиб (ингибитор COX-2); CC 122; CC 486 (оральный азацитидин); церубидин; хлорамбуфил; циролемицин; цисплатин; кладрибин; кризанола мезилат; циклофосфамид; цитарабин; дакарбазин; дактиномицин; даунорубицина гидрохлорид; децитабин; дексормеплатин; дезагуанин; дезагуанина мезилат; дизиквон; доцетаксел; доксорубин; доксорубицина гидрохлорид; дролоксифен; дролоксифена цитрат; дромостанолон пропионат; дуазомицин; эдтрексат; эфлорнитина гидрохлорида; элсамитруцин; элпар; энлоплатин; энпрома; эпипропидин; эпирубицина гидрохлорид; эрбулозол; эзрубицина гидрохлорид; эстрамустин; эстрамустина фосфата натрия; этанидазол; этопозид; этопозид фосфат; этропифос; этоприн; фадозола гидрохлорид; фазарабин; фенретирид; флоксурин; флударабина фосфат; фторурацил; флуороцитабин; фосвидон; фостриecin натрия; гемцитабин; гемцитабина гидрохлорид; гидроксимочевину; идамицин; идарубицина гидрохлорид; ифосфамид; илмофозин; ипроплатин; иринотекан; иринотекана гидрохлорид; ланретида ацетат; летрозол; лейпролида ацетат; лиарозола гидрохлорид; лометрексол натрия; ломустин; лозоксантрона гидрохлорид; мазопрокол; майтанзин; мехлоретамин гидрохлорид; мегестрола ацетат; меленгестрола ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрия; метоприн; метуредеп; митиндомид; митокарцин; митокромин; митогиллин; митомалцин; митомицин;

митоспер; митотан; митоксантрона гидрохлорид; микофенольную кислоту; нокодазол; ногаламицин; ормаплатин; оксисуран; паклитаксел; пегаспаргаза; пелиомицин; пентамустин; пепломицина сульфат; перфосфамид; пипоброман; пипосульфат; пироксантрона гидрохлорид; пликамицин; пломестан; порфимер натрия; порфирамицин; преднимустин; прокарбазин гидрохлорида; пролейкин; пуринетол; пуромицин; пуромицина гидрохлорид; пиразофури; ревматрекс; рибоприн; сафингол; сафингола гидрохлорид; семустин; симтазен; спарфосат натрия; спарсомицин; спирогермания гидрохлорид; спиромустин; спиролатин; стрептоницин; стрептозоцин; сулофенур; таблоид; тализомицин; текогалан натрия; таксотер; тегафур; телоксантрона гидрохлорид; темопорфин; тенипозид; тероксирон; тестолактон; тиамиприн; тиогуанин; тиотепу; тиазофури; тирапазамин; топозар; торемифена цитрат; трестолона ацетат; трексол; трицирибина фосфат; триметрексат; триметрексата глюкуроонат; трипторелина, тубулозола гидрохлорид; урамустин; уредепу; вапреотид; вертепорфин; винбластина сульфат; винкристина сульфат; виндезин; виндизина сульфат; винепидина сульфат; винглицината сульфат; винлеуризина сульфат; винорелбина тартрат; винрозидина сульфат; винзолидина сульфат; ворозол; зениплатин; зиностатин; зорубина гидрохлорид.

Другие препараты против рака включают в себя, но не ограничены указанным, 20-эпи-1,25-дигидроксивитамин D3; 5-этинилурацил; абиратерон; акларубин; ациофульвен; адеципенол; адозелезин; альдеслейкин, антагонисты ALL-TK; альтретамин; амбамустин; амидокс; амифостин; аминоклевулиновая кислота; амрубин; амсакрин; анагелид; анастрозол; андрографолид; ингибиторы ангиогенеза; антагонист D; антагонист G; антареликс; анти-дорсалинизирующий морфогенетический белок-1; антиандроген для карциномы простаты; антиэстроген; антинеопластон; антисмысловые олигонуклеотиды; афидиколина глицинат; модуляторы генов апоптоза; регуляторы апоптоза; апуриновую кислоту; ара-CDP-DL-PTBA; деаминазу аргинина; асулакрин; атаместан; атримустин; аксинастатин 1; аксинастатин 2; аксинастатин 3; азасетрон; азатоксин; азатиридин; производные баккатина; баланол; батимастат; антагонисты BCR/ABL; бензохлорины; бензоилстауроспорин; производные беталактама; бета-алетин; бетакламицин B; бетулиновую кислоту; ингибитор bFGF; бикалутамид; бисантрен; бисазиридинилспермин; биснафид; бистратен A; бизелизин; брелат; бропиримин; будотитан; бутионина сульфоксимин; кальцитриол; кальфостин C; камптозар (также называемый кампто; иринотекан); производные камптотецина; капецитабин; карбоксамидаминотриазол; карбоксиамидотриазол; CaRest M3; CARN 700, ингибитор, полученный из хряща; карзелизин; ингибиторы казеинкиназы (ICOS); кастаноспермин; цекропин B; цетрореликс; хлорины; хлорквиноксалина сульфонамид; цикапрост; цис-порфирин; кладрибин; аналоги кломифена; клотримазол; коллисмидин A; коллисмидин B; комбрестатин A4; аналог комбрестатина; конагенин; крамбесцидин 816; кризнатол; криптофицин 8; производные криптофицина A; курацин A; циклопентантраквиноны; циклоплатам; ципемидин; цитарабина оксифосфат; цитолитический фактор; цитостатин; дакликсимаб; децитабин; дегидродидемнин B; деслорелин; дексаметазон; дексифосфамид; декстрозоксан; дексерапамил; диазиквон; дидемнин B; дидокс; диэтилнорспермин; дигидро-5-азацитидин; дигидротаксола, 9-; диоксамицин; дифенилспиромустин; доцетаксел; докозанол; долазетрон; доксифлуридин; доксорубин; дролоксифен; дронабинол; дуокармицин SA; эбзелен; экомустин; эдельфозин; эдрекломаб; эфлорнитин; элемен; эмитефур; эпирубицин; эпиристерид; аналог эстрамустин; агонисты эстрогена; антагонисты эстрогена; этанидазол; этопозида фосфат; экземестан; фадрозол; фазарабин; фенретирид; филграстин; финастерид; флавопиртдол; флезеластин; флаустерон; флударабин; фтордаунорубина гидрохлорид; форфенимекс; форместан; фостриецин; фотемустин; гадолиния тексафирин; галлия нитрат; галоцитабин; ганиреликс; ингибиторы желатиназы; гемцитабин; ингибиторы глутатиона; гепсульфам; герегулин; гексаметилен бисацетамид; гиперин; ибандроновая кислота; идарубин; идоксифен; идрамантон; илмофозин; иломастат; иматиниб (например, гливек®); имиквимод; иммуностимулирующие пептиды; ингибитор инсулиноподобного рецептора фактора роста-1; агонисты интерферона; интерфероны; интерлейкины; йобенгуан; йододоксорубин; ипомеанол, 4-ипролакт; ирсогладин; изобенгазол; изогомогаликондрин B; итазетрон; ясплакинолид; кагалалид F; ламелларина-N триацетат; ланреотид; лейнамицин; ленограстин; лентинана сульфата, лептолстатин; летрозол; ингибирующий фактор лейкемии; альфаинтерферона лейкоцит; лейпролид⁺эстроген⁺прогестерон; лейпрорелин; левамизол; лиарозол; аналог линейного полиамина; липофильный дисахаридный пептид; липофильные соединения платины; лиссоклинамид 7; лобоплатин; ломбрицин; лометрексол; лонидамин; лозоксантрон; локсорибин; луртотекан; лутетия тексафирин; лизофиллин; литические пептиды; майтанзин; манностатин A; маримастат; мазопрокол; маспин; ингибиторы матрилизина; ингибиторы матрицы металлопротеиназы; меногарил; мербарон; метерелин; метиониназа; метоклопрамид; ингибитор MIF; мифепристон; милтефозин; миримостим; митоквазон; митолактон; аналоги митомицина; митонафид; фактор роста митотоксина фибробласта-сапорин; митоксантрон; мофаротен; молграмостим; антитело против EGFR (например, эрбитукс(цетуксимаб)); антитело против CD19; антитело против CD20 (например, ритуксимаб); антитело против дизиалоганглиозида (GD2); антитело (например, моноклональное антитело, 3F8 или ch14>18); антитело против ErbB2 (например, герцептин); хорионический гонадотропин человека; монофосфорил липид A⁺миобактериальная клеточная стенка sk; мопидамол; горчичное противораковое средство; микапероксид B; экстракт стенки микобактериальной клетки; мирапороп; N-ацетилдиналин; N-замещенные бензамиды; нафарелин; нагрестип; налоксон⁺пентазоцин; напавин; нафтерпин; нартограстин; недапла-

тин; неморубицин; неридроновую кислоту; нилутамид; нихамицин; модуляторы оксида азота; антиоксидант нитроксида; нитруллин; облимерсен (дженасенс®); O⁶-бензилгуанин; октреотид; окиценон; олигонуклеотиды; онапристон; онданзетрон; онданзетрон; орацин; пероральный индуктор цитокинов; ормаплатин; озатерон; оксалиплатин (например, флоксатин); оксауномицин; паклитаксел; аналоги паклитаксела; производные паклитаксела; палауамин, пальмитоилризоксин; памидроновую кислоту; панакситриол; паномифен; парабактин; пазеллиптин; пегаспаргаза; пелдезин; пентозана полисульфат натрия; пентостатин; пентрозол; перфлуброн; перфосфамид; периллиловый спирт; феназиномицин; фенилацетат; ингибиторы фосфатазы; пицибанил; пилокарпина гидрохлорид; пирарубицин; пиритрексим; плацетин А; плацетин В; ингибитор активатора плазминогена; комплекс платины; соединения платины; комплекс платина-триамин; порфирин натрия; порфирамицин; преднизон; бис-акридон пропил; простагландин J2; ингибиторы протеасомы; иммунный модулятор на основе протеина А; ингибитор протеинкиназы С; ингибиторы протеинкиназы С; микроводоросли; ингибиторы протеинтирозинфосфатазы; ингибиторы пуриннуклеозидфосфорилазы; пурпурины; пиразолоакридин; конъюгат пиридоксильированного гемоглобина и полиоксиптилена; антагонисты α_1 ; ралтитрексед; рамозетрон; ингибиторы α_1 фарнезилпротеинтрансферазы; ингибиторы α_1 ; ингибитор α_1 -GAP; деметилированный ретеллиптин; этидронат рения Re 186; ризоксин; рибозимы; RII ретинамид; рохитукин; ромуртид; роквинимекс; рубигинин B1; рубоксил; сафингол; саинтопин; SarCNU; саркофитол А; сарграмостим; миметики Sdi 1; семустин; ингибитор 1, полученный при старении; смысловые олигонуклеотиды; ингибиторы трансдукции сигналов; сизофран; собузоксан; борокапат натрия; фенилацетат натрия; солверол; белок связывания соматомедина; сонермин; спарфозиновую кислоту; спикамицин D; спиромустин; спленопентин; спонгистатин 1; скваламин; стипиамид; ингибиторы стромелизина; сульфинозин; антагонист суперактивного вазоактивного кишечного пептида; сурадисту; сурамин; свайнзонин; таллимустин; тамоксифена метиодид; тауромустин; тазаротен; текогалан натрия; тегафур; теллурапирилий; ингибиторы теломеразы; темпорфин; тенипозид; тетрахлордекаоксид; тетразомин; талибластин; тиокоралин; тромбопоэтин; миметики тромбопоэтина; тималфазин; агонист рецептора тимопоэтина; тимотринан; гормон, стимулирующий щитовидную железу; этиопурпурин этила олова; тирапазамин; титаноцена бихлорид; топсентин; торемифен; ингибиторы трансляции; третиноин; триацетилюридин; трицирибин; триметрексат; трипторелин; тропизетрон; туростерид; ингибиторы тирозинкиназы; тирфостины; ингибиторы UBC; убенимекс; ингибирующий фактор роста, полученный из урогенитальной системы; антагонисты рецепторов урокиназы; вапреотид; вариолин В; вектибикс(панитумумаб); веларезол; верамин; вердины; вертепорфин; винорелбин; винксалтин; витаксин; ворозол; велковорин (лейковорин); кселоду (капецитабин); занотерон; зениплатин; зиласкорб и зиностатина стимуламер.

В конкретном варианте осуществления противораковым средством, которое вводят в качестве второго средства, является талидомид, леналидомид, помалидомид, CC-122, азациитидин, децитабин или CC-486 (пероральный азациитидин). В более конкретном варианте осуществления противораковым средством, которое вводят в качестве второго средства, является леналидомид или помалидомид. В конкретном варианте осуществления противораковым средством, которое вводят в качестве второго средства, является иммуномодулирующее соединение (например, иммуномодулирующее соединение в соответствии с описанным в разделе 5.2.7.1). В конкретном варианте осуществления противораковым средством, которое вводят в качестве второго средства, является ромидеписин.

5.4.2. Лечение с применением генетически модифицированных НК-клеток.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения гематологического нарушения или солидной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение указанному субъекту изолированной популяции НК-клеток или фармацевтической композиции с ней, при этом НК-клетки являются генетически модифицированными (например, содержат химерный антигенный рецептор (CAR) и/или хоминг-рецептор, при этом указанный CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и, необязательно, костимулирующий домен).

Генетически модифицированные НК-клетки (например, НК-клетки, содержащие CAR и/или хоминг-рецептор) описаны в разделе 5.3.

5.4.3. Гематологические нарушения и солидные опухоли.

В конкретных вариантах осуществления гематологическое нарушение представляет собой гематологическое гиперпролиферативное нарушение. В конкретных вариантах осуществления гематологическое нарушение представляет собой гематологический рак, например лейкемию или лимфому. В более конкретных вариантах осуществления гематологический рак представляет собой острый лейкоз, например острый Т-клеточный лейкоз, острый миелогенный лейкоз (AML), острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый мегакариобластический лейкоз, острый лимфобластный лейкоз В-предшественников, острый лимфобластный лейкоз Т-предшественников, лейкоз Беркитта (лимфома Беркитта) или острый бифенотипический лейкоз; хронический лейкоз, например хроническая миелоидная лимфома, хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический моноцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL)/лимфома из малых лимфоцитов или В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; волосатоклеточная лимфома; Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз или лимфома, напри-

мер гистиоцитарная лимфома, лимфоплазмочитарная лимфома (например, макроглобулинемия Вальден-стрема), лимфома маргинальной зоны селезенки, неоплазия плазматических клеток (например, миеломная болезнь плазматических клеток, плазмоцитомы, болезнь депонирования моноклонального иммуноглобулина или болезнь тяжелых цепей), экстранодальная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны (лимфома MALT), нодальная В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны (NMZL), фолликулярная лимфома, лимфома из клеток мантии, диффузная В-крупноклеточная лимфома, средостенная (тимусная) В-крупноклеточная лимфома, внутрисосудистая В-крупноклеточная лимфома, первичная выпотная лимфома, Т-клеточный лейкоз из больших гранулированных лимфоцитов, агрессивный НК-клеточный лейкоз, Т-клеточный лейкоз/лимфома взрослых, экстранодальная НК/Т-клеточная лимфома, носовой тип, Т-клеточный лейкоз энтеропатического типа, Т-клеточная лимфома печени и селезенки, бластическая НК-клеточная лимфома, фунгоидный микоз (синдром Сезари), первичное CD30-положительное кожное Т-клеточное лимфопролиферативное нарушение (например, первичная кожная анапластическая крупноклеточная лимфома или лимфоматоидный папулез), ангиоиммунобластическая Т-клеточная лимфома, периферическая Т-клеточная лимфома, неопределенная, анапластическая крупноклеточная лимфома, лимфома Ходжкина или нодулярная с лимфоидным преобладанием лимфома Ходжкина. В другом конкретном варианте осуществления гематологический рак представляет собой острый миелогенный лейкоз (AML).

В другом конкретном варианте осуществления гематологический рак представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL). В другом конкретном варианте осуществления гематологический рак представляет собой множественную миелому или миелодиспластический синдром.

Солидная опухоль может представлять собой, но не ограничена указанным, например, карциному, такую как аденокарцинома, аденокортикальная карцинома, аденокарцинома толстой кишки, колоректальная аденокарцинома, колоректальная карцинома, карцинома дуктальных клеток, карцинома легкого, карцинома щитовидной железы, носоглоточная карцинома, меланома (например, злокачественная меланома), не являющаяся меланомой карцинома кожи или неопределенная карцинома; десмоидная опухоль; десмопластическая мелкокруглоклеточная опухоль; эндокринная опухоль; саркома Юинга; эмбрионально-клеточная опухоль (например, тестикулярный рак, овариальный рак, хориокарцинома, опухоль эндодермального синуса, герминома и т.д.); гепатобластома; гепатоцеллюлярная карцинома; нейробластома; не являющаяся рабдомиосаркомой саркома мягкой ткани; остеогенная саркома; ретинобластома; рабдомиосаркома; или опухоль Вильмса.

В другом варианте осуществления солидная опухоль представляет собой рак поджелудочной железы или рак молочной железы. В других вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой акустическую неврину; астроцитому (например, пилоидная астроцитома I степени, слабовыраженная астроцитома II степени; анапластическая астроцитома III степени или мультиформная глиобластома IV степени); хордому; краниофарингиому; глиому (например, глиома ствола мозга; эпендимому; смешанная глиома; глиома зрительного нерва или подэпендимому); глиобластому; медуллобластому; менингиому; метастатическую опухоль головного мозга; олигодендроглиому; пинеобластому; гипофизарную опухоль; примитивную нейроэктодермальную опухоль или шванному. В другом варианте осуществления солидная опухоль представляет собой рак простаты.

В определенных вариантах осуществления индивид, имеющий гематологический рак или солидную опухоль, например индивид, имеющий недостаток естественных клеток-киллеров, является индивидом, который подвергался трансплантации костного мозга до указанного введения. В определенных вариантах осуществления трансплантат костного мозга подвергался лечению указанного гематологического рака или указанной солидной опухоли. В определенных других вариантах осуществления трансплантат костного мозга подвергался лечению состояния, отличного от указанного гематологического рака или указанной солидной опухоли. В определенных вариантах осуществления индивид получал иммунодепрессант в дополнение к указанному трансплантату костного мозга. В определенных вариантах осуществления индивид, который подвергался трансплантации костного мозга, демонстрирует один или более симптомов реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD) во время указанного введения. В определенных других вариантах осуществления индивиду, который подвергался трансплантации костного мозга, вводят указанные клетки до того, как проявился симптом реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD).

В определенных конкретных вариантах осуществления индивид, имеющий гематологический рак или солидную опухоль, получил по меньшей мере одну дозу ингибитора TNF α , например этанерцепта® (Enbrel), до указанного введения. В конкретных вариантах осуществления указанный индивид получал указанную дозу ингибитора TNF α в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев после диагностирования указанного гематологического рака или указанной солидной опухоли. В конкретном варианте осуществления индивид, который получил дозу ингибитора TNF α , демонстрирует острый миелоидный лейкоз. В более конкретном варианте осуществления индивид, который получил дозу ингибитора TNF α и демонстрирует острый миелоидный лейкоз, также имеет делецию длинного плеча хромосомы 5 в клетках крови. В другом варианте осуществления индивид, имеющий гематологический рак или солид-

ную опухоль, например рак крови, имеет филадельфийскую хромосому.

В определенных других вариантах осуществления гематологический рак или солидная опухоль у указанного индивида являются невосприимчивыми к одному или более лекарственным препаратам против рака. В конкретном варианте осуществления гематологический рак или солидная опухоль являются невосприимчивыми к гливеку® (иматиниба мезилат).

В определенных вариантах осуществления гематологический рак или солидная опухоль у указанного индивида отвечает по меньшей мере на один лекарственный препарат против рака; в этом варианте осуществления плацентарный перфузат, изолированные клетки плацентарного перфузата, изолированные естественные клетки-киллеры, например плацентарные естественные клетки-киллеры, например полученные из плаценты промежуточные естественные клетки-киллеры, изолированные объединенные естественные клетки-киллеры или активированные NK- или TSPNK-клетки, описанные в настоящем раскрытии, и/или комбинации указанного и, необязательно, иммуномодулирующее соединение (например, иммуномодулирующее соединение в соответствии с описанным в разделе 5.2.7.1) добавляют в качестве вспомогательной терапии или в качестве комбинированной терапии с указанным лекарственным препаратом против рака. В определенных других вариантах осуществления индивид, имеющий гематологический рак или солидную опухоль, подвергался лечению по меньшей мере одним лекарственным препаратом и имел рецидив до указанного введения. В определенных вариантах осуществления индивид, который будет подвергаться лечению, имеет невосприимчивый рак. В одном из вариантов осуществления способ лечения рака с применением клеток, описанных в настоящем раскрытии, защищает (например, предотвращает или задерживает) от рецидива рака. В одном из вариантов осуществления способ лечения рака, описанный в настоящем раскрытии, приводит к ремиссии рака в течение 1 месяца или более, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или более, 1 года или более, 2 лет или более, 3 лет или более или 4 лет или более.

В определенных вариантах осуществления NK-клетки изолируют из опухолевого очага, например представляют собой проникающие в опухоль лимфоциты; такие NK-клетки, как ожидают, будут являться специфичными для ассоциированного с опухолью антигена (ТАА) или ассоциированного с микроокружением опухоли антигена (ТМАА).

В одном из вариантов осуществления, представленном в настоящем раскрытии, способ лечения индивида, имеющего множественную миелому, включает в себя введение индивиду (1) леналидомида или помалидомида и (2) CAR NK-клеток, при этом указанные CAR NK-клетки являются эффективными для лечения множественной миеломы у указанного индивида. В конкретном варианте осуществления указанные CAR NK-клетки представляют собой NK-клетки пуповинной крови или NK-клетки, продуцированные из гематопозитических клеток пуповинной крови, например, стволовых гематопозитических клеток. В другом варианте осуществления указанные CAR NK-клетки были продуцированы посредством двух- или трехэтапного способа, описанного в настоящем изобретении для продуцирования NK-клеток. В другом варианте осуществления указанные леналидомид или помалидомид и CAR NK-клетки вводят отдельно друг от друга. В определенных конкретных вариантах осуществления способа лечения индивида с множественной миеломой указанные CAR NK-клетки содержат внеклеточный домен CAR, и этот внеклеточный домен представляет собой связывающий CS-1 домен. В конкретных вариантах осуществления связывающий CS-1 домен содержит scFv или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое связывает CS-1. В определенных конкретных вариантах осуществления связывающий CS-1 домен содержит одноцепочечную версию элутузамаба и/или антигенсвязывающего фрагмента элутузамаба.

В одном из вариантов осуществления, представленном в настоящем раскрытии, способ лечения индивида, имеющего множественную миелому, включает в себя введение индивиду (1) леналидомида или помалидомида; (2) элутузамаба и (3) CAR NK-клеток, при этом указанные CAR NK-клетки являются эффективными для лечения множественной миеломы у указанного индивида. В конкретном варианте осуществления указанные CAR NK-клетки представляют собой NK-клетки пуповинной крови или NK-клетки, продуцированные из гематопозитических клеток пуповинной крови, например стволовые гематопозитические клетки. В другом варианте осуществления указанные CAR NK-клетки были продуцированы посредством двух- или трехэтапного способа, описанного в настоящем изобретении для продуцирования NK-клеток. В другом варианте осуществления указанные леналидомид или помалидомид, элутузамаб и/или CAR NK-клетки вводят отдельно друг от друга. В определенных конкретных вариантах осуществления способа лечения индивида с множественной миеломой указанные CAR NK-клетки содержат внеклеточный домен CAR, и этот внеклеточный домен представляет собой связывающий CS-1 домен. В конкретных вариантах осуществления связывающий CS-1 домен содержит scFv или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое связывает CS-1.

В другом варианте осуществления, представленном в настоящем раскрытии, способ лечения индивида, имеющего рак крови (например, лимфому Беркитта), включает в себя введение индивиду (1) ромидеписина и (2) CAR NK-клеток, при этом указанные CAR NK-клетки являются эффективными для лечения рака крови (например, лимфомы Беркитта) у указанного индивида. В определенных конкретных вариантах осуществления способа лечения индивида с раком крови (например, лимфомой Беркитта) указанные CAR NK-клетки содержат внеклеточный домен CAR, и этот внеклеточный представляет собой

связывающий CD20 домен. В конкретных вариантах осуществления связывающий CD20 домен содержит scFv или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которое связывает CD20.5.5. Способы лечения инфекционных заболеваний В настоящем изобретении представлены способы лечения инфекционных заболеваний с применением NK-клеток или генетически модифицированных NK-клеток (например, NK-клеток, содержащих CAR и/или хоминг-рецептор), в соответствии с описанным выше.

5.5.1. Лечение инфекционных заболеваний с применением комбинированной NK-терапии.

В другом аспекте, представленном в настоящем раскрытии, способы лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта включают в себя (а) введение указанному субъекту изолированной популяции естественных клеток-киллеров (NK) или фармацевтической композиции с ней или изолированной популяции генетически модифицированных NK-клеток (например, NK-клеток, содержащих CAR и/или хоминг-рецептор) или фармацевтической композиции с ней и (б) введение указанному субъекту второго средства или фармацевтической композиции с ним. Второе средство может представлять собой любое фармацевтически приемлемое средство, которое может применяться для лечения инфекционного заболевания, и включает, но не ограничено указанным, антитело (например, моноклональное антитело), биспецифичный активатор клеток-киллеров (BiKE) или противовирусное средство.

5.5.1.1. Антитела, которые связываются с белком иммунной контрольной точки.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (см. раздел 5.4.1.1 в отношении описания антител). В конкретных вариантах осуществления антитело специфично связывается и противодействует активности белка иммунной контрольной точки, связанного с иммунной контрольной точкой белка или костимулирующего сигнального белка, в соответствии с описанным в разделе 5.4.1.1.

5.5.1.2. Активатор биспецифичных клеток-киллеров.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой BiKE в соответствии с описанным в разделе 5.4.1.2.

5.5.1.3. Противовирусное средство.

В определенных вариантах осуществления второе средство представляет собой противовирусное средство, которое включает, но не ограничено указанным, имиквимод, подофилокс, подофиллин, альфа-интерферон (IFN α), ретиколос, ноноксинол-9, ацикловир, фамцикловир, валацикловир, ганцикловир, цидофовир; амантадин, римантадин; рибавирин; занамавир и осельтамивир; ингибиторы протеаз, такие как индинавир, нелфинавир, ритонавир или саквинавир; нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, такие как диданозин, ламивудин, ставудин, залцитабин или зидовудин; или нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, такие как невирапин или эфавиренц.

5.5.2. Лечение инфекционных заболеваний с применением генетически модифицированных NK-клеток.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлены способы лечения инфекционного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающие в себя введение указанному субъекту изолированной популяции NK-клеток или фармацевтической композиции с ней, при этом NK-клетки являются генетически модифицированными (например, содержат химерный антигенный рецептор (CAR) и/или хоминг-рецептор, содержат химерный антигенный рецептор (CAR), при этом указанный CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и, необязательно, костимулирующий домен).

Генетически модифицированные NK-клетки (например, NK-клетки, содержащие CAR и/или хоминг-рецептор), описаны в разделе 5.3.

5.5.3. Инфекционное заболевание.

В определенных вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой инфекцию, вызванную вирусом, бактерией, грибом или гельминтом. В конкретных вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой вирусную инфекцию.

В конкретных вариантах осуществления вирусная инфекция представляет собой инфекцию, вызываемую вирусом семейства Adenoviridae, Picornaviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae, Flaviviridae, Retroviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Papillomaviridae, Rhabdoviridae или Togaviridae. В более конкретных вариантах осуществления указанный вирус представляет собой вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус Коксаки, вирус гепатита А (HAV), полиовирус, вирус Эпштейна-Барр (EBV), вирус герпеса простого типа 1 (HSV1), вирус герпеса простого типа 2 (HSV2), человеческий цитомегаловирус (CMV), человеческий вирус герпеса типа 8 (HHV8), вирус герпес зостер (вирус ветряной оспы (VZV) или вирус опоясывающего лишая), вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус гепатита D (HDV), вирус гепатита Е (HEV), вирус гриппа (например, вирус гриппа А, вирус гриппа В, вирус гриппа С или тоготовирус - thogotovirus), вирус кори, вирус свинки, вирус парагриппа, папилломавирус, вирус бешенства или вирус краснухи.

В других более конкретных вариантах осуществления указанный вирус представляет собой аденовирус вида А, серотип 12, 18 или 31; аденовирус вида В, серотип 3, 7, 11, 14, 16, 34, 35 или 50; аденовирус вида С, серотип 1, 2, 5 или 6; вида D, серотип 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 4 9 или 51; вида Е, серотип 4; или вида F, серотип 40

или 41.

В определенных других более конкретных вариантах осуществления вирус представляет собой вирус Апои (APOIV), вирус Ароа (AROAV), вирус Багаза (BAGV), вирус Банци (BANV), вирус Бубуи (BOUV), вирус Каципакоре (CPCV), вирус Карей-Айленд (CIV), вирус Cowbone Ridge (CRV), вирус денге (DENV), вирус Edge Hill (EHV), вирус Gadgets Gully (GGYV), вирус Ильеус (ILHV), вирус менингоэнцефаломиелита индюков в Израиле (ITV), вирус японского энцефалита (JEV), вирус Югра (JUGV), вирус Ютиапа (JUTV), вирус кадам (KADV), вирус Кедугу (KEDV), вирус Кокобера (KOKV), вирус Кутанго (KOUV), вирус Кьяссанурской лесной болезни, (KFDV), вирус Лангата (LGTV), вирус Мибан (MEAV), вирус Модок (MODV), вирус лейкоэнцефалита ночниц Монтаны (MMLV), вирус энцефалита долины Муррея (MVEV), вирус Нтайя (NTAV), вирус омской геморрагической лихорадки (OHFV), вирус Повассан (POWV), вирус Рио-браво-дель-Норте (RBV), вирус Royal Farm (RFV), вирус Saboya (SABV), вирус энцефалита Сент-Луиса (SLEV), вирус Sal Vieja (SW), вирус San Perlita (SPV), вирус Saumarez Reef (SREV), вирус Сепик (SEPV), вирус Тембусу (TMUV), вирус клещевого энцефалита (TBEV), вирус Тюлений (TYUV), вирус Уганды S (UGSV), вирус Усугу (USUV), вирус вессельсбронской болезни (WESSV), вирус лихорадки Западного Нила (WNV), вирус Яунде (YAOV), вирус желтой лихорадки (YFV), вирус Юкосе (YOKV) или вирус Зика (ZIKV).

В других вариантах осуществления NK-клетки вводят субъекту, имеющему вирусную инфекцию, как часть курса противовирусного лечения, который включает в себя один или более других противовирусных средств. Конкретные противовирусные средства, которые могут быть введены индивиду, имеющему вирусную инфекцию, включают, но не ограничены указанным, имиквимод, подофилокс, подофиллин, альфа-интерферон ($IFN\alpha$), ретикулос, ноноксинол-9, ацикловир, фамцикловир, валацикловир, ганцикловир, цидофовир; амантадин, римантадин; рибавирин; занамавир и осельтамивир; ингибиторы протеаз, такие как индинавир, нелфинавир, ритонавир или саквинавир; нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, такие как диданозин, ламивудин, ставудин, залцитабин или зидовудин; или ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, такие как невирапин или эфавиренц.

5.6. Введение.

NK-клетки, генетически модифицированные NK-клетки или второе средство в соответствии с описанным в настоящем изобретении могут быть введены индивиду, например индивиду, имеющему опухолевые клетки или инфицированные клетки, через любой приемлемый с медицинской точки зрения маршрут, известный в технике, подходящий для введения живых клеток или второго средства. В различных вариантах осуществления клетки могут быть имплантированы хирургически, инъекрованы, влиты, например, посредством катетера или шприца, или введены другим способом прямо или косвенно в место, в которое имеется необходимость их ввести. В различных вариантах осуществления второе средство может быть инъекровано, влито, например, посредством катетера или шприца или введено другим способом прямо или косвенно в место, в которое имеется необходимость его ввести. В одном из вариантов осуществления клетки или второе средство вводят индивиду внутривенно. В другом варианте осуществления клетки или второе средство вводят индивиду в месте расположения опухоли, например солидной опухоли или инфекции. В конкретном варианте осуществления, в котором индивид имеет опухоль или инфекцию более чем в одном местоположении, клетки или второе средство вводят по меньшей мере в два или во все местоположения опухоли/инфекции. В определенных других вариантах осуществления клетки, или второе средство, или композиции указанного вводят перорально, через нос, внутриартериально, парентерально, внутриглазно, внутримышечно, подкожно, интраперитонеально, внутричерепно, внутрижелудочно, интрацеребровентрикулярно, интратекально, интракостерально, интраспинально и/или периспинально. В конкретных вариантах осуществления клетки, или второе средство, или композиции указанного, вводят посредством инъекции, вливания, внутривенного (IV) введения, внутрибедерного введения или внутриопухолевого введения. В определенных конкретных вариантах осуществления клетки или второе средство доставляются через внутричерепные или внутрипозвоночные иглы и/или катетеры с помощью насосных устройств или без них.

В конкретных вариантах осуществления этап введения указанному субъекту изолированной популяции NK-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции. В конкретных вариантах осуществления инъекция NK-клеток представляет собой местную инъекцию. В более конкретных вариантах осуществления местную инъекцию выполняют непосредственно в солидную опухоль (например, саркому). В конкретных вариантах осуществления введение NK-клеток выполняют посредством инъекции шприцем. В конкретных вариантах осуществления введению NK-клеток посредством инъекции способствуют лапароскопией, эндоскопией, ультразвуком, компьютерной томографией, магнитным резонансом или рентгенологией.

NK-клетки, генетически модифицированные NK-клетки или второе средство могут быть введены индивиду в композиции, например матрице, гидрогеле, скаффолде и т.п.

В одном из вариантов осуществления клетки высевают на естественную матрицу, например плацентарный биоматериал, такой как амниотический мембранный материал. Такой амниотический мембранный материал может представлять собой, например, амниотическую мембрану, иссеченную непосредственно из плаценты млекопитающего; фиксированную или термически обработанную амниотиче-

скую мембрану, по существу сухую (т.е. <20% H₂O) амниотическую мембрану, хориальную мембрану, по существу сухую хориальную мембрану, по существу сухую амниотическую и хориальную мембрану и т.п. Предпочтительные плацентарные биоматериалы, на которые могут быть высеяны плацентарные стволовые клетки, описаны в Харири, публикация заявки на патент США № 2004/0048796, изобретение которой включено в настоящее описание посредством ссылки во всей его полноте.

В другом варианте осуществления клетки суспендируют в растворе гидрогеля, подходящем, например, для инъекции. Подходящие гидрогели для таких композиций включают самособирающиеся пептиды, такие как RAD16. В одном из вариантов осуществления раствор гидрогеля, содержащий клетки, может затвердевать, например, в шаблоне с формированием матрицы, в которой клетки диспергированы для имплантации. Клетки в такой матрице могут также культивироваться, с тем чтобы клетки стали митотически расширенными до имплантации. Гидрогель может являться, например, органическим полимером (естественным или синтетическим), который является поперечно сшитым через ковалентные, ионные или водородные связи, с тем чтобы создать трехмерную структуру открытой решетки, которая удерживает молекулы воды и формирует гель. Формирующие гидрогель материалы включают полисахариды, такие как альгинат и его соли, пептиды, полифосфазены и полиакрилаты, которые поперечно сшиваются ионно, или блочные полимеры, такие как блочные сополимеры полиэтиленоксида-полипропиленгликоля, которые поперечно сшиваются посредством температуры или pH соответственно. В некоторых вариантах осуществления гидрогель или матрица являются биоразлагаемыми.

В некоторых вариантах осуществления рецептура, применяемая в настоящем изобретении, содержит полимеризующийся на месте гель (см., например, публикацию заявки на патент США 2002/0022676; Anseth et al., *J. Control Release*, 78(1-3):199-209 (2002); Wang et al., *Biomaterials*, 24(22):3969-80 (2003).

В некоторых вариантах осуществления полимеры являются по меньшей мере частично растворимыми в водных растворах, таких как вода, буферизованные солевые растворы или водные спиртовые растворы, которые имеют заряженные боковые группы или их моновалентную ионную соль. Примерами полимеров, имеющих кислотные боковые группы, которые могут реагировать с катионами, являются поли(фосфазены), поли(акриловые кислоты), поли(метакриловые кислоты), сополимеры акриловой кислоты и метакриловой кислоты, поли(винилацетат) и сульфированные полимеры, такие как сульфированный полистирол. Соплимеры, имеющие кислотные боковые группы, сформированные посредством реакции акриловой или метакриловой кислоты и мономеров или полимеров винилового простого эфира, также могут использоваться. Примерами кислотных групп являются группы карбоновой кислоты, группы сульфокислоты, галоидированные (предпочтительно фторированные) спиртовые группы, фенольные группы OH и кислотные группы OH.

Клетки могут быть высеяны на трехмерную решетку или скаффолд и имплантированы *in vivo*. Такая решетка может быть имплантирована в комбинации с любыми одним или более факторами роста, клетками, лекарственными препаратами или другими компонентами, которые стимулируют формирование ткани или другим способом усиливают или улучшают практическое применение способов, описанных в настоящем раскрытии.

Примеры скаффолдов, которые могут применяться в настоящем изобретении, включают нетканые маты, поропласты или самособирающиеся пептиды. Нетканые маты могут быть сформированы с использованием волокон, содержащих синтетический абсорбируемый сополимер гликолевой и молочной кислот (например, PGA/PLA) (VICRYL, Ethicon, Inc., Сомервилл, Нью-Джерси). Поропласты, состоящие, например, из сополимера поли(ε-капролактоновой)/поли(гликолевой кислоты) (PCL/PGA), сформированного посредством таких процессов, как сублимационная сушка или лиофилизация (см., например, патент США № 6355699), могут также использоваться в качестве скаффолдов.

Клетки также могут быть высеяны на или могут входить в контакт с физиологически приемлемым керамическим материалом, включая, но не ограничиваясь указанным, моно-, ди-три-, альфа-три, бета-три- и тетракальцийфосфат, гидроксипатит, фторпатиты, сульфаты кальция, фториды кальция, окиси кальция, карбонаты кальция, магний-кальций-фосфат, биологически активные стекла, такие как BIOGLASS®, и смеси указанного. Пористые биологически совместимые керамические материалы, коммерчески доступные в настоящий момент, включают SURGIBONE® (CanMedica Corp., Канада), ENDOBON® (Merck Biomaterial France, Франция), CEROS® (Mathys, AG, Bettlach, Швейцария) и минерализованные коллагеновые продукты костной пластики, такие как HEALOS™ (DePuy, Inc., Рэйнхэм, Массачусетс) и VITOSS®, RHAKOSS™ и CORTOSS® (Orthovita, Малверн, Пенсильвания). Решетка может представлять собой смесь, комбинацию или композит из естественных и/или синтетических материалов.

В другом варианте осуществления клетки могут быть высеяны на или могут входить в контакт с волокном, которое может, например, состоять из мультифиламентных нитей, сделанных из биопоглощаемого материала, такого как PGA, PLA, сополимеры или комбинации PCL или гиалуроновая кислота.

Клетки в другом варианте осуществления могут быть высеяны на поропластные скаффолды, которые могут представлять собой композитные структуры. Такие поропластные скаффолды могут формироваться в необходимую форму, такую как форма части конкретной структуры в теле, которая будет вос-

становливаясь, заменяться или расширяться. В некоторых вариантах осуществления решетку обрабатывают, например, 0,1 М уксусной кислотой, после чего выполняется инкубация в полилизине, PBS и/или коллагене, до инокуляции клеток, описанных в настоящем раскрытии, с тем чтобы улучшить прикрепление клеток. Внешние поверхности матрицы могут быть модифицированы в целях улучшения прикрепления или роста клеток и дифференцировки ткани, например, посредством плазменного покрытия матрицы или добавления одного или более белков (например, коллагены, эластичные волокна, ретикулярные волокна), гликопротеинов, гликозаминогликанов (например, сульфат гепарина, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, дерматансульфат, кератинсульфат и т.д.), клеточной матрицы и/или других материалов, таких как, но не ограничиваясь указанным, желатин, альгинаты, агар, агароза и растительные смолы и т.п.

В некоторых вариантах осуществления скаффолд содержит или обрабатывается материалами, которые делают его нетромбообразующим. Такие обработки и материалы могут также способствовать и поддерживать рост эндотелия, миграцию и накопление внеклеточного матрикса. Примеры таких материалов и обработок включают, но не ограничены указанным, природные материалы, такие как белки базальной мембраны, такие как ламинин и коллаген IV типа, синтетические материалы, такие как EPTFE и сегментированные полиуретанмочевинные силиконы, такие как PURSPAN™ (Polymer Technology Group, Inc., Беркли, Калифорния). Скаффолд может также содержать антитромбические средства, такие как гепарин; скаффолды могут также обрабатывать в целях изменения поверхностного заряда (например, покрывать плазмой) до высевания плацентарных стволовых клеток.

В конкретных вариантах осуществления НК-клетки, генетически модифицированные НК-клетки или второе средство вводят с фармацевтическим носителем. Фармацевтический носитель может быть любым известным в технике. В конкретных вариантах осуществления НК-клетки или генетически модифицированные НК-клетки являются фукозилированными на поверхности клеток.

Определение количества НК-клеток или генетически модифицированных НК-клеток (например, НК-клеток, содержащих CAR и/или хоминг-рецептор) или количества второго средства может быть выполнено независимо. Такое определение может быть основано на состоянии субъекта и может быть сделано врачом.

В определенных вариантах осуществления, НК-клетки, генетически модифицированные НК-клетки или второе средство применяют, например вводят индивиду, в любом объеме или количестве, которое приводит к детектируемому терапевтическому эффекту для индивида, например, в эффективном количестве, при этом индивид имеет вирусную инфекцию, рак или опухолевые клетки, например индивид имеет опухолевые клетки, солидную опухоль или рак крови, например, является больным раком пациентом. Клетки могут быть введены такому индивиду по абсолютному количеству клеток, например, указанному индивиду могут вводить около, по меньшей мере около или самое большее около 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} или 1×10^{11} клеток. В других вариантах осуществления клетки могут быть введены такому индивиду по относительному количеству клеток, например указанному индивиду может быть введено около, по меньшей мере около или самое большее около 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} или 1×10^{11} клеток. В других вариантах осуществления клетки могут быть введены такому индивиду по относительному количеству клеток, например указанному индивиду может быть введено около, по меньшей мере около или самое большее около 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 или 5×10^8 клеток. Клетки могут быть введены такому индивиду согласно приблизительному соотношению между количеством НК-клеток или генетически модифицированных НК-клеток и, необязательно, клеток плацентарного перфузата и количеством клеток опухоли/инфицированных клеток у указанного индивида (например, оцененное количество). Например, НК-клетки или генетически модифицированные НК-клетки могут быть введены указанному индивиду в отношении около, по меньшей мере около или самое большее около 1:1, 1:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1 или 100:1 к количеству клеток опухоли/инфицированных клеток у индивида. Количество клеток опухоли/инфицированных клеток у такого индивида может быть оценено, например, путем подсчета количества клеток опухоли/инфицированных клеток в образце ткани пациента, например образце крови, биопсии и т.п. В конкретных вариантах осуществления, например, для солидных опухолей, указанный подсчет выполняют в комбинации с визуализацией опухоли или опухолей, с тем чтобы получить приблизительный объем опухоли.

В конкретном варианте осуществления НК-клетки (или генетически модифицированные НК-клетки) дополняют клетками плацентарного перфузата или плацентарным перфузатом. В конкретном варианте осуществления около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 или более НК-клеток (или генетически модифицированных НК-клеток) на 1 мл или 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} или более НК-клеток (или генетически модифицированных НК-клеток) на 1 мл дополняют около или по меньшей мере около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 или более изолированных клеток плацентарного перфузата на 1 мл или 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 ,

1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} или более изолированных клеток плацентарного перфузата на 1 мл. В других более конкретных вариантах осуществления около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 или более НК-клеток (или генетически модифицированных НК-клеток) на 1 мл или 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} или более НК-клеток (или генетически модифицированных НК-клеток) на 1 мл дополняют около или по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мл перфузата или около 1 единицей перфузата.

В другом конкретном варианте осуществления НК-клетки (или генетически модифицированные НК-клетки) дополняют прилипающими плацентарными клетками, например прилипающими плацентарными стволовыми клетками или мультипотентными клетками, например $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ прилипающими к пластику плацентарными клетками в культуре ткани. В конкретных вариантах осуществления НК-клетки дополняют около 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 или более прилипающих плацентарных клеток/мл или 1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} или более прилипающих плацентарных клеток, например прилипающих плацентарных клеток или мультипотентных клеток.

В другом конкретном варианте осуществления НК-клетки (или генетически модифицированные НК-клетки) дополняют кондиционированной средой, например культуральной средой, кондиционированной $CD34^+$, $CD10^+$, $CD105^+$, $CD200^+$ прилипающими к пластику плацентарными клетками в культуре ткани, например 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мл кондиционированной стволовыми клетками культуральной среды на единицу перфузата или на 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} или 10^{11} НК-клеток (или генетически модифицированных НК-клеток). В определенных вариантах осуществления прилипающие к пластику плацентарные клетки в культуре ткани представляют собой мультипотентные прилипающие плацентарные клетки, описанные в патенте США № 74 68276 и публикации заявки на патент США № 2007/0275362, раскрытия которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте. В другом конкретном варианте осуществления способ дополнительно включает в себя помещение опухолевых клеток вблизи, или введение индивиду, иммуномодулирующего соединения (например, иммуномодулирующего соединения в соответствии с описанным в разделе 5.2.7.1) или талидомида.

В другом конкретном варианте осуществления НК-клетки (или генетически модифицированные НК-клетки) дополняют клетками плацентарного перфузата, при этом клетки перфузата помещают вблизи интерлейкина-2 (IL-2) на некоторый период времени до указанного помещения вблизи. В определенных вариантах осуществления указанный период времени составляет около, по меньшей мере или самое большее 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 или 48 ч до указанного помещения вблизи.

НК-клетки, генетически модифицированные НК-клетки или второе средство могут быть введены однократно (т.е. в единственной дозе) индивиду, имеющему вирусную инфекцию, гематологическое нарушение или солидную опухоль, во время курса терапии; или могут быть введены многократно (т.е. во множестве доз), например один раз в каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 ч, или один раз в каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или один раз в каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 24, 36 или более недель во время терапии. В вариантах осуществления, в которых используются и НК-клетки (или генетически модифицированные НК-клетки), и второе средство, это второе средство и НК-клетки (или генетически модифицированные НК-клетки) могут быть введены индивиду вместе, например в одной и той же рецептуре; отдельно, например в отдельных рецептурах, приблизительно в одно и то же время; или могут быть введены отдельно, например в различных планах дозирования или в разное время суток. Второе средство может быть введено до, после или одновременно с НК-клетками (или генетически модифицированными НК-клетками). НК-клетки (или генетически модифицированные НК-клетки) или второе средство могут быть введены безотносительно того, вводились ли НК-клетки (или генетически модифицированные НК-клетки) или второе средство индивиду в прошлом.

5.7. Пациенты.

Пациент, упоминаемый в настоящем раскрытии, может являться, но не ограничен указанным, человеком или не являющимся человеком позвоночным, таким как дикое, домашнее или сельскохозяйственное животное. В определенных вариантах осуществления пациент является млекопитающим, например человеком, коровой, собакой, кошкой, козой, лошадью, овцой, свиньей, крысой или мышью. В одном из вариантов осуществления пациентом является пациент-человек.

5.8. Наборы.

В настоящем изобретении предоставлена фармацевтическая упаковка или набор, включающий в себя один или более контейнеров, заполненных композицией, содержащей НК-клетки или генетически модифицированные НК-клетки (например, НК-клетки, содержащие CAR и/или хоминг-рецептор), описанные выше, и один или более контейнеров, заполненных композицией, содержащей второе средство, описанное выше. Также в настоящем изобретении предоставлена фармацевтическая упаковка или набор,

включающие в себя один или более контейнеров, заполненных композицией, содержащей НК-клетки, содержащие CAR и/или хоминг-рецептор, описанные выше. Необязательно, с таким(и) контейнером(ами) может быть ассоциировано извещение в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, и это извещение отражает одобрение агентством в отношении производства, применения или продажи для введения человеку.

Наборы, охваченные в настоящем раскрытии, могут применяться в соответствии со способами лечения, представленными в настоящем раскрытии, например способами лечения гематологического рака, солидной опухоли или вирусной инфекции.

6. Пример.

6.1. Пример 1. Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) с использованием ритуксимаба.

Пример, представленный в настоящем раскрытии, демонстрирует, что совместное введение НК-клеток (в настоящем раскрытии, клеток PiNK) и антитела, специфичного для антигена поверхности клеток (в этом случае, CD20), например ассоциированного с опухолью антигена, повышает НК-антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) НК-клеток.

В экспериментах, представленных в настоящем раскрытии, используется антитело против CD20, ритуксимаб и клетки Дауди (Cat. No. CCL-213, ATCC), которые имеют высокую экспрессию CD20. Клетки Дауди были собраны и помечены PKH26 (Cat. No. PKH26GL-1KT, Sigma-Aldrich) (Ferlazzo, G. et al., J. Immunol., 172:1455-1462 (2004); Lehmann, D. et al., Stem Cells Dev, 21:2926-2938 (2012)), чей липофильный алифатический остаток вставляется в плазматическую мембрану клетки. Клетки были промыты и культивированы с ритуксимабом (и человеческим IgG в качестве контроля изотипа) в различных концентрациях, как указано на фиг. 1, в течение 1 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания 10^4 клеток-мишеней были помещены в 96-луночные планшеты для культивирования ткани с U-образным дном и инкубировались с культивированными НК-клетками при различных соотношениях эффектор-мишень (E:T) (50:1, 20:1, 10:1 и 2,5:1) в 200 мкл RPMI 1640, дополненном 10% FBS. Культуры инкубировались в течение 4 ч при 37°C в 5% CO₂. После инкубации клетки были собраны и TO-PRO-3 (Cat. No. T3605, Invitrogen), мембранно-непроницаемый ДНК-краситель, был добавлен к культурам до итоговой концентрации 0,25 мкМ, после чего проводился анализ FACS с использованием BD FACSCanto II. Цитотоксичность ("% цитотоксичности" на фиг. 1) выражена в процентах мертвых клеток (PKH26⁺TO-PRO-3⁺) от общего количества целевых опухолевых клеток PKH26⁺ за вычетом спонтанного некроза клеток.

Культивирование клеток Дауди с ритуксимабом повышает цитотоксичность (PiNK) клеток по сравнению с контролями человеческого IgG, таким образом показывая повышение цитолитической активности клеток PiNK при дополнении совместным введением антитела против CD20 (фиг. 1).

6.2. Пример 2. Цитотоксичность трехэтапных НК-клеток против множественной миеломы.

Исследование фенотипа клеточных линий MM и первичных образцов MM.

Первичные клетки множественной миеломы (MM) (раствор ткани, ID доноров: MM285, MM293) или линии опухолевых клеток MM: RPMI8226 (ATCC, Cat. No. CCL-155) и клеток OPM2 (DSMZ, Cat. No. ACC-50) (1×10^6 каждых) использовались в данном анализе. Клетки были окрашены анти-PD-L1 APC (Biolegend, Cat. No. 329708), анти-CS1 PE-Cy7 (Biolegend, Cat. No. 331816) и 7-AAD (BD Bioscience, Cat. No. 559925) согласно протоколу производителя. Данные были получены на BD LSRFortessa (BD Bioscience) и проанализированы с использованием программного обеспечения FLOWJO® (Tree Star). Данные были выражены как % положительных клеток, запертых под единичными клетками 7-AAD-. Установка % положительного запираения была выполнена с использованием неокрашенного образца в качестве контроля.

Результаты.

Экспрессия PD-L1 и CS-1 на клеточных линиях MM показана на фиг. 2. Крайний левый пик в панелях фиг. 2 указывает контроль, тогда как самый правый пик указывает образец. Процент клеток, положительных по PD-L1, был следующим: указывает контроль, тогда как самый правый пик указывает образец. Процент клеток, положительных по PD-L1, был следующим: 71,6% MM285, 70,7% MM293, 66,2% OPM-2 и 94,4% RPMI8226. Процент клеток, положительных по CS-1 был следующим: 31,8% MM285, 58,8% MM293, 93,4% OPM-2 и 29,5% RPMI8226.

24-часовая проба на цитотоксичность трехэтапных НК-клеток против клеточных линий MM и первичных образцов MM.

Клетки OPM2 были маркированы 10 мкМ PKH26 флуоресцентным красителем (Sigma-Aldrich, Cat. No. PKH26-GL) до совместной культивации с трехэтапными НК-клетками от пяти различных доноров при соотношении эффектора и мишени (E:T), составляющем 3:1 (3×10^5 и 1×10^5 трехэтапных НК и клеток OPM2 соответственно) в 1 мл RPMI1640, дополненного 10% FBS и антибиотиками (базальная среда), или в условиях эксперимента: IL-15 (5 нг/мл) (Invitrogen, Cat. No. PHC9153); IL-2 (200 межд.ед./мл) (Invitrogen, Cat. No. PHC0023); анти-PD-L1 (10 нг/мл) (Affymetrix, Cat. No. 16-5983-82);

анти-IgG (10 нг/мл) (Affymetrix, Cat. No. 16-4714-82); ревлимид® (леналидомид; 1 мкМ) или диметилсульфоксид (0,1%) в 48-луночных планшетах. Клетки-мишени по отдельности были помещены в планшет в качестве контролей. После инкубации в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂ клетки были собраны, после чего проводилось окрашивание 1 мкМ TO-PRO-3, чтобы идентифицировать мертвые клетки. Количество жизнеспособных клеток-мишеней (РКН26⁺TO-PRO-3⁻) в каждом образце было определено количественно посредством проточной цитометрии с использованием гранул для подсчета в соответствии с протоколом, предоставленным производителем (Invitrogen, Cat. No. C36950). Гранулы для подсчета были введены в данную пробу в целях учета любой потенциальной пролиферации опухолевых клеток во время длительного 24-часового культивирования.

Кратко, количество жизнеспособных клеток-мишеней в каждом образце было вычислено следующим образом: (% РКН26⁺TO-PRO-3⁻ живых мишеней)/(гранулы для подсчета%)×(присвоенное значение для гранулы из партии гранул для подсчета). Процент выживания (% выживания) в образцах (клетки-мишени с совместно культивированными трехэтапными НК-клетками) был вычислен путем деления абсолютного числа жизнеспособных РКН26⁺ клеток-мишеней, остающихся в совместных культурах с трехэтапными НК-клетками после 24 ч, на абсолютное число жизнеспособных РКН26⁺ клеток-мишеней, остающихся в культуре только клеток-мишеней. Процент цитотоксичности за 24 ч вычислялся как: 100 - % выживания. Результаты были изображены как среднее значение ± стандартное отклонение среднего значения.

Результаты.

Трехэтапные НК-клетки демонстрировали цитотоксическую активность против различных клеточных линий ММ. Трехэтапные НК-клетки оказывали 20-60% лизирование в отношении четырех образцов первичных ММ при отношении Е:Т, составляющем 3:1 (фиг. 3). Наблюдалось изменение чувствительности мишеней ММ от различных доноров в отношении уничтожения НК-клетками. Кроме того, начальная оценка цитотоксичности трехэтапных НК-клеток против OPM2 показала улучшение цитолитической активности путем добавления цитокинов, иммуномодулирующих соединений и моноклональных антител, использованных в этих экспериментах (фиг. 4).

Эквиваленты

Настоящее изобретение не должно быть ограничено в своем объеме конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем раскрытии. Фактически, различные модификации изобретения в дополнение к описанным станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых фигур. Такие модификации, как предполагается, будут попадать в пределы объема прилагаемой формулы изобретения.

Вся библиография, процитированная в настоящем раскрытии, включена в настоящее изобретение посредством ссылки во всей ее полноте и для всех целей до той же самой степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки во всей их полноте для всех целей. Цитирование любой публикации предназначено для его раскрытия до даты подачи и не должно рассматриваться как признание того, что настоящее изобретение не правомочно датировать задним числом такую публикацию посредством предшествующего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя введение указанному субъекту выделенной популяции активированных естественных клеток-киллеров (НК) или фармацевтической композиции с ней, при этом НК-клетки являются генетически сконструированными, экспрессирующими химерный антигенный рецептор (CAR) и хоминг-рецептор, при этом указанный CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и костимулирующий домен, и где хоминг-рецептор представляет собой VEGFR2 или CCR7.

2. Способ по п.1, в котором внеклеточный домен содержит антигенсвязывающий домен, где антигенсвязывающий домен специфически связывается с ассоциированным с опухолью антигеном (ТАА), который выбран из группы, состоящей из CD123, CLL-1, CD38 и CS-1.

3. Способ по п.1 или 2, в котором костимулирующий домен содержит внутриклеточный домен CD28, 4-1BB, PD-1, OX40, CTLA-4, Kp46, Kp44, Kp30, DAP10 или DAP12.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором введение указанному субъекту выделенной популяции активированных НК-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют посредством инъекции, инфузии, внутривенного введения, внутрибедренного введения или внутриопухолевого введения.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором введение указанному субъекту выделенной популяции активированных НК-клеток или фармацевтической композиции с ней выполняют с помощью устройства, матрицы или скаффолда.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором активированные НК-клетки являются фукозилированными на поверхности клеток.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором изолированную популяцию активированных НК-клеток

или фармацевтическую композицию с ней вводят в однократной дозе.

8. Способ по любому из пп.1-6, в котором выделенную популяцию активированных НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней вводят во множестве доз.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором рак представляет собой гематологический рак.

10. Способ по любому из п.1-8, в котором рак представляет собой солидную опухоль.

11. Способ по любому из пп.1-10, дополнительно включающий введение указанному субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, который специфично связывается и является антагонистом активности белка иммунной контрольной точки.

12. Способ по п.11, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело, белок иммунной контрольной точки представляет собой CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 или LAG-3.

13. Способ по любому из пп.1-12, дополнительно включающий введение указанному субъекту биспецифичного активатора клеток-киллеров (BiKE), где BiKE содержит первый одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфично связывается с ассоциированным с опухолью антигеном (ТАА).

14. Способ по п.13, в котором ТАА представляет собой CD123, CLL-1, CD38, CS-1, CD138, ROR1, FAP, MUC1, PSCA, EGFRvIII, EPHA2 или GD2.

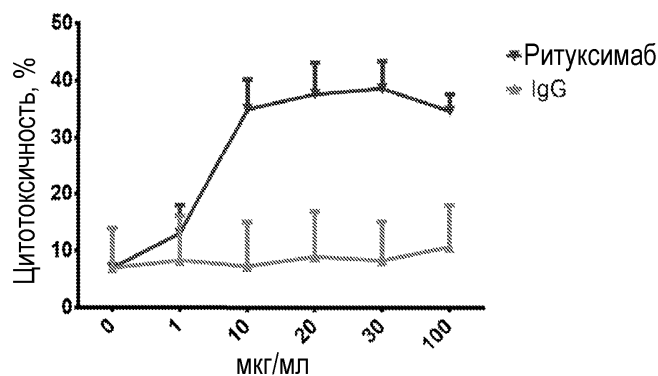
15. Набор для лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий в себя:

(а) выделенную популяцию активированных НК-клеток или фармацевтическую композицию с ней, при этом активированные НК-клетки являются генетически сконструированными, экспрессирующими химерный антигенный рецептор (CAR) и хоминг-рецептор, при этом указанный CAR содержит внеклеточный домен, трансмембранный домен, внутриклеточный стимулирующий домен и костимулирующий домен, где хоминг-рецептор представляет собой VEGFR2 или CCR7; и

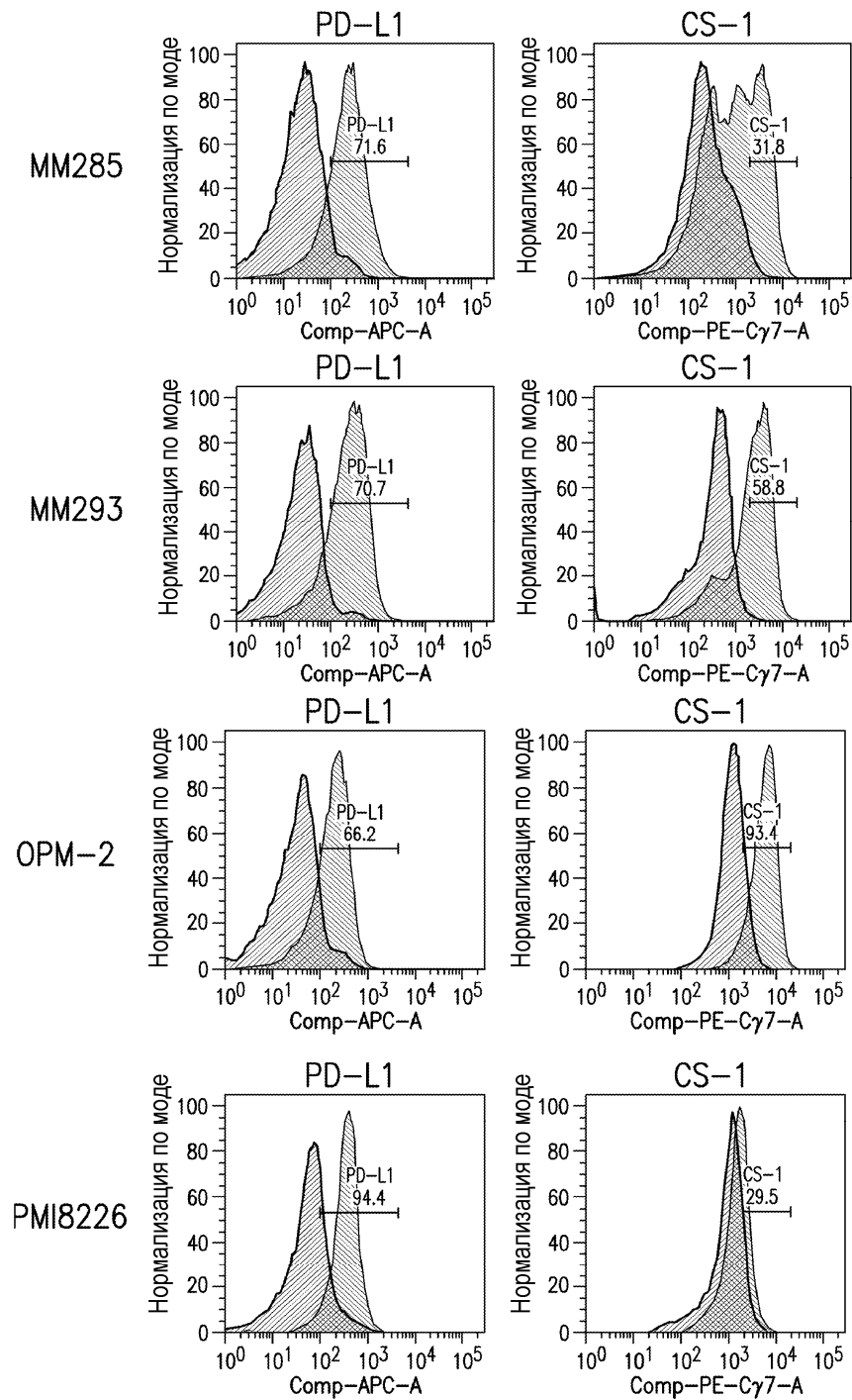
(b) второе средство или фармацевтическую композицию с ним, при этом указанное второе средство применяется для лечения указанного рака.

16. Набор по п.15, в котором второе средство представляет собой противовоспалительное средство, иммуномодулирующее средство, цитотоксическое средство, вакцину против рака, химиотерапевтическое средство, ингибитор HDAC или миРНК.

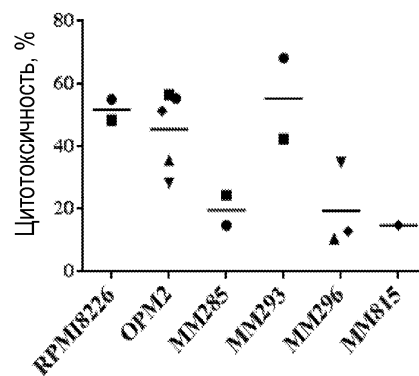
**Активности ADCC клеток РiNK в сравнении с Дауди
(n=3)**



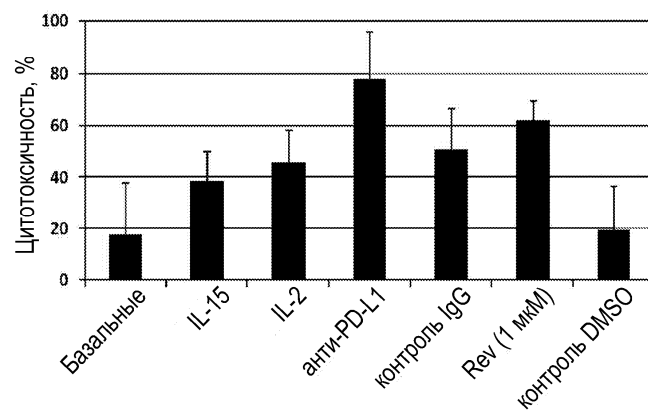
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

