

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191673** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.09.28

(51) Int. Cl. **C12N 5/071** (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.12.12

(54) КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩАЯ КЛЕТКИ-ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ПЕЧЕНИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ HLA-E

(31) **PCT/EP2018/085024**

(32) **2018.12.14**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2019/084868**

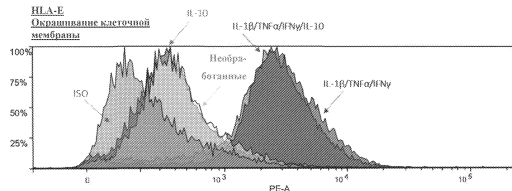
(87) **WO 2020/120664 2020.06.18**

(71) Заявитель:
**ПРОМЕТЕРА ТЕРАПЬЮТИКС СА
(BE)**

(72) Изобретатель:
**Чилингарян Жан-Леон (FR),
Корриторе Элиза (BE), Мацца
Джузеппе (GB), Бельмонт Натали
(FR), Сокал Этьен (BE)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к выделенным клеткам-предшественникам печени, клеточным линиям на их основе, популяциям клеток, содержащим их, и композициям, содержащим их, в которых клетки-предшественники печени являются HLA-E-положительными. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам получения этих клеток-предшественников печени.



202191673

A1

A1

202191673

P92885617EA

КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ КЛЕТОК, СОДЕРЖАЩАЯ КЛЕТКИ-ПРЕДШЕСТВЕННИКИ ПЕЧЕНИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ HLA-E

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к области техники выделенных клеток-предшественников или стволовых клеток печени и их применению в медицине, гепатологии, трансплантации, при печеночной недостаточности и фибровоспалительных заболеваниях печени.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Печень представляет собой важный орган, выполняющий многие жизненно важные функции. Нарушение одной из многочисленных функций печени оказывает значительное влияние на состояние здоровья. Согласно Всемирной организации здравоохранения, заболеваемость в мире острыми или хроническими заболеваниями печени ставит причину смерти в результате этих патологий между 5^м и 9^м местом. Трансплантация клеток печени (LCT) представляет собой процедуру, которая проходит клинические исследования лечения заболеваний печени, направленного на репарацию/регенерацию печени (Najimi et al., Stem Cells Translational Medicine, 2016). Несмотря на усилия при подборе донора, являющегося как можно более иммунологически близким к реципиенту, последствия, возникающие после трансплантации клеток печени, касающиеся отторжения иммунной системой, остаются серьезной проблемой после клеточной терапии, трансплантации тканей и, в частности, LCT. Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) представляют собой плеiotропные клетки, способные функционировать различным образом в зависимости от внеклеточного окружения, особенно клетки, содержащие цитокины (Spees et al., Stem Cells research and therapy, 2016). Исследования показали, что MSC являются гипоиimmunогенными, могут ингибировать развитие иммунного ответа и смещать различные популяции иммунных клеток от провоспалительных к противовоспалительным/регуляторным фенотипам (Najar et al., Inflammation research, 2018). При исходных уровнях MSC являются минимально иммуносупрессивными. Тем

не менее, клетки могут принять иммуносупрессивный фенотип после воздействия определенных факторов окружения (Kouroupis et al., *Tissue engineering Part B*, 2018). К сожалению, только часть этих наивных MSC становится иммуносупрессивной после инъекции, в зависимости от внутренних сигналов отдельного пациента. По этим причинам существует необходимость в разработке новых фенотипов MSC, обладающих улучшенными иммуносупрессивными свойствами.

Основными условиями иммунной функции и отторжения при трансплантации являются антигены главного комплекса гистосовместимости, обычно обозначаемые у человека комплексом HLA. Гены, кодирующие белки HLA класса I, кластеризованы на теломерном конце хромосомы 6p21 человека. К ним относятся классические белки класса Ia, HLA-A, -B и -C, которые экспрессируются повсеместно и являются высокополиморфными. В отличие от этого, неклассические белки класса Ib, HLA-E, HLA-F и HLA-G, относительно инвариантны и экспрессируются избирательно. Основная функция молекул HLA класса Ib заключается в модулировании иммунного ответа путем взаимодействия со специфическими ингибирующими рецепторами, экспрессируемыми на различных эффекторных иммунных клетках, таких как Т- и В-лимфоциты, NK-клетки и антигенпрезентирующие клетки.

Было описано, что MSC, полученные из костей, хрящей или жировой ткани, экспрессируют низкие уровни белков класса Ia системы лейкоцитарных антигенов человека (HLA). Они могут проявлять иммуномодулирующие свойства посредством экспрессии растворимых факторов, в том числе белков HLA-Ib и, в частности, HLA-E (Morandi et al., *Stem Cells*, 2008). В физиологических условиях экспрессия HLA-E глубоко связана с HLA-G (Morandi et al, *Stem Cells*, 2008; Morandi, Pistoia, *Front. Immunol.*, 2014). Документально подтверждено, что HLA-E экспрессируется в печени плода человека (Houlihan et al., *J. Immunol.*, 1992), взрослых гепатоцитах и клетках Купфера (Araujo et al., *J. Immunol. Res.*, 2018). Такая экспрессия увеличивается после инфицирования вирусом гепатита С (HCV), что предполагает потенциальную иммуномодулирующую роль HLA-E в заболеваниях печени (Araujo et al., 2018). Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека, полученные из пигментных эпителиальных клеток сетчатки, конститутивно экспрессируют HLA-E, взаимодействие которого с рецепторным комплексом CD94/NKG2A приводит к подавлению активации NK-клеток (Sugita et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2018).

Было показано, что после трансплантации костного мозга HLA-E ассоциирован с более низким риском реакции «трансплантат против хозяина» и снижением смертности (Pabon et al., Transplant Proceedings 2014). Примирование MSC жировой ткани *in vitro* с помощью IFN γ увеличивает экспрессию HLA-E и других иммуносупрессивных белков с усилением ингибирования Т-клеток (Wobma et al., J. Immunol. Regen. Med., 2018).

В WO2008121894 описывается клеточная композиция MSC, содержащих обогащенную популяцию положительных по HLA-E клеток, или положительных по HLA-G клеток, или положительных одновременно по HLA-E и HLA-G клеток, и их потенциальное применение в лечении дегенеративных заболеваний и иммуномодуляции трансплантации. В WO2018081514 описываются иммуносупрессивные мезенхимальные стромальные клетки, которые получают путем применения провоспалительного цитокина по отношению к мезенхимальным стромальным клеткам в условиях гипоксического культивирования *in vitro*. В US 20120328578 раскрывается способ лечения воспаления в синовиальном суставе, основанный на индукции иммуносупрессивных свойств стволовых клеток путем обработки клеток синовиальной жидкостью воспаленного сустава или провоспалительными цитокинами.

ADHLSC и HNALPC (также обозначаемые HALPC, аллогенные клетки-предшественники печени человека), полученные в большем масштабе для проведения клинических исследований, полученные в условиях GMP) представляют собой недифференцированные клетки-предшественники, полученные после переваривания коллагеназой нормальной взрослой печени и первичной культуры паренхимной фракции. HNALPC проявляют способность к самообновлению и характеризуются особенностью экспрессии как мезенхимальных, так и гепатоцитарных маркеров, а также проявления расширенного потенциала гепатогенной дифференцировки. Эти клетки представляют особый интерес при воздействии на заболевания печени человека, в том числе фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH) и острую хроническую печеночную недостаточность (ACLF), и другие заболевания человека.

Raicevic et al. (Cytotherapy, 2015) раскрывает способ, в котором к мезенхимальным стромальным клеткам печени взрослого человека (ADHLSC) добавляется смесь воспалительных цитокинов на ночь. Мембранной и внутриклеточной экспрессии HLA-E или HLA-G не наблюдали. Raicevic также не сообщает о наличии композиции, характеризующейся высоким содержанием клеток, экспрессирующих HLA-E.

Mehdi Najjar et al., 2018 раскрывают воспалительные примированные ADHLSC. В этом документе не упоминается ни индукция HLA-E, ни экспрессия HLA-G в воспалительных примированных ADHLSC. Mehdi Najjar совершенно не сообщает о преимуществах, которые могут быть связаны с композициями клеток, экспрессирующих HLA-E.

Hoda El-Kehdy et al., 2017 также раскрывает воспалительные примированные ADHLSC и показывает, что экспрессия HLA-ABC, HLA-DR и HLA-G в (не)дифференцированных ADHLSC в конститутивном и примированном состоянии не демонстрирует значимо индуцированной экспрессии HLA-G или экспрессии HLA-DR.

Ни в одном из этих документов уровня техники не раскрывается необходимость получения популяции стволовых клеток или клеток-предшественников печени, экспрессирующих HLA-E, для применения в клинической практике, а также не упоминается, что достаточная экспрессия HLA-E может играть роль в ускользании от цитолиза.

В уровне техники остается потребность в новых или улучшенных видах терапии аллогенными клетками с иммуномодулирующей, а также усиленной иммуносупрессивной и/или иммуноускользающей активностью, например, для предупреждения или лечения воспаления, аутоиммунных заболеваний и отторжения трансплантата, особенно для лечения патологий, связанных с заболеваниями печени.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая полученные из печени взрослого человека клетки-предшественники или стволовые клетки, по п. 1, выделенные из печени клетки-предшественники или стволовые клетки по п. 8 и популяция клеток по п. 21. Более конкретно, в настоящем изобретении предусмотрены клетки, которые являются HLA-E-положительными, и композиции, содержащие по меньшей мере 60% таких HLA-E-положительных клеток. Наблюдаемая экспрессия HLA-E в клетках по настоящему изобретению происходит главным образом, если не преимущественно, на клеточной поверхности. Было обнаружено, что композиции, характеризующиеся повышенным содержанием клеток, экспрессирующих HLA-E (на своей клеточной поверхности), способны ускользать от цитолиза, опосредованного

CD8⁺ Т-клетками, и поэтому являются особенно подходящими для применения в терапии.

Показано, что экспрессия HLA-E в клетках, популяциях клеток и композициях, содержащих указанные клетки по настоящему изобретению, значительно усиливает его иммуносупрессивные и/или иммуноускользающие свойства. Эти клетки, популяции клеток и композиции особенно хорошо подходят для применения в лечении или предупреждении заболеваний, в том числе нежелательных иммунных ответов, например без ограничения воспаления, аутоиммунного заболевания и отторжения трансплантата, а также для применения в лечении заболеваний печени.

Выделенные клетки-предшественники печени, популяции клеток или композиции, содержащие указанные клетки, сохраняют свою способность к пролиферации, что наряду с их специфичностью в отношении печени приводит к повышенной эффективности и безопасности трансплантации клеток печени. Кроме того, в связи со своим происхождением из взрослого организма эти стволовые клетки устраняют иммунологические, этические и канцерогенные проблемы, ассоциированные с эмбриональными клетками (Volarevic et al., International Journal of Medical Sciences, 2018).

Усиленный иммуносупрессивный характер клеток-предшественников благодаря экспрессии HLA-E способствует снижению связанных с иммунным ответом рисков клеточной терапии и/или трансплантации тканей, которые особенно высоки во время трансплантаций аллогенных клеток. Соответственно, HLA-E-положительные полученные из печени клетки-предшественники по настоящему изобретению, более вероятно, будут успешными в качестве клеточной терапии многочисленных заболеваний печени с улучшенной эффективностью и переносимостью для пациента.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения клетки-предшественники печени, популяции клеток или композиции, содержащие указанные клетки, также могут быть положительными по HLA-G или могут характеризоваться повышенным уровнем экспрессии HLA-G. Считается, что взаимодействие HLA-E и HLA-G может дополнительно усиливать иммуносупрессивное действие соответствующих клеток-предшественников печени, делая их более подходящими для

применения в подходах к клеточной терапии (Morandi, Pistoia, *Frontiers in Immunology* 2014).

В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения полученные из печени клетки-предшественники, популяции клеток или композиции, содержащие указанные клетки, дополнительно являются положительными по меньшей мере по одному мезенхимальному маркеру. Мезенхимальные маркеры включают без ограничения виментин, CD13, CD90, CD73, CD44, CD29, α -актин гладких мышц (ASMA) и CD140-b. В другом дополнительном варианте осуществления полученные из печени клетки-предшественники по настоящему изобретению секретируют HGF. В другом дополнительном варианте осуществления полученные из печени клетки-предшественники по настоящему изобретению являются отрицательными по HLA-DR. В дополнительном варианте осуществления полученные из печени клетки-предшественники необязательно являются положительными по меньшей мере по одному печеночному маркеру и/или необязательно характеризуются по меньшей мере одной специфической в отношении печени активностью. Печеночные маркеры включают без ограничения альбумин (ALB), HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 и альфа-1-антитрипсин. Специфические в отношении печени виды активности включают без ограничения секрецию мочевины, конъюгацию билирубина, секрецию альфа-1-антитрипсина и активность CYP3A4.

Во втором аспекте настоящее изобретение предусматривает способ получения HLA-E-положительных клеток-предшественников или стволовых клеток печени по п. 30. Более конкретно, способ включает стадию прекондиционирования клеток, которая относится к добавлению одного или более цитокинов в клеточную среду для культуры клеток-предшественников или стволовых клеток печени.

В предпочтительном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению является подходящей для применения по п. 24-29. В частности, композиция по настоящему изобретению предназначена для применения в лечении ряда заболеваний, при которых ее иммуносупрессивные свойства являются особенно полезными.

В другом аспекте в настоящем описании также описан способ лечения и/или предупреждения нарушений и заболеваний, при которых иммуносупрессивные свойства клеток, популяций клеток и/или композиций, раскрытых в данном документе,

особенно полезны, в том числе нарушений с нежелательными иммунными ответами, фиброзных нарушений и заболеваний печени. Нежелательные иммунные ответы включают, например, без ограничения воспаление, аутоиммунные заболевания и отторжение трансплантата.

Более конкретно, в настоящем изобретении предусмотрен способ, включающий введение клетки-предшественника или стволовой клетки, клеточной линии на их основе, популяции клеток и/или композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в таком лечении. Такое введение обычно осуществляется в терапевтически эффективном количестве, т.е. обычно в количестве, которое обеспечивает требуемый местный или системный эффект и эффективность.

В еще одном аспекте в настоящем изобретении также описано применение клетки-предшественника или стволовой клетки, клеточной линии на их основе, популяции клеток и/или композиции по настоящему изобретению для применения в терапии и/или для применения в производстве лекарственного препарата для лечения и/или предупреждения нарушений с нежелательными иммунными ответами, для лечения и/или предупреждения фиброзных нарушений, а также для лечения и/или предупреждения заболеваний печени. Такие заболевания могут включать нарушения, воздействующие на ткань печени, заболевания, воздействующие на жизнеспособность и/или функцию гепатоцитов, а также хроническую печеночную недостаточность, вызванную фибровоспалительными реакциями. Кроме того, благодаря иммуномодулирующим и иммуносупрессивным свойствам предусмотрено применение клетки-предшественника или стволовой клетки, клеточной линии на их основе, популяции клеток и/или композиции по настоящему изобретению для применения в терапии и/или для применения в производстве лекарственного препарата для лечения заболеваний, при которых следует избегать нежелательных иммунных ответов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фигуре 1**, **фигуре 2** и **фигуре 3** представлена экспрессия HLA-E клеток-предшественников печени по любому из различных вариантов осуществления настоящего изобретения.

На **фигуре 1** представлены данные анализа FACS, показывающие экспрессию белка HLA-E в различных условиях культивирования для клеток-предшественников печени,

выделенных от одного донора (VLK019), по сравнению с необработанным контрольным состоянием: IL-1 β /TNF α /IFN γ в комбинации, только IL-10 и IL-1 β /TNF α /IFN γ /IL-10 в комбинации («Все вместе»). Зеленая гистограмма «ISO» представляет собой изотипический контроль (исходный уровень, флуоресценция не выявлена, экспрессия HLA-E не выявлена).

На фигуре 2 представлены данные анализа FACS, показывающие экспрессию белка HLA-E в различных условиях культивирования для клеток-предшественников печени, выделенных от трех различных доноров, по сравнению с необработанным контрольным состоянием: IL-1 β /TNF α /IFN γ в комбинации, только IL-10 и IL-1 β /TNF α /IFN γ /IL-10 в комбинации («Все вместе»). Зеленая гистограмма представляет собой изотипический контроль (исходный уровень, флуоресценция не выявлена, экспрессия HLA-E не выявлена).

На фигуре 3 представлены данные анализа FACS, показывающие среднюю интенсивность флуоресценции ($n = 3$) для экспрессии HLA-E, выявленную в различных условиях культивирования по сравнению с необработанным контрольным состоянием: IL-1 β /TNF α /IFN γ в комбинации, только IL-10 и IL-1 β /TNF α /IFN γ /IL-10 в комбинации («Все вместе»). Подтвержден повышенный уровень экспрессии HLA-E в прекондиционированных клетках по сравнению с необработанными клетками.

На **фигуре 4** и **фигуре 5** представлены профили экспрессии генов HLA-E-положительных клеток-предшественников печени по любому из различных вариантов осуществления настоящего изобретения.

На фигуре 4 представлены данные RT-PCR, показывающие кратное увеличение экспрессии генов HLA-E и HLA-G в трех различных условиях культивирования по сравнению с необработанным контрольным состоянием (исходный уровень): IL-1 β /TNF α /IFN γ в комбинации, только IL-10 и IL-1 β /TNF α /IFN γ /IL-10 в комбинации («Все вместе»).

На фигуре 5 представлены данные RT-PCR, показывающие кратное увеличение экспрессии генов IDO1, HGF, PTGS2, IL-6 и IL-10 в прекондиционированных клетках-предшественниках печени согласно вариантам осуществления настоящего изобретения по сравнению с необработанным контролем (исходный уровень). Повышенные уровни экспрессии генов IDO1, PTGS2, IL-6 и/или IL-10 подтверждали, когда клетки

предварительно обрабатывали провоспалительными цитокинами, выбранными из IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-10 или их комбинаций.

На **фигуре 6** представлена количественная оценка уровня белка HLA-G, секретлируемого выделенными клетками-предшественниками печени, которые являются HLA-E-положительными по одному варианту осуществления настоящего изобретения.

На **фигуре 6** представлены данные анализа секреции, показывающие определяемые уровни растворимого HLA-G в супернатантах, выделенных из различных условий культивирования: необработанные (контрольное состояние), обработанные комбинацией IL-1 β /TNF α /IFN γ , только IL-10 или комбинацией IL-1 β /TNF α /IFN γ /IL-10 («Все вместе»). Клетки меланомы Боуэса человека (HMBC), трансфицированные плазмидой, несущей последовательность HLA-G человека, применяли в качестве положительного контроля («трансфицированные HMBC»). Эти данные подтверждают повышенную секрецию HLA-G прекоиндированными выделенными клетками-предшественниками печени, которые являются положительными по экспрессии HLA-E согласно вариантам осуществления настоящего изобретения.

На **фигуре 7** представлена секреция иммунорегуляторного фактора PGE2 в популяции клеток, содержащей HLA-E-положительные клетки-предшественники печени в различных вариантах осуществления настоящего изобретения.

На **фигуре 7** представлены данные анализа секреции, показывающие определяемые уровни PGE2 в супернатантах из различных условий, включая необработанные клетки-предшественники печени (контрольное состояние) и клетки-предшественники печени, которые прекоиндировали комбинацией IL-1 β /TNF α /IFN γ , только IL-10 или комбинацией IL-1 β /TNF α /IFN γ /IL-10 («Все вместе»). Повышенные уровни секреции наблюдали в прекоиндированных клетках согласно вариантам осуществления настоящего изобретения по сравнению с необработанным состоянием.

На **фигуре 8** представлены повышенные уровни ферментативной активности IDO1 в популяции клеток, содержащей HLA-E-положительные клетки-предшественники печени в различных вариантах осуществления настоящего изобретения.

Данные, полученные в ходе ферментативного анализа, показывающие определяемые уровни активности IDO в супернатантах из различных экспериментальных условий,

представлены на фигуре 8. Различные условия включают необработанные клетки-предшественники печени (контрольное состояние) и клетки-предшественники печени, которые прекоинкубировали комбинацией IL-1 β /TNF α /IFN γ , только IL-10 или комбинацией IL-1 β /TNF α /IFN γ /IL-10 («Все вместе»). Повышенную активность IDO наблюдали в прекоинкубированных клетках согласно вариантам осуществления настоящего изобретения.

На **фигурах 9A, 9B и 9C** представлена экспрессия HLA-E в популяции клеток-предшественников печени до и после кондиционирования.

На **фигурах 10A, 10B, 10C и 10D** представлен эффект композиций на основе клеток и клеток по настоящему изобретению в отношении цитолиза, опосредованного CD8 T-клетками.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к выделенным полученным из печени клеткам-предшественникам или стволовым клеткам, которые являются HLA-E-положительными, способу получения таких клеток, композициям, содержащим такие клетки, и их применению для лечения или предупреждения нарушений, в том числе нежелательных иммунных ответов, таких как воспаление, аутоиммунные заболевания и отторжение трансплантата, а также для лечения заболеваний печени.

Если не указано иное, то все термины, используемые в описании настоящего изобретения, в том числе технические и научные термины, имеют такое значение, в котором их обычно понимает специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Определения терминов включены как дополнительное руководство для лучшего понимания идей настоящего изобретения.

В рамках данного документа следующие термины имеют следующие значения.

Форма единственного числа, используемая в данном документе, относится как к одиночным, так и к множественным упоминаемым объектам, если из контекста явным образом не следует иное. В качестве примера, термин «компармент» относится к одному или более чем к одному компартменту.

Термин «приблизительно», используемый в данном документе, относящийся к такой измеримой величине, как параметр, количество, длительность во времени и т. п., подразумевается как охватывающий изменения $\pm 20\%$ или меньше, предпочтительно $\pm 10\%$ или меньше, более предпочтительно $\pm 5\%$ или меньше, еще более предпочтительно $\pm 1\%$ или меньше и даже еще более предпочтительно $\pm 0,1\%$ или меньше, от указанной величины и до тех пор, пока такие изменения соответствуют выполнимости раскрытого изобретения. Однако следует понимать, что значение, к которому относится модификатор «приблизительно», само также раскрывается отдельно.

Термины «содержать», «содержащий», «содержит», «состоит из», используемые в данном документе, являются синонимами терминов «включать», «включающий», «включает» или «вмещать», «вмещающий», «вещает» и представляют собой инклюзивные, или неограничивающие, термины, которые определяют наличие того, что следует за ними, например компонента, и не исключают или не препятствуют наличию дополнительных неперечисленных компонентов, признаков, элементов, деталей и стадий, известных из уровня техники или раскрытых в данном документе.

Приведение числовых диапазонов по крайним значениям включает все числа и доли, заключенные в пределах такого диапазона, а также приведенные крайние значения.

Выражение «% по весу», «весовой процент», «% веса» или «вес. %» в данном случае и во всем описании, если не указано иное, относится к относительному весу соответствующего компонента в расчете на общий вес состава.

Используемый в данном документе термин «выделенная клетка» обычно относится к клетке, которая не ассоциирована с одной или более клетками или одним или более клеточными компонентами, с которыми клетка ассоциирована *in vivo*. Например, выделенная клетка может быть удалена из своего естественного окружения или может быть результатом размножения, например размножения *ex vivo*, клетки, которая была удалена из своего естественного окружения.

Термин «*in vitro*», используемый в данном документе, означает внешний или наружный по отношению к телу животного или человека. Термин «*in vitro*», используемый в данном документе, следует понимать как включающий «*ex vivo*». Термин «*ex vivo*»

обычно относится к тканям или клеткам, удаленным из тела животного или человека и поддерживаемым или размноженным вне тела, например в культуральном сосуде.

Термин «клетка-предшественник печени» относится к неспециализированной и способной к пролиферации клетке, которая образуется путем культивирования клеток, выделенных из печени и которые или их потомство может дать начало по меньшей мере одному относительно более специализированному типу клеток. Клетки-предшественники печени дают начало потомкам, которые могут дифференцироваться по одной или более линиям с образованием более специализированных клеток (но предпочтительно гепатоцитов или гепатоактивных клеток), при этом такие потомки могут сами представлять собой клетки-предшественники или даже образовывать терминально дифференцированные клетки печени (например, полностью специализированные клетки, в частности клетки, обладающие морфологическими и функциональными характеристиками, сходными с таковыми у первичных гепатоцитов человека). Термин "стволовая клетка" относится к клетке-предшественнику, способной к самообновлению, т. е. может пролиферировать без дифференцировки, в результате чего потомство стволовой клетки или по меньшей мере ее части по сути сохраняет неспециализированный или относительно менее специализированный фенотип, потенциал дифференцировки и способность материнской стволовой клетки к пролиферации. Термин охватывает стволовые клетки, способные к практически неограниченному самообновлению, т. е. в которых способность потомства или его части к дальнейшей пролиферации существенно не снижается по сравнению с материнской клеткой, а также стволовые клетки, которые демонстрируют ограниченное самообновление, т. е., где способность потомства или его части к дальнейшей пролиферации явно снижена по сравнению с материнской клеткой.

На основании способности давать начало различным типам клеток, клетки-предшественники или стволовые клетки обычно можно описать как тотипотентные, плюрипотентные, мультипотентные или унипотентные. Одиночная «тотипотентная» клетка определяется как способная расти, т. е. развиваться в целый организм. «Плюрипотентная» клетка не способна вырасти в целый организм, но способна давать начало типам клеток, происходящим из всех трех зародышевых листков, т. е. мезодермы, энтодермы и эктодермы, и может давать начало всем типам клеток организма. «Мультипотентная» клетка способна давать начало по меньшей мере

одному типу клеток из каждого из двух или более различных органов или тканей организма, при этом указанные типы клеток могут происходить из одного и того же или из разных зародышевых листков, но не способны давать начало всем типам клеток организма. «Унипотентная» клетка способна дифференцироваться в клетки только одной клеточной линии.

Термин «мезенхимальные стволовые клетки» следует понимать как мультипотентные стромальные клетки, полученные или выделенные в основном из мезенхимальных или из стромальных клеток. Указанные мезенхимальные стволовые клетки способны дифференцироваться в различные типы клеток, включая без ограничения гепатоциты, остеобласты, хондроциты, теноциты и адипоциты.

Термин «гепатоцит» охватывает эпителиальные и паренхимные клетки печени, включая без ограничения гепатоциты различных размеров или пloidности (например, диплоидные, тетраплоидные, октаплоидные).

Термин «HLA-E-положительный», используемый в данном документе, относится к клеткам-предшественникам или стволовым клеткам печени, которые экспрессируют определяемый уровень белка HLA-E. Экспрессия HLA-E может быть внутриклеточной, на клеточной поверхности и/или в виде растворимого белка. Когда говорят, что клетка является положительной по определенному маркеру, это означает, что специалист в данной области сделает вывод о наличии или доказательстве отдельного сигнала, например, о выявлении или возможном выявлении антител с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией или проточной цитометрии к этому маркеру при проведении соответствующего измерения по сравнению с подходящими контролями. Если способ выявления позволяет количественно оценить маркер, положительные клетки могут в среднем генерировать сигнал, который значительно отличается от контроля, например без ограничения в по меньшей мере 0,5 раза, в по меньшей мере 1 раз, в по меньшей мере 1,5 раза выше, чем такой сигнал, генерируемый контрольными клетками, например в по меньшей мере 2 раза, в по меньшей мере 4 раза, в по меньшей мере 5 раз, в по меньшей мере 6 раз, в по меньшей мере 7 раз, в по меньшей мере 8 раз, в по меньшей мере 9 раз, в по меньшей мере 10 раз, в по меньшей мере 20 раз, в по меньшей мере 30 раз, в по меньшей мере 40 раз, в по меньшей мере 50 раз выше или даже выше.

Термин «повышенный» применительно к повышенной экспрессии, секреции или ферментативной активности, используемый в данном документе, определяет уровень экспрессии, секреции или ферментативной активности в результате прекондиционирования, который выше, чем исходный уровень экспрессии, секреции или ферментативной активности в аналогичных клетках, которые не подвергались какой-либо обработке, такой как, например, прекондиционирование, например, без ограничения в по меньшей мере 0,5 раза, в по меньшей мере 1 раз, в по меньшей мере 1,5 раза выше, чем такой сигнал, генерируемый контрольными клетками, например, в по меньшей мере 2 раза, в по меньшей мере 4 раза, в по меньшей мере 5 раз, в по меньшей мере 6 раз, в по меньшей мере 7 раз, в по меньшей мере 8 раз, в по меньшей мере 9 раз, в по меньшей мере 10 раз, в по меньшей мере 20 раз, в по меньшей мере 30 раз, в по меньшей мере 40 раз, в по меньшей мере 50 раз выше или даже выше.

Термин «печень» относится к органу печени. Термин «часть печени» обычно относится к образцу ткани, полученному из любой части органа печени, без какого-либо ограничения касательно количества указанной части или области органа печени, откуда она происходит. Предпочтительно все типы клеток, присутствующие в органе печени, также могут быть представлены в указанной части печени. Количество части печени может по меньшей мере частично исходить из практических соображений из необходимости получения достаточного количества первичных клеток печени для разумного применения способа по настоящему изобретению на практике. Следовательно, часть печени может представлять процент органа печени (например, по меньшей мере 1%, 10%, 20%, 50%, 70%, 90% или больше, обычно вес/вес). В других неограничивающих примерах часть печени может быть определена по весу (например, по меньшей мере 1 г, 10 г, 100 г, 250 г, 500 г или больше). Например, часть печени может представлять собой долю печени, например правую долю или левую долю, или любой сегмент или образец ткани, содержащий большое количество клеток, которые резецированы во время операции разделения печени или при биопсии печени.

Термин «печень взрослого» относится к печени субъектов, находящихся в постнатальном периоде, т. е. в любое время после рождения, предпочтительно доношенного, и может соответствовать возрасту, например, по меньшей мере 1 дню, 1 неделе, 1 месяцу или более 1 месяца после рождения или по меньшей мере 1, 5, 10 и более лет. Следовательно, «печень взрослого» или зрелая печень может быть

обнаружена у субъектов-людей, которые иным образом были бы описаны обычными терминами «младенец», «ребенок», «подросток» или «взрослый». Специалист в данной области поймет, что печень может достичь существенной зрелости в различные постнатальные интервалы времени у разных видов животных, и может правильно истолковать термин «печень взрослого» применительно к каждому виду.

Термин «млекопитающее» включает любое животное, классифицированное как таковое, включая без ограничения людей, домашних и сельскохозяйственных животных, животных зоопарка, спортивных животных, домашних питомцев, животных-компаньонов и экспериментальных животных, таких как, например, мыши, крысы, кролики, собаки, кошки, коровы, лошади, свиньи и приматы, например обезьяны и человекообразные обезьяны.

Используемый в данном документе термин «разъединение» обычно относится к частичному или полному нарушению клеточной организации ткани или органа, т. е. частичному или полному разрушению ассоциации между клетками и клеточными компонентами ткани или органа. Как может понять специалист в данной области, цель разъединения ткани или органа состоит в получении суспензии клеток (популяции клеток) из указанной ткани или органа. Суспензия может содержать отдельные или одиночные клетки, а также клетки, физически связанные с образованием кластеров или скоплений из двух или более клеток. Разъединение предпочтительно не вызывает или вызывает как можно меньшее снижение жизнеспособности клеток.

Используемый в данном документе термин «первичная клетка» включает клетки, присутствующие в суспензии клеток, полученных из ткани или органа субъекта, например печени, путем разъединения клеток, присутствующих в такой эксплантационной ткани или органе, с помощью соответствующих методик.

Термин «культивирование» является распространенным в данной области и в широком смысле относится к поддержанию и/или росту клеток и/или их потомства.

Термин «пассирование» является распространенным в данной области и относится к отсоединению и диссоциации культивируемых клеток от субстрата для культивирования и друг от друга. Для простоты пассаж, выполняемый после первого выращивания клеток в условиях адгезивной культуры, в данном документе называется «первым пассажем» (или пассажем 1, P1) в способе по настоящему изобретению.

Клетки можно пассировать по меньшей мере один раз, и предпочтительно два или более раз. Каждый пассаж, следующий за пассажем 1, упоминается в данном документе с номером, увеличивающимся на 1, например пассаж 2, 3, 4, 5 или P1, P2, P3, P4, P5 и т. д.

Используемый в данном документе термин «конфлюентность» относится к плотности культивируемых клеток, при которой клетки контактируют друг с другом, покрывая практически все поверхности, доступные для роста (т. е. полностью конфлюентные).

Термин «плазма» имеет традиционное определение и относится к композиции, которая не образует часть тела человека или животного.

Термин «сыворотка», при стандартном определении, получен из образца цельной крови, сначала давая возможность свернуться в образце, а затем отделяя образовавшийся таким образом сгусток и клеточные компоненты образца крови от жидкого компонента (сыворотки) с помощью соответствующей методики, обычно центрифугирования. Инертный катализатор, например стеклянные гранулы или порошок, может облегчать свертывание. Предпочтительно сыворотку можно приготовить с применением сосудов для разделения сыворотки (SST), которые содержат инертный катализатор для млекопитающих.

Термин «клеточная среда» или «среда для культивирования клеток» или «среда» относится к водной жидкости или гелеобразному веществу, содержащему питательные вещества, которые можно применять для поддержания или роста клеток. Среды для культивирования клеток могут содержать сыворотку или быть бессывороточными.

Используемый в данном документе термин «фактор роста» относится к биологически активному веществу, которое влияет на пролиферацию, рост, дифференцировку, выживание и/или миграцию различных типов клеток и может влиять на онтогенетические, морфологические и функциональные изменения в организме либо отдельно, либо при модулировании другими веществами. Фактор роста обычно может действовать с помощью связывания, в качестве лиганда, с рецептором (например, поверхностным или внутриклеточным рецептором), присутствующим в клетках. Фактор роста в данном документе может быть, в частности, белковой структурой, содержащей одну или более полипептидных цепей. Термин «фактор роста» охватывает представителей семейства факторов роста фибробластов (FGF), семейства костных

морфогенетических белков (BMP), семейства факторов роста тромбоцитов (PDGF), семейства трансформирующих факторов роста бета (TGF-бета), семейства факторов роста нервов (NGF), семейства эпидермального фактора роста (EGF), семейства инсулинозависимого фактора роста (IGF), семейства факторов роста гепатоцитов (HGF), семейства интерлейкина-6 (IL-6) (например, онкостатин М), гематопоэтических факторов роста (HeGF), тромбоцитарного фактора роста эндотелиальных клеток (PD-ECGF), ангиопоэтина, семейства факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) или глюкокортикоидов. Если способ применяется в отношении клеток печени человека, фактор роста, применяемый в способе настоящего изобретения, может представлять собой фактор роста человека или рекомбинантный фактор роста. Применение человеческих и рекомбинантных факторов роста в способе настоящего изобретения является предпочтительным, поскольку ожидается, что такие факторы роста будут вызывать требуемый эффект в отношении клеточной функции.

Используемый в данном документе термин «прекондиционированные» клетки-предшественники или стволовые клетки печени определяется как клетка-предшественник или стволовая клетка печени, подвергнутая *in vitro* воздействию одной или более сигнальных молекул. Предпочтительно указанные молекулы добавляются в клеточную среду указанных клеток на предварительно определенный период времени.

Термин «цитокин», используемый в данном документе, относится к сигнальной молекуле, такой как фактор роста, дифференцировки или хемотрофный фактор, секретируемый иммунными или другими клетками, действие которых распространяется на клетки иммунной системы или на мультипотентные клетки, такие как без ограничения Т-клетки, В-клетки, NK-клетки, макрофаги, мультипотентные клетки, включая гемопоэтические клетки, мезенхимальные стволовые клетки и клетки-предшественники, или другие типы клеток. Типичные цитокины включают без ограничения индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO), фактор роста гепатоцитов (HGF), группу, состоящую из интерлейкинов, таких как без ограничения интерлейкин-1 альфа (IL-1 α), интерлейкин-1 бета (IL-1 β), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10), интерфероны, такие как интерферон-альфа (IFN α) и интерферон-гамма (IFN γ), фактор некроза опухоли-альфа (TNF α) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

Термины «клеточная популяция» и «популяция клеток» обычно относятся к группе клеток. Если не указано иное, термин относится к группе клеток, состоящей по сути из клеток, определенных в данном документе, или включающей их. Популяция клеток может состоять по сути из клеток, характеризующихся общим фенотипом, или может содержать по меньшей мере часть клеток, характеризующихся общим фенотипом. Считается, что клетки имеют общий фенотип, когда они в значительной степени похожи или идентичны по одной или более очевидным характеристикам, включая без ограничения морфологический вид, уровень экспрессии определенных клеточных компонентов или продуктов (например, РНК или белков), активность определенных биохимических путей, способность к пролиферации и/или кинетику, потенциал дифференцировки и/или ответ на сигналы дифференцировки или поведение во время культивирования *in vitro* (например, адгезию или рост монослоя). Таким образом, такие очевидные характеристики могут определять популяцию клеток или ее часть. Популяция клеток может быть «по сути гомогенной», если подавляющее большинство клеток характеризуется общим фенотипом. «По сути гомогенная» популяция клеток может содержать по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или даже по меньшей мере 99% клеток, характеризующихся общим фенотипом, таким как конкретно указанный фенотип (например, фенотип клеток-предшественников или стволовых клеток печени по настоящему изобретению или потомков клеток-предшественников или стволовых клеток печени по настоящему изобретению). Более того, популяция клеток может состоять по сути из клеток, характеризующихся общим фенотипом, таким как фенотип клеток-предшественников или стволовых клеток печени по настоящему изобретению (т. е. потомков клеток-предшественников или стволовых клеток печени по настоящему изобретению), если какие-либо другие клетки, присутствующие в популяции, не изменяют и не оказывают существенного влияния на общие свойства популяции клеток, и поэтому она может быть определена как линия клеток.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель», используемый в данном документе, относится к носителю или разбавителю, который не вызывает значительного раздражения у субъекта и не устраняет биологическую активность и свойства вводимой композиции. Примерами носителей без ограничений являются пропиленгликоль, физиологический раствор, эмульсии и смеси органических растворителей с водой.

Термин «достаточное количество» означает количество, достаточное для получения требуемого и измеримого эффекта, например количество, достаточное для изменения профиля экспрессии белка.

Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, которое эффективно для облегчения симптома заболевания. Терапевтически эффективное количество может представлять собой «профилактически эффективное количество», так как профилактика может рассматриваться в качестве терапии.

Термин «лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупреждающим мерам, цель которых заключается в том, чтобы предупредить или замедлить (уменьшить) подлежащее направленному воздействию патологическое состояние или нарушение. Нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже имеется нарушение, а также тех, кто предрасположен к нарушению, или тех, у которых нарушение подлежит предупреждению.

Термин «аллогенный», используемый в данном документе, означает, что донорский материал поступает от индивидуума, отличного от реципиента. Аллогенная трансплантация стволовых клеток представляет собой процедуру, при которой человек получает стволовые клетки от генетически похожего, но не идентичного донора.

Термин «фиброз», используемый в данном документе, относится к образованию избыточной волокнистой соединительной ткани в органе или ткани при репаративном или реактивном процессе.

Термин «фиброз печени» относится к накоплению интерстициального или «рубцового» внеклеточного матрикса после острого или хронического повреждения печени. Цирроз, терминальная стадия прогрессирующего фиброза, характеризуется образованием перегородки и рубцовыми кольцами, окружающими узелки гепатоцитов. Обычно требуются годы или десятилетия, чтобы фиброз стал клинически очевидным, однако заметные исключения, при которых цирроз развивается в течение нескольких месяцев, могут включать заболевания печени у детей (например, атрезию желчных путей), лекарственные заболевания печени и вирусный гепатит, ассоциированный с иммуносупрессией после трансплантации печени.

Термин «гMFI» или относительная медианная интенсивность флуоресценции представляет собой соотношение между интенсивностью флуоресценции, измеренной при применении антитела к конкретной мишени, и интенсивностью, полученной от контрольного антитела (изотипического контроля).

Термин «генная инженерия», «генетическая модификация» или «генетическая манипуляция» означает прямое манипулирование генами организма с применением биотехнологии. Это набор технологий, применяемых для изменения генетического состава клеток, включая перенос генов внутри и за пределы видовых границ с получением улучшенных или новых организмов. Новую ДНК получают либо путем выделения и копирования генетического материала, представляющего интерес, с применением способов рекомбинантной ДНК, либо путем искусственного синтеза ДНК. Обычно создается конструкция и применяется для вставки этой ДНК в организм-хозяин.

Термин «редактирование генома» или «инженерия генома» представляет собой тип генной инженерии, при котором ДНК вставляется, удаляется, модифицируется или заменяется в геноме живого организма. В отличие от ранних методик генной инженерии, которые случайным образом вставляют генетический материал в геном хозяина, редактирование генома нацелено на вставки в определенные положения.

В первом аспекте настоящее изобретение предусматривает композиции полученных из печени взрослого человека клеток-предшественников или стволовых клеток, где по меньшей мере 60% указанных предшественников или стволовых клеток экспрессируют маркер клеточной поверхности HLA-E, или выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени является HLA-E-положительной.

Показано, что индукция экспрессии HLA-E в выделенной полученной из печени клетке-предшественнике значительно усиливает ее иммуносупрессивные свойства. Указанные клетки, экспрессирующие HLA-E, были защищены от цитолиза, опосредованного CD8⁺ Т-клетками. Не ограничиваясь теорией, считается, что иммуносупрессивные свойства HLA-E-положительных клеток-предшественников обусловлены способностью HLA-E регулировать цитотоксическую активность естественных клеток-киллеров. Следовательно, HLA-E-положительные клетки-предшественники являются особенно подходящими для лечения и/или предупреждения

нарушений, включающих нежелательные иммунные ответы, например без ограничения воспаление, аутоиммунное заболевание и отторжение трансплантата, включая многочисленные заболевания печени.

Считается, что эти клетки-предшественники способны сохранять свою способность к пролиферации, а инкубация в определенных средах позволяет клеткам специфически дифференцироваться в специфические в отношении печени типы клеток. Их способность к пролиферации и специфичность в отношении печени приводят к повышению эффективности и безопасности трансплантации клеток печени. Кроме того, в связи со своим происхождением из взрослого организма эти стволовые клетки устраняют иммунологические, этические и канцерогенные проблемы, ассоциированные с эмбриональными клетками.

Усиленный иммуносупрессивный характер клеток-предшественников по настоящему изобретению способствует снижению связанных с иммунным ответом рисков клеточной терапии и/или трансплантации тканей, которые особенно высоки во время трансплантации аллогенных клеток. Соответственно, HLA-E-положительные полученные из печени клетки-предшественники по настоящему изобретению, более вероятно, будут успешными в качестве клеточной терапии для нарушений с нежелательными иммунными ответами, например без ограничения воспаления, аутоиммунного заболевания и отторжения трансплантата, а также многочисленных заболеваний печени, и с улучшенной эффективностью и переносимостью для пациента.

В конкретном варианте осуществления настоящим изобретением предусмотрена клетка-предшественник печени человека, которая является HLA-E-положительной, предпочтительно клетка-предшественник печени взрослого человека, которая является HLA-E-положительной.

Для целей настоящего изобретения термины «экспрессия HLA-E» или «HLA-E-положительные клетки» определяются в виде экспрессии, которая выше, чем исходная экспрессия HLA-E, которая может наблюдаться в первичных необработанных клетках дикого типа. Соответственно, указанные клетки характеризуются повышенными уровнями экспрессии HLA-E по сравнению с исходной экспрессией HLA-E в необработанных клетках-предшественниках или стволовых клетках. Следовательно, в настоящем изобретении в равной степени предусмотрена композиция клеток-

предшественников или стволовых клеток, выделенных из печени, которые характеризуются повышенными уровнями экспрессии HLA-E по сравнению с исходным уровнем. Исходная экспрессия HLA-E может быть связана с отсутствием экспрессии, а также с наименьшим уровнем экспрессии в отсутствие стимула, который усиливает экспрессию HLA-E. Повышенный уровень экспрессии относится, например, без ограничения к уровню экспрессии, который измеряется в по меньшей мере 1,5 раза выше, чем при измерении экспрессии контрольными клетками, например в по меньшей мере 2 раза, в по меньшей мере 4 раза, в по меньшей мере 10 раз, в по меньшей мере 20 раз, в по меньшей мере 30 раз, в по меньшей мере 40 раз, в по меньшей мере 50 раз выше или даже выше.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композиции полученных из печени взрослого человека клеток-предшественников или стволовых клеток, где по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% указанных клеток-предшественников или стволовых клеток экспрессируют маркер клеточной поверхности HLA-E.

В другом или дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к композициям или клеткам-предшественникам или стволовым клеткам печени, где клетки, экспрессирующие HLA-E, характеризуются относительной медианной интенсивностью флуоресценции (rMFI) HLA-E, составляющей по меньшей мере 6,5, измеренной с применением проточной цитометрии. rMFI представляет собой соотношение, полученное делением медианной интенсивности флуоресценции мишени на медианную интенсивность флуоресценции контроля. rMFI обычно считается стабильным параметром, который не подлежит изменению. В контексте настоящего изобретения применяется антитело к HLA-E (человека). Примером подходящего антитела является клон REA1031 антитела к HLA-E от Miltenyi. Возможный проточный цитометр представляет собой анализатор MACSQuant®.

В дополнительном варианте осуществления клетки, экспрессирующие HLA-E, демонстрируют относительную медианную интенсивность флуоресценции (rMFI) HLA-E, составляющую по меньшей мере 7, более предпочтительно по меньшей мере 8,

более предпочтительно по меньшей мере 9, более предпочтительно по меньшей мере 10, измеренную с применением проточной цитометрии. В другом варианте осуществления указанная гMFI составляет от 6,5 до 15, более предпочтительно от 6,5 до 14, более предпочтительно от 6,5 до 13, более предпочтительно от 6,5 до 13, более предпочтительно от 6,5 до 12.

Другим белком, участвующим в индукции иммунной толерантности, является HLA-G. Подобно HLA-E, HLA-G также может запускать ингибирующий рецептор естественных клеток-киллеров и оказывать иммуносупрессивную функцию. Сообщалось, что HLA-E и HLA-G функционируют вместе. Соответственно, и в следующем варианте осуществления настоящего изобретения клетки-предшественники печени дополнительно являются положительными по HLA-G. Взаимодействие HLA-E и HLA-G дополнительно усиливает иммуносупрессивное действие соответствующих клеток-предшественников печени, делая их более подходящими для применения в подходах клеточной терапии.

В одном варианте осуществления клеточная популяция или композиция согласно настоящему изобретению будет характеризоваться более высокой секрецией HLA-G.

В другом варианте осуществления клетки по настоящему изобретению, популяции и композиции, содержащие указанные клетки, могут быть положительными по меньшей мере по одному мезенхимальному маркеру. Мезенхимальные маркеры включают без ограничения виментин, CD13, CD90, CD73, CD44, CD29, α -актин гладких мышц (ASMA) и CD140b. В дополнительном варианте осуществления клетки по настоящему изобретению, популяции и композиции, содержащие указанные клетки, секретируют HGF. В другом дополнительном варианте осуществления клетки по настоящему изобретению, популяции и композиции, содержащие указанные клетки, являются отрицательными по HLA-DR. В дополнительном варианте осуществления указанные популяции и композиции дополнительно необязательно являются положительными по по меньшей мере одному печеночному маркеру и/или маркеру, связанному по меньшей мере с одной специфической в отношении печени активностью. Например, печеночные маркеры включают без ограничения альбумин (ALB), HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 и альфа-1-антитрипсин. Специфические в отношении печени виды активности включают без ограничения секрецию мочевины, конъюгацию билирубина, секрецию альфа-1-антитрипсина, активность CYP3A4. Присутствие этих

маркеров/активностей дополнительно обеспечивает происхождение из печени, мультипотентность и поддержание функциональности печени выделенных клеток-предшественников или стволовых клеток печени.

В одном варианте осуществления клетки также можно охарактеризовать с точки зрения являющихся

a. положительными по α -актину гладких мышц (ASMA), CD140b и необязательно альбумину (ALB);

b. отрицательными по содержащему Sushi-домену белку 2 (SUSD2) и цитокератину-19 (CK-19).

В дополнительном варианте осуществления подтверждено, что указанные клетки экспрессируют CD90, CD73, виментин, ASMA, CD140b и CD13 и секретируют HGF.

В дополнительном или другом варианте осуществления клетки также можно охарактеризовать или измерить как положительные по

a. по меньшей мере одному печеночному маркеру, выбранному из HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 и CYP3A4 и необязательно альбумина; и/или

b. по меньшей мере одному мезенхимальному маркеру, выбранному из виментина, CD90, CD73, CD44 и CD29; и/или

c. по меньшей мере одной специфической в отношении печени активности, выбранной из секреции мочевины, конъюгации билирубина, секреции альфа-1-антитрипсина и активности CYP3A4; и/или

d. по меньшей мере одному маркеру, выбранному из ATP2B4, ITGA3, TFRC, SLC3A2, CD59, ITGB5, CD151, ICAM1, ANPEP, CD46 и CD81; и/или

e. по меньшей мере одному маркеру, выбранному из MMP1, ITGA11, FMOD, KCND2, CCL11, ASPN, KCNK2 и HMCN1.

В другом варианте осуществления клетки дополнительно тестируют и подтверждаются как отрицательные по маркерам CD133, CD45, CK19 и/или CD31.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения полученные из печени клетки-предшественники дополнительно характеризуются повышенными уровнями секреции простагландина E2 (PGE2) по сравнению с исходным уровнем секреции PGE2, выявленным в необработанных полученных из печени клетках-предшественниках или стволовых клетках.

В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения клетки-предшественники печени дополнительно характеризуются повышенными уровнями ферментативной активности индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) по сравнению с исходной ферментативной активностью, выявленной в необработанных клетках-предшественниках или стволовых клетках печени.

В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения полученные из печени клетки-предшественники дополнительно характеризуются повышенными уровнями экспрессии одного или более цитокинов или иммуномодулирующих факторов, принадлежащих к группе, состоящей из IDO, простагландинэндопероксидсинтазы 2 (PTGS2), интерлейкина-6 (IL-6) и/или IL-10 по сравнению с исходным уровнем экспрессии, выявленным в необработанных клетках-предшественниках или стволовых клетках печени.

PTGS2 участвует в продуцировании PGE2, в то время как IDO, PGE2, IL-6, IL-10 и HGF представляют собой секретлируемые факторы с иммунорегуляторными свойствами. Их отдельные или комбинированные повышенные уровни экспрессии, секреции и/или ферментативной активности дополнительно способствуют иммуносупрессивным и иммуномодулирующим свойствам полученных из печени клеток-предшественников по настоящему изобретению. Следовательно, клетки согласно вышеупомянутым вариантам осуществления характеризуются более сильными иммуномодулирующими свойствами и более безопасны для применения в видах клеточной терапии, особенно в видах терапии, включающей трансплантацию аллогенных клеток.

В одном варианте осуществления указанная композиция или популяция клеток могут содержать приблизительно 50% или больше, приблизительно 60% или больше, приблизительно 65% или больше, приблизительно 70% или больше, приблизительно 80% или больше или приблизительно 90% или больше клеток-предшественников или стволовых клеток или представлять собой по сути гомогенную или гомогенную

популяцию указанных клеток-предшественников или стволовых клеток. Иммуносупрессивные свойства композиции или популяции клеток дополнительно усиливаются с помощью увеличения количества клеток-предшественников или стволовых клеток в указанной популяции.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель выбирают так, что при этом клетки по настоящему изобретению остаются жизнеспособными и сохраняют свои иммуномодулирующие свойства. Носитель может представлять собой фармацевтически приемлемый растворитель или диспергирующую среду, содержащие, например, воду, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Таким образом, в настоящем изобретении раскрывается фармацевтическая композиция, содержащая выделенные клетки-предшественники или стволовые клетки печени, описанные выше, клеточные линии на их основе или содержащая их популяция клеток.

Предпочтительно композиция, содержащая выделенные клетки-предшественники печени по настоящему изобретению, может содержать по меньшей мере 10^3 , 10^6 , 10^9 или больше клеток (например, от 5 миллионов до 500 миллионов, или от 5 миллионов до 250 миллионов, или от 50 миллионов до 500 миллионов, или от 50 миллионов до 250 миллионов, или от 100 миллионов до 500 миллионов, или от 100 миллионов до 250 миллионов клеток на каждую дозу или введение). Такие клеточные композиции могут также включать другие средства биологического (например, антитела или фактор роста) или химического происхождения (например, лекарственные средства, соединения, сохраняющие клетки или метящие их), которые могут обеспечивать дополнительный терапевтический, диагностический или любой другой полезный эффект. В литературе представлено несколько примеров необязательных добавок, наполнителей, основ и/или носителей, которые совместимы с клеточными фармацевтическими композициями, которые могут включать дополнительные специфичные буферы, факторы роста или вспомогательные средства, где количество каждого компонента композиции определено (в микрограммах/миллиграммах, объеме или процентах), а также средств их объединения с клетками-предшественниками печени.

В дополнительном варианте осуществления композиции по настоящему изобретению могут быть предусмотрены в виде фармацевтических композиций, которые можно применять в терапевтических способах введения *in vivo* (у людей или в животных моделях) или в путях применения *in vitro* в форме композиции, содержащей такие клетки либо в виде свежих клеток, либо клеток, подходящих для длительного хранения (например, криоконсервированных клеток).

В другом или дополнительном варианте осуществления композиция по настоящему изобретению может быть предусмотрена в виде суспензии клеток, губки или другой трехмерной структуры, в которой клетки могут расти и дифференцироваться *in vitro* и/или *in vivo*, включая биоискусственные устройства для печени, природные или синтетические матрицы, или другие системы, способствующие приживлению и функциональности клеток в соответствующих положениях (включая области воспаления или повреждения тканей, которые экспрессируют хемокины, которые способствуют хоумингу и приживлению клеток). В частности, композицию по настоящему изобретению можно вводить посредством инъекции (включая также катетерное введение, внутривенно или внутриартериально) или имплантации, например, локализованной инъекции, системной инъекции, внутриселезеночной инъекции, внутрисуставной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, внутрипортальной инъекции, инъекции в пульпу печени, например под капсулу печени, парентерального введения или внутриматочной инъекции в эмбрион или плод.

Клетки, композиции и популяции клеток согласно настоящему изобретению могут быть получены различными способами.

В одном варианте осуществления указанные стволовые клетки или клетки-предшественники по настоящему изобретению и присутствующие в композиции или популяции клеток, содержат экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую HLA-E. Последовательность HLA-E человека известна под ID гена 3133 в NCBI. Введение указанной экзогенной нуклеиновой кислоты может осуществляться с помощью методик генной инженерии, обычно известных из уровня техники. Указанная экзогенная нуклеиновая кислота может представлять собой, например, конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую вектор, индуцибельный промотор, последовательность, кодирующую белковый продукт, представляющий интерес, и т. д.). Из уровня техники известны различные векторы (например, плазмиды, векторы

экспрессии, ретровирусные векторы и т. д.) для доставки последовательностей в клетку. В одном варианте осуществления вектор представляет собой ретровирусный или лентивирусный вектор.

Для трансфекции целевых клеток можно применять различные методики, известные из уровня техники, например электропорацию, осаждение ДНК кальцием, слияние, трансфекцию, липофекцию и т. п. Конкретный способ введения ДНК не имеет решающего значения для практического осуществления настоящего изобретения. Могут быть применены комбинации ретровирусов и подходящей упаковывающей линии, где белки капсида будут функциональными для того, чтобы инфицировать целевые клетки. Обычно клетки и вирус инкубируют в среде для культивирования в течение по меньшей мере 24 часов. Обычно применяемые ретровирусные векторы являются "дефектными", т. е. не способными продуцировать вирусные белки, необходимые для продуктивной инфекции. Репликация вектора требует роста линии упаковывающих клеток.

Белковые продукты, представляющие интерес, также могут быть выбраны для облегчения выявления и/или отбора популяций клеток-предшественников или стволовых клеток, описанных в данном документе. Для выявления или отбора стволовых клеток выявляющую конструкцию вводят в клетку или популяцию клеток, которые предположительно являются стволовыми клетками или содержат их. После введения конструкции экспрессии клетки выдерживают в течение периода времени, достаточного для экспрессии выявляемого маркера, обычно по меньшей мере приблизительно 12 часов, но не более приблизительно 2 недель, и он может составлять от приблизительно 1 дня до приблизительно 1 недели.

После экспансии генетические конструкции могут быть удалены из целевых клеток. Это может быть достигнуто путем применения временной векторной системы или путем включения сайта гетерологичной рекомбинации, фланкирующего требуемую кодирующую последовательность белка. Предпочтительно выявляемый маркер, например зеленый флуоресцентный белок, люцифераза, белки клеточной поверхности, подходящие для способов отбора антител, и т. д. включены в вектор экспрессии таким образом, что после делеции конструкции можно легко выделить клетки, в которых отсутствует экзогенная последовательность.

Можно применять векторы экспрессии, которые обеспечивают временную или длительную экспрессию в клетках млекопитающих. Как правило, временная экспрессия включает применение вектора экспрессии, который способен эффективно реплицироваться в клетке-хозяине таким образом, что клетка-хозяин накапливает множество копий вектора экспрессии и, в свою очередь, синтезирует высокие уровни требуемого полипептида, кодируемого вектором экспрессии. Системы временной экспрессии, содержащие подходящий вектор экспрессии и клетку-хозяина, обеспечивают удобную кратковременную экспансию клеток, но не влияют на долговременный генотип клетки.

В некоторых вариантах осуществления выбранные клетки поддерживают в культуре в течение по меньшей мере одного пассажа, обычно по меньшей мере приблизительно двух пассажей; по меньшей мере приблизительно трех пассажей или более и не более приблизительно 10 пассажей, обычно не более приблизительно семи пассажей. После такого культивирования клетки сортируют в отношении экспрессии выявляемого маркера, описанного выше.

В одном варианте осуществления указанную экзогенную нуклеиновую кислоту вводят в указанные клетки посредством целевого редактирования генома. Обычными способами, применяемыми для целевого редактирования генома, являются применение нуклеаз, таких как мегануклеазы, нуклеазы с цинковыми пальцами, нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN), и системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR/Cas9). В предпочтительном варианте осуществления систему CRISPR/Cas9 применяют для введения HLA-E в указанные стволовые клетки или клетки-предшественники.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ получения HLA-E-положительных клеток-предшественников или стволовых клеток печени посредством прекондиционирования или стимуляции. В частности, способ включает стадию прекондиционирования клеток, которая относится к добавлению одного или более цитокинов в клеточную среду для культуры клеток-предшественников или стволовых клеток печени.

В предпочтительном варианте осуществления такой способ включает стадии:

- (a) разъединения взрослой печени или ее части с образованием популяции первичных клеток печени;
- (b) получения препаратов на основе первичных клеток печени со стадии (a);
- (c) культивирования клеток, содержащихся в препаратах со стадии (b), на подложке, которая обеспечивает адгезию и рост клеток на ней и образование популяции клеток;
- (d) пассирования клеток со стадии (c) по меньшей мере один раз;
- (e) при одном пассаже со стадии (d), предпочтительно при последнем пассаже со стадии (d), преколонизирования клеток одним или более цитокинами и
- (f) сбора популяции клеток, полученной после преколонизирования со стадии (e).

В дополнительном варианте осуществления экспрессия HLA-E необязательно измеряется в клетках, полученных на стадии (f), и при необходимости выполняется дополнительный отбор этих клеток.

Исходная экспрессия HLA-E может быть связана с отсутствием экспрессии, а также с наименьшим уровнем экспрессии в отсутствие экзогенных цитокинов в среде.

Касательно стадии (a) способа, стадия диссоциации включает получение печени или ее части, которая содержит наряду с полностью дифференцированными гепатоцитами некоторое количество первичных клеток, которые можно применять для получения клеток-предшественников или стволовых клеток печени.

Печень или ее часть получают от «субъекта», «субъекта-донора» или «донора», что взаимозаменяемо относится к позвоночному животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку. Часть печени может представлять собой образец ткани, полученный из любой части печени, и может содержать различные типы клеток, присутствующие в печени. Клетки согласно настоящему изобретению предпочтительно выделяют из печени или части печени млекопитающих, при этом термин «млекопитающее» относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, включая людей, домашних и сельскохозяйственных животных, а также животных из зоопарков, лабораторий, спорта или домашних питомцев, таких как собаки, лошади, кошки, коровы, мыши, крысы,

кролики и т. д. Более предпочтительно клетку-предшественник или стволовую клетку печени выделяют из печени человека или ее части, предпочтительно печени взрослого человека или ее части. Клетки-предшественники печени или клеточные линии или их потомки, полученные согласно настоящему изобретению из печени взрослых субъектов-людей, могут быть успешно применены, например, в исследованиях и в терапии пациентов, особенно пациентов-людей, страдающих нарушениями, включающими нежелательные иммунные ответы, например без ограничения воспаление, аутоиммунное заболевание и отторжение трансплантата, включая заболевания печени. В отличие от других источников стволовых клеток, таких как, например, эмбриональные стволовые клетки, склонные к опухолевому росту, стволовые клетки, полученные из печени взрослых, снижают риск канцерогенного отклонения, делая их более безопасными для применения в трансплантации клеток.

В альтернативном варианте осуществления настоящего изобретения печень взрослого или ее часть может быть получена от субъекта-животного, отличного от человека, предпочтительно от субъекта-млекопитающего, отличного от человека. Клетки-предшественники, или стволовые клетки, или клеточные линии, или их потомки, полученные, как описано в данном документе, из печени субъектов-животных, отличных от человека, или субъектов-млекопитающих, отличных от человека, могут быть предпочтительно применены, например, в исследованиях и в терапии заболеваний печени у тех же представителей, родственных или других видов животных, отличных от человека, или млекопитающих, отличных от человека, или даже в терапии пациентов-людей, страдающих заболеванием печени (например, ксенотрансплантация, биоискусственные устройства для печени, содержащие клетки животных, отличных от человека, или клетки млекопитающих, отличных от человека). В качестве примера и без ограничения, особенно подходящие клетки млекопитающих, отличных от человека, для применения в терапии человека, могут происходить от свиней.

Субъект-донор может быть живым или мертвым, что определяется общепринятыми критериями, такими как, например, критерии «сердце-легкие» (обычно включающие необратимое прекращение функций кровообращения и дыхания) или критерии «смерти головного мозга» (обычно включающие необратимое прекращение всех функций всего головного мозга, включая ствол мозга). Сбор может включать процедуры, известные из уровня техники, такие как, например, биопсия, резекция или иссечение.

Специалист в данной области поймет, что по меньшей мере некоторые аспекты получения печени или ее части у субъектов-доноров могут регулироваться соответствующими правовыми и этическими нормами. В качестве примера и без ограничения может потребоваться, чтобы забор ткани печени у живого донора-человека было совместим с поддержанием дальнейшей жизни донора. Соответственно, только часть печени обычно может быть удалена у живого донора-человека, например, с помощью биопсии или резекции таким образом, что у донора поддерживается соответствующий уровень физиологических функций печени. С другой стороны, забор печени или ее части у животного, отличного от человека, может, но не обязательно, быть совместимым с дальнейшим выживанием животного, отличного от человека. Например, животное, отличное от человека, может быть гуманно уничтожено после сбора ткани. Эти и аналогичные соображения будут очевидны для специалиста в данной области и отражают правовые и этические стандарты.

Печень или ее часть могут быть получены от донора, предпочтительно человека-донора, у которого имеется устойчивое кровообращение, например бьющееся сердце, и устойчивые дыхательные функции, например дыхание легких или искусственная вентиляция легких. В соответствии с этическими и правовыми нормами, у донора может быть или не обязательно быть мертвым головной мозг (например, удаление всей печени или ее части, что было бы несовместимо с дальнейшим выживанием донора-человека, может быть разрешено в случае смерти головного мозга людей). Получение печени или ее части от таких доноров является предпочтительным, поскольку ткань не страдает значительной аноксией (недостатком оксигенации), которая обычно возникает в результате ишемии (прекращения кровообращения).

В качестве альтернативы печень или ее часть могут быть получены от донора, предпочтительно донора-человека, у которого во время сбора ткани прекратилось кровообращение, например у него не бьется сердце, и/или у которого прекратились дыхательные функции, например характеризующегося недышащими легкими и отсутствием искусственной вентиляции легких. Хотя печень или ее часть от этих доноров могла пострадать, по меньшей мере, от некоторой степени аноксии, жизнеспособные клетки-предшественники или стволовые клетки также могут быть выделены из таких тканей. Печень или ее часть можно собирать в течение приблизительно 24 часов после прекращения кровообращения (например,

сердцебиения) донора, например, в течение приблизительно 20 часов, например в течение приблизительно 16 часов, более предпочтительно в течение приблизительно 12 часов, например в течение приблизительно 8 часов, даже более предпочтительно в течение приблизительно 6 часов, например в течение приблизительно 5 часов, в течение приблизительно 4 часов или в течение приблизительно 3 часов, еще более предпочтительно в течение приблизительно 2 часов и наиболее предпочтительно в течение приблизительно 1 часа, как, например, в течение приблизительно 45, 30 или 15 минут после прекращения кровообращения (например, сердцебиения) донора.

Собранные ткани можно охладить до приблизительно комнатной температуры или до температуры ниже комнатной, но обычно избегают замораживания ткани или ее частей, особенно в тех случаях, когда такое замораживание может привести к нуклеации или росту кристаллов льда. Например, ткань можно хранить при любой температуре от приблизительно 1°C до комнатной, от приблизительно 2°C до комнатной, от приблизительно 3°C до комнатной или от приблизительно 4°C до комнатной и можно предпочтительно хранить при температуре приблизительно 4°C. Ткань также можно хранить «на льду», как известно из уровня техники. Ткань может охлаждаться в течение всего или части времени ишемии, т. е. времени после прекращения кровообращения у донора. Иными словами, ткань может быть подвергнута теплой ишемии, холодной ишемии или комбинации теплой и холодной ишемии. Собранная ткань может храниться таким образом, например, до 48 часов перед обработкой, предпочтительно в течение менее 24 часов, например менее 16 часов, более предпочтительно менее 12 часов, например менее 10 часов, менее 6 часов, менее 3 часов, менее 2 часов или менее 1 часа.

Собранную ткань можно предпочтительно, но не обязательно, хранить, например, полностью или по меньшей мере частично погруженной в подходящую среду, и/или ее можно, но не обязательно, перфузировать подходящей средой перед дальнейшей обработкой ткани. Специалист в данной области может выбрать подходящую среду, которая может поддерживать выживание клеток ткани в течение периода до обработки.

Выделение клеток-предшественников или стволовых клеток из печени или части печени выполняется способами, известными из уровня техники, например, описанными в EP1969118, EP3039123, EP3140393 или WO2017149059.

Вкратце, сначала получают популяцию первичных клеток печени путем разъединения печени или ее части с получением популяции первичных клеток из указанной печени или ее части. Затем клетки, содержащиеся в этом препарате, культивируют в адгезивных условиях, предпочтительно, чтобы обеспечить адгезию и рост клеток на подложке. Затем эти клетки пассируют по меньшей мере один раз, предпочтительно при 70% конфлюентности. Наконец, выделяют клетки, которые являются положительными по по меньшей мере одному печеночному маркеру и по по меньшей мере одному мезенхимальному маркеру и которые характеризуются по меньшей мере одной специфической в отношении печени активностью.

Подходящим способом разъединения печени или ее части с получением популяции (суспензии) первичных клеток из нее может быть любой способ, хорошо известный из уровня техники, включая без ограничения ферментативное переваривание, механическое разделение, фильтрацию, центрифугирование и их комбинации.

Касательно стадии (b) способа, популяция первичных клеток, определенная и полученная в данном документе, путем разъединения печени или ее части, обычно может быть гетерогенной, т. е. может содержать клетки, принадлежащие к одному или более типам клеток, принадлежащих любому типу клеток, составляющих печень, включая клетки-предшественники или стволовые клетки, которые могли присутствовать в паренхиме печени и/или в непаренхимальной фракции печени. Иллюстративные типы клеток, составляющих печень, включают без ограничения гепатоциты, холангиоциты (клетки желчных протоков), клетки Купфера, звездчатые клетки печени (клетки Ито), овальные клетки и эндотелиальные клетки печени. Вышеупомянутые термины имеют общепринятые значения и истолковываются в данном документе в широком смысле как охватывающие любой тип клеток, классифицированный как таковой.

Популяция первичных клеток может содержать гепатоциты в различных пропорциях (0,1%, 1%, 10% или больше от общего количества клеток) в соответствии со способом разделения печени и/или любыми способами фракционирования или обогащения исходного препарата гепатоцитами и/или другими типами клеток на основе физических свойств (размер, морфология), жизнеспособности, условий культивирования клеток или экспрессии маркеров клеточной поверхности с применением любых подходящих методик.

Популяция первичных клеток, определенная и полученная в данном документе, путем разъединения печени (или ее части), может быть немедленно применена для образования клеточных культур в виде свежих первичных клеток печени или, предпочтительно, храниться в виде криоконсервированных препаратов первичных клеток печени с применением общепринятых технологий для их длительного хранения.

Касательно стадии (с), препарат первичных клеток печени, полученных на стадии (b), затем культивируют непосредственно на полностью синтетической подложке (например, пластмассе или любом полимерном веществе) или синтетической подложке, предварительно покрытой питающими клетками, экстрактами белков или любым другим материалом биологического происхождения, который обеспечивает адгезию и пролиферацию аналогичных первичных клеток и образование популяции клеток-предшественников печени взрослого, характеризующихся требуемыми маркерами, при этом такие маркеры предпочтительно идентифицируются на уровне белка с помощью иммуногистохимии, проточной цитометрии или другой методики на основе антител. Первичные клетки культивируют в среде для культивирования клеток, поддерживающей их адгезию, пролиферацию и образование гомогенной популяции клеток. Эта стадия культивирования первичных клеток печени, как определено выше, приводит к появлению и пролиферации клеток-предшественников печени в культуре и может быть продолжена до тех пор, пока клетки-предшественники или стволовые клетки печени не пролиферировали в достаточной степени. Например, культивирование можно продолжать до тех пор, пока популяция клеток не достигнет определенной степени конфлюентности (например, по меньшей мере 50%, 70% или по меньшей мере 90% или большей конфлюентности).

Клетки-предшественники или стволовые клетки печени, полученные на стадии (с), могут быть дополнительно охарактеризованы с помощью технологий, которые позволяют выявлять соответствующие маркеры уже на этой стадии (т. е. перед пассированием клеток, как указано на стадии (d)), как описано в EP3140393 или WO2017149059. Среди технологий, применяемых для идентификации таких маркеров и их определения как положительных или отрицательных, предпочтительными являются вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, иммуноцитохимия и ELISA, поскольку они позволяют выявлять маркеры на уровне белка даже при небольшом количестве клеток-предшественников печени, доступных на этой стадии.

Затем можно осуществить выделение клеток-предшественников печени на основании наличия положительных маркеров, клетки-предшественники печени могут быть положительными по меньшей мере по одному мезенхимальному маркеру. Мезенхимальные маркеры включают без ограничения виментин, CD13, CD90, CD73, CD44, CD29, α -актин гладких мышц (ASMA) и CD140-b. Кроме того, клетки-предшественники печени могут секретировать HGF. Кроме того, клетки-предшественники печени необязательно могут быть положительными по меньшей мере по одному печеночному маркеру и/или характеризоваться по меньшей мере одной специфической в отношении печени активностью. Например, печеночные маркеры включают без ограничения альбумин (ALB), HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 и альфа-1-антитрипсин. Специфические в отношении печени виды активности включают без ограничения секрецию мочевины, конъюгацию билирубина, секрецию альфа-1-антитрипсина и активность CYP3A4.

Касательно стадии (d) способа, первичные клетки культивируют в среде для культивирования клеток, поддерживая их адгезию, и пролиферацию, и образование гомогенной популяции клеток, которая после по меньшей мере одного пассажа постепенно обогащается клетками-предшественниками или стволовыми клетками печени. Эти клетки-предшественники печени могут быть быстро экспандированы с получением достаточного количества клеток для получения потомков, характеризующихся требуемыми свойствами (как описано в EP3140393 или WO2017149059), при удвоении клеток, которое может быть получено в течение 48-72 часов, и поддержании клеток-предшественников печени, характеризующихся требуемыми свойствами в течение по меньшей мере 2, 3, 4, 5 и более пассажей.

Выделенные клетки-предшественники печени высевают на субстрат, который обеспечивает адгезию к нему клеток, и культивируют в среде, поддерживающей их дальнейшую пролиферацию, обычно в жидкой среде для культивирования, которая может содержать сыворотку или может быть бессывороточной. В общем, субстрат, который обеспечивает адгезию к нему клеток, может представлять собой любой, по сути гидрофильный субстрат. Существующая стандартная практика выращивания адгезивных клеток может включать применение определенных химических сред с добавлением или без добавления бычьей, человеческой или другой животной сыворотки. Эти среды, которые могут быть дополнены соответствующей смесью

органических или неорганических соединений, могут, помимо обеспечения питательными веществами и/или стимуляторами роста, также способствовать росту/адгезии или устранению/отделению определенных типов клеток. Добавленная сыворотка, помимо обеспечения питательными веществами и/или стимуляторами роста, может также способствовать адгезии клеток в результате покрытия обработанных пластмассовых поверхностей слоем матрицы, с которой клетки могут лучше прикрепиться. Как понятно специалистам в данной области, клетки можно подсчитать для облегчения последующего высевания клеток с требуемой плотностью.

Среда, в которую высевают клетки, может содержать, по меньшей мере, клеточную среду, в способах по настоящему изобретению обычно жидкую среду, которая поддерживает выживание и/или рост выделенных клеток-предшественников печени. Жидкая среда для культивирования может быть добавлена в систему до введения в нее клеток, вместе с этим или после этого.

Обычно среда будет содержать состав базальной среды, известный из уровня техники. Многие составы базальных сред можно применять для культивирования первичных клеток в данном документе, включая без ограничения минимальную питательную среду Игла (MEM), среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), альфа-модифицированную минимальную питательную среду (альфа-MEM), базальную питательную среду (BME), среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), среду BGJb, смесь питательных веществ F-12 (Хэма), Liebovitz L-15, DMEM/F-12, питательную модифицированную среду Игла (EMEM), RPMI-1640, среду 199, среду Ваймаута MB 752/1 или среду Вильямса E, а также их модификации и/или комбинации. Композиции вышеуказанных базальных сред в целом известны из уровня техники, и специалист в данной области может модифицировать или модулировать концентрации сред и/или добавок к средам, если это необходимо для культивируемых клеток. Предпочтительный состав базальной среды может быть одним из коммерчески доступных, таких как среда Вильямса E, IMDM или DMEM, которые, как сообщается, поддерживают культуру *in vitro* взрослых клеток печени и содержат смесь факторов роста для их соответствующего роста, пролиферации, поддержания требуемых маркеров и/или биологической активности или длительного хранения. Другой предпочтительной средой является коммерчески доступная бессывороточная среда,

которая поддерживает рост клеток-предшественников печени, такая как, например, StemMacs™ от компании Miltenyi.

Такие составы базальных сред содержат ингредиенты, необходимые для развития клеток млекопитающих, которые сами по себе известны. В качестве иллюстрации и без ограничения эти ингредиенты могут включать неорганические соли (в частности соли, содержащие Na, K, Mg, Ca, Cl, P и, возможно, Cu, Fe, Se и Zn), физиологические буферы (например, HEPES, бикарбонат), нуклеотиды, нуклеозиды и/или основания нуклеиновых кислот, рибозу, дезоксирибозу, аминокислоты, витамины, антиоксиданты (например, глутатион) и источники углерода (например, глюкозу, пируват, например, пируват натрия, ацетат, например, ацетат натрия) и т. д. Также очевидно, что многие среды доступны в виде композиций с низким содержанием глюкозы с пируватом натрия или без него.

Для применения в культивировании базальные среды могут поставляться с одним или более дополнительными компонентами. Например, можно применять дополнительные добавки для снабжения клеток необходимыми микроэлементами и веществами для оптимального роста и экспансии. Такие добавки включают инсулин, трансферрин, соли селена и их комбинации. Эти компоненты могут быть включены в солевой раствор, такой как без ограничения сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), солевой раствор Эрла. Могут быть добавлены другие антиоксидантные добавки, например β-меркаптоэтанол. Хотя многие базальные среды уже содержат аминокислоты, некоторые аминокислоты могут быть добавлены позже, например L-глутамин, который, как известно, менее стабилен в растворе. В среду можно дополнительно вводить антибиотики и/или антимикотические соединения, обычно, такие как смеси пенициллина и стрептомицина и/или других соединений, в качестве примеров без ограничения амфотерицин, ампициллин, гентамицин, блеомицин, гигромицин, канамицин, митомицин, микофеноловая кислота, налидиксовая кислота, неомицин, нистатин, паромомицин, полимиксин, пурамицин, рифампицин, спектиномицин, тетрациклин, тилозин и зеоцин.

Гормоны также могут быть успешно применены в культуре клеток и включают, помимо прочего, D-альдостерон, диэтилстильбестрол (DES), дексаметазон, эстрадиол, гидрокортизон, инсулин, пролактин, прогестерон, соматостатин/гормон роста человека (HGH), тиреотропин, тироксин, L-тиронин, фактор роста эпителия (EGF) и фактор

роста гепатоцитов (HGF). Клетки печени также могут получать полезный эффект в результате культивирования с трийодтиронином, α -токоферола ацетатом и глюкагоном.

Липиды и липидные носители также можно применять в качестве дополнения к средам для культивирования клеток. Такие липиды и носители могут включать без ограничения циклодекстрин, холестерин, линолевую кислоту, конъюгированную с альбумином, линолевую кислоту и олеиновую кислоту, конъюгированную с альбумином, неконъюгированную линолевую кислоту, линолевую-олеиновую-арахионовую кислоту, конъюгированную с альбумином, олеиновую кислоту, неконъюгированную и конъюгированную с альбумином, среди прочего. Аналогичным образом альбумин можно применять в составах, не содержащих жирных кислот.

Также предполагается добавление в среду для культивирования клеток плазмы или сыворотки млекопитающих. Плазма или сыворотка часто содержат клеточные факторы и компоненты, необходимые для жизнеспособности и экспансии. Также предполагается применение подходящих заменителей сыворотки. Подходящие сыворотки или плазмы для применения в средах, описанных в данном документе, могут включать человеческую сыворотку или плазму, или сыворотку или плазму от животных, отличных от человека, предпочтительно от млекопитающих, отличных от человека, таких как, например, приматы, отличные от человека (например, лемуры, обезьяны, человекообразные обезьяны), сыворотку или плазму эмбриона или взрослого крупного рогатого скота, лошади, свиньи, барана, козы, собаки, кролика, мыши или крысы и т. д. В другом варианте осуществления в клеточной среде можно применять любую комбинацию вышеуказанных плазм и/или сывороток.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения выделенные клетки-предшественники печени прекондиционируют с одним или более цитокинами. Предпочтительно указанные цитокины добавляют в клеточную среду для культуры клеток-предшественников или стволовых клеток печени. Клетки, которые применяются, могут быть свежими, замороженными или предварительно культивированными.

Касательно стадии (e), композиция среды для прекондиционирования может характеризоваться теми же характеристиками, может быть такой же или по сути такой

же, как композиция среды, применяемой во время выделения клеток-предшественников печени. В качестве альтернативы среда может отличаться.

Таким образом, прекондиционирование выделенных клеток-предшественников печени согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения включает воздействие на клетки *in vitro* одной или более сигнальных молекул, в данном случае цитокинов, путем добавления соответствующих цитокинов в клеточную среду. Цитокины, подходящие для применения в прекондиционировании, могут представлять собой провоспалительные цитокины, а также противовоспалительные цитокины и включают без ограничения: интерлейкин-1 альфа (IL-1 α), интерлейкин-1 бета (IL-1 β), интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-10 (IL-10), интерфероны, такие как интерферон-альфа (IFN α) и интерферон-гамма (IFN γ), фактор некроза опухоли-альфа (TNF α) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

Экспрессия специфических маркеров, таких как HLA-E, может быть выявлена с помощью любой подходящей иммунологической методики, известной из уровня техники, такой как проточная цитометрия, иммуноцитохимия или аффинная адсорбция, вестерн-блоттинг, ELISA и т. д., или с помощью любой подходящей методики измерения количества маркерной mRNA, например нозерн-блоттинга, полуколичественной или количественной RT-PCR и т. д.

Как описано выше, обработка выделенных клеток-предшественников цитокинами *in vitro* приводит к индукции экспрессии HLA-E. Соответственно, и в следующем варианте осуществления настоящего изобретения прекондиционированные клетки характеризуются повышенными уровнями экспрессии HLA-E по сравнению с исходной экспрессией HLA-E в непрекондиционированных клетках-предшественниках или стволовых клетках печени. Следовательно, в настоящем изобретении в равной степени предусмотрен способ получения прекондиционированных клеток-предшественников, выделенных из печени, которые характеризуются повышенными уровнями экспрессии HLA-E по сравнению с базальным уровнем, путем добавления одного или более цитокинов в клеточную среду. Исходная экспрессия HLA-E может быть связана с отсутствием экспрессии, а также с наименьшим уровнем экспрессии в отсутствие экзогенных цитокинов в среде. Повышенный уровень экспрессии относится, например, без ограничения к уровню экспрессии, который измеряется в по меньшей мере 1,5 раза

выше, чем при измерении экспрессии контрольными клетками, например в по меньшей мере 2 раза, в по меньшей мере 4 раза, в по меньшей мере 10 раз, в по меньшей мере 20 раз, в по меньшей мере 30 раз, в по меньшей мере 40 раз, в по меньшей мере 50 раз выше или даже выше.

Предпочтительно цитокины, т. е. $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ и необязательно $IL-10$ и их комбинации, применяются для индукции экспрессии HLA-E. Соответственно, и в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения прекондиционирование клеток-предшественников или стволовых клеток печени взрослых предпочтительно проводят цитокинами, выбранными из $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-10$ и любых их комбинаций. Было обнаружено, что эти цитокины эффективно индуцируют экспрессию HLA-E в клетках-предшественниках печени. В одном варианте осуществления цитокины представляют собой по меньшей мере $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$. В предпочтительном варианте осуществления смесь дополнительно содержит $IL-1\beta$ и/или $IL-10$. Эти специфические комбинации цитокинов характеризуются повышенной эффективностью индукции экспрессии HLA-E в клетках-предшественниках или стволовых клетках печени.

В одном варианте осуществления цитокины добавляют к клеточной среде клеток в общей конечной концентрации от 5 до 400 нг/мл, предпочтительно от 10 до 360 нг/мл, более предпочтительно от 20 нг/мл до 240 нг/мл. В другом или дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация отдельных цитокинов в клеточной среде составляет от 5 до 100 нг/мл, более предпочтительно от 10 до 80 нг/мл, наиболее предпочтительно от 20 до 60 нг/мл.

В частности, эффективность прекондиционирования клеток-предшественников печени цитокинами наиболее эффективна в отношении экспрессии HLA-E, когда клетки прекондиционируют в течение от 1 часа до 72 часов, более предпочтительно в течение от 12 часов до 60 часов, более предпочтительно в течение от 24 часов до 60 часов и наиболее предпочтительно в течение 24-48 часов.

Указанные диапазоны концентраций и продолжительности обработки считаются достаточными для индукции приемлемой экспрессии HLA-E в указанных клетках.

Касательно стадии (f) выше, необязательное выделение популяции клеток в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения применяется к

клеткам, которые характеризуются повышенным уровнем HLA-E по сравнению с непрекондиционированными клетками-предшественниками или стволовыми клетками печени.

Как упоминалось, настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей выделенные клетки-предшественники или стволовые клетки печени, которые являются положительными по HLA-E по настоящему изобретению, клеточные линии на их основе или популяцию клеток, включающую их, или их потомков, включая дифференцированных потомков, особенно гепатоциты или гепатоцитоподобные клетки, необязательно генетически модифицированные.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предусмотрена композиция, описанная выше, для применения в лечении заболеваний печени, включая без ограничения:

- (аллогенную) трансплантацию клеток печени для лечения недостаточностей обмена веществ печени, дегенеративных заболеваний печени или фульминантной печеночной недостаточности,
- изготовление биоискусственных устройств для печени,
- получение животных моделей заболеваний печени человека с помощью трансплантации выделенных клеток-предшественников или стволовых клеток или их популяции согласно настоящему изобретению у животных,
- получение *in vitro* и животных моделей для токсикологии, фармакологии,
- тестирования новых лекарственных средств на выделенных клетках-предшественниках или стволовых клетках или их популяции согласно настоящему изобретению, включая противовирусные лекарственные средства для вирусов гепатита человека.

Таким образом, клетки настоящего изобретения можно применять для лечения заболеваний, ассоциированных с печенью, включая, помимо прочего, печеночную недостаточность, гепатит и врожденные нарушения обмена веществ. Композиция по настоящему изобретению является особенно хорошо подходящей для лечения заболеваний печени, ассоциированных с воспалением или иммунными ответами,

благодаря их иммуномодулирующим свойствам. Виды лечения, включающего трансплантацию клеток печени, которое охватывает возможные риски, связанные с иммунитетом, также извлекает пользу от превосходных иммунорегуляторных свойств композиций, содержащих клетки-предшественники печени по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также раскрывает выделенные клетки-предшественники или стволовые клетки, их популяцию или композицию, содержащую последние, для применения в следующих целях:

- для лечения нарушений с нежелательным иммунным ответом, например без ограничения воспаления, аутоиммунных заболеваний и отторжения трансплантата,

- в иммунотерапии,

- для лечения фиброзных нарушений, включая без ограничения фиброзные нарушения печени, фиброз легких, фиброз почек, фиброз предстательной железы, фиброз молочной железы, фиброз сердечной мышцы и другие нарушения, включающие повышение специфических маркеров фиброза, т. е. любых биохимических, серологических маркеров или любых других клинических или эхографических характеристики, которые могут коррелировать с наличием фиброзного заболевания, фиброза печени и/или хронических фибровоспалительных заболеваний, включая фибровоспалительную хроническую печеночную недостаточность,

- трансплантации клеток-предшественников или стволовых клеток печени для лечения врожденных недостаточностей обмена веществ печени:

неисчерпывающие примеры таких заболеваний включают фенилкетонурию и другие аминокислотопатии, гемофилию и недостаточности других факторов свертывания крови, семейную гиперхолестеринемию и другие нарушения липидного обмена, нарушения цикла мочевины, гликогеноз, галактоземию, фруктоземию, тирозинемию, нарушения обмена белков и углеводов, нарушения обмена органических кислот, пероксисомальные и лизосомальные нарушения, нарушения синтеза белка, дефекты переносчиков клеток печени, дефект гликозилирования и т. п.,

- для лечения приобретенных прогрессирующих дегенеративных заболеваний печени,

- для лечения фульминантной печеночной недостаточности и острой или хронической печеночной недостаточности,
- в биоискусственных устройствах для печени и вспомогательных устройствах для печени,
- животных моделях заболеваний печени человека.

HLA-E-положительные клетки-предшественники печени по настоящему изобретению или их популяция клеток или композиция, содержащая их, могут быть применены для тканевой инженерии и клеточной терапии посредством трансплантации клеток печени (LCT) во внутрипеченочных или внепеченочных положениях (в том числе для модуляции иммунологического ответа до или после трансплантации печени или других органов и тканей). С помощью этого подхода, животные модели заболеваний печени человека могут быть также получены путем трансплантации выделенных клеток-предшественников печени человека по настоящему изобретению или композиции, содержащей их, животным, при этом эффекты соединения в отношении гепатоцитов человека можно более эффективно оценивать и отличать от эффектов в животной модели,

- при получении животных моделей гепатотропных вирусных инфекций человека (HBV, HAV, HCV, HEV, HDV, ...),
- для изучения естественного происхождения, передачи, резистентности, эффектов лечения, применения противовирусных лекарственных средств или любых исследований с применением трансплантированной клетки-предшественника или стволовой клетки печени согласно настоящему изобретению,
- получения моделей клеток *in vitro* и животных моделей токсикологии, фармакологии и фармакогенетики *in vivo* с применением клетки-предшественника или стволовой клетки печени согласно настоящему изобретению,
- тестирования новых лекарственных средств на клетке-предшественнике или стволовой клетке согласно настоящему изобретению,

- генной терапия путем вставки вирусных последовательностей в клетку-предшественника или стволовую клетку печени согласно настоящему изобретению, которые затем могут быть экспандированы *in vitro*,
- животных моделях для изучения метаболизма клеток печени человека,
- толерантности аллогенных клеток,
- применения клетки-предшественника или стволовой клетки печени по настоящему изобретению для избегания, предупреждения или лечения отторжения печени или аллотрансплантата клеток печени.

Как описано выше, благодаря иммуносупрессивным свойствам клеток-предшественников печени по настоящему изобретению композицию по настоящему изобретению можно вводить в ткань, представляющую интерес, для защиты этой ткани от воспаления, от фиброза и от последующего разрушения. Это особенно предпочтительно во время видов терапии с замещением клеток, когда нежелательные иммунные реакции часто характеризуются пагубными последствиями. Таким образом, композицию по настоящему изобретению можно применять в видах терапии с замещением клеток. Клетки-предшественники можно вводить в ткань, представляющую интерес, предпочтительно в ткань печени, субъекту для дополнения функционирующих клеток или замещения клеток, которые утратили функцию и в которых следует избегать воспаления, приводящего к фиброзу и разрушению ткани. Соответственно клетки-предшественники, клеточные линии на их основе, популяции клеток на их основе и композиция, содержащая последние, особенно хорошо подходят для применения в лечении фиброзных нарушений, включая без ограничения фиброзные нарушения печени, легочный фиброз, фиброз почек, фиброз предстательной железы, фиброз молочной железы, фиброз сердечной мышцы и другие нарушения, включающие повышение специфических маркеров фиброза, т. е. любых биохимических, серологических маркеров или любых других клинических или эхографических характеристик, которые могут коррелировать с наличием фиброзного заболевания, в частности фибровоспалительных хронических заболеваний печени, при которых фибровоспалительные реакции в печени часто приводят к хронической печеночной недостаточности. Иммуносупрессивные свойства полученных из печени клеток-предшественников способствуют уменьшению или предупреждению имеющихся

фибровоспалительных реакций, которые вызывают прогрессирующую потерю функции печени. С другой стороны, способность клеток-предшественников печени к регенерации и дифференцировке в типы клеток печени способствует регенерации печени и, таким образом, способствует предупреждению хронической печеночной недостаточности.

Патологические состояния или недостаточности, типичными для которых является фиброз печени, ведущий к потере массы и/или функции печени, и которые могут получать пользу от клеток-предшественников или стволовых клеток печени, характеризующихся повышенными уровнями HLA-G по настоящему изобретению, включают без ограничения синдром Алажиля, алкогольную болезнь печени (алкогольный цирроз), недостаточность альфа 1-антитрипсина (все фенотипы), гиперлипидемию и другие нарушения липидного обмена, аутоиммунный гепатит, синдром Бадда-Киари, билиарную атрезию, прогрессирующий семейный холестаза I, II и III типов, рак печени, болезнь Кароли, синдром Криглера-Наджара, фруктоземию, галактоземию, дефекты, связанные с недостаточностью гликозилирования углеводами, другие нарушения углеводного обмена, болезнь Рефсума и другие пероксисомальные заболевания, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Вольмана и другие лизосомальные нарушения, тирозинемию, синдром, предусматривающий гиперорнитинемию-гипераммониемию-гомоциструллинурию, и другие нарушения обмена аминокислот, синдром Дубина-Джонсона, жировые заболевания печени, включая неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD) и неалкогольный стеатогепатит (NASH), хроническую печеночную недостаточность, обострения хронической печеночной недостаточности (ACLF), синдром Жильбера, болезнь накопления гликогена I и III, гемохроматоз, гепатит A-G, порфирию, первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, тирозинемию, недостаточности фактора свертывания крови, гемофилию B, фенилкетонурию, болезнь Вильсона, фульминантную печеночную недостаточность, печеночную недостаточность после гепатэктомии, заболевания митохондриальной дыхательной цепи. Кроме того, клетки также можно применять для лечения приобретенных нарушений печени вследствие вирусных инфекций.

Соответственно, применение клетки-предшественника или стволовой клетки, клеточной линии на их основе, популяции клеток и/или композиции по настоящему

изобретению предусмотрено для применения в терапии и/или для применения в производстве лекарственного средства для лечения заболеваний печени. Такие заболевания могут включать нарушения, воздействующие на ткань печени, заболевания, воздействующие на жизнеспособность и/или функцию гепатоцитов, а также хроническую печеночную недостаточность, вызванную фибровоспалительными реакциями. Кроме того, благодаря иммуномодулирующим и иммуносупрессивным свойствам предусмотрено применение клетки-предшественника или стволовой клетки, клеточной линии на их основе, популяции клеток и/или композиции по настоящему изобретению для применения в терапии и/или для применения в производстве лекарственного препарата для лечения заболеваний, при которых следует избегать нежелательных иммунных ответов. Введение клеток согласно настоящему изобретению может приводить к восстановлению или регенерации ткани у субъекта. Клетки вводят способом, который позволяет им прививаться или мигрировать к предполагаемому участку ткани и восстанавливать или регенерировать область с функциональной недостаточностью или защищать эту область от последующего повреждения, возможно, вызванного воспалительными реакциями.

В настоящем описании также описан способ предупреждения и/или лечения заболевания печени, включающий введение композиции по настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в таком лечении. Такое введение обычно осуществляется в терапевтически эффективном количестве, т.е. обычно в количестве, которое обеспечивает требуемый местный или системный эффект и эффективность.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей клетки-предшественники или стволовые клетки печени взрослого по настоящему изобретению, клеточные линии на их основе или популяцию клеток, содержащую их. В качестве примера и без ограничения выделенные клетки-предшественники или стволовые клетки печени по настоящему изобретению, клеточные линии на их основе или популяции клеток, содержащие их или их потомков, могут быть успешно введены посредством инъекции (включая также катетерное введение) или имплантации, например локализованной инъекции, системной инъекции, внутриселезеночной инъекции (см. также Gupta et al., *Seminars in Liver Disease* 12: 321, 1992), инъекции в воротную вену, инъекции в пульпу печени, например под капсулу печени, парентерального введения или внутриматочной инъекции эмбриону или плоду.

Полученные из печени клетки-предшественники или стволовые клетки по настоящему изобретению, клеточные линии на их основе или популяции клеток, содержащие их или их потомков, необязательно генетически модифицированные, или фармацевтическая композиция, содержащая их, могут дополнительно применяться для тканевой инженерии и клеточной терапии посредством трансплантации клеток печени (LCT). Трансплантация клеток печени и трансплантация стволовых клеток печени (LSCT) относится к методике инфузии зрелых гепатоцитов или клеток-предшественников печени, включая клетки по настоящему изобретению, любым способом, ведущим к доступу в печень и приживлению клеток, предпочтительно через воротную вену, но также путем прямой инъекции в печень или внутриселезеночной инъекции.

Например, клетки могут быть предусмотрены в виде клеточной суспензии в любой среде для хранения, предпочтительно содержащей человеческий альбумин, после процедуры выделения или после размораживания после криоконсервации.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предполагается применение собственной ткани печени пациента для выделения клеток-предшественников или стволовых клеток по настоящему изобретению. Такие клетки будут аутологичными в отношении пациента и могут быть легко введены пациенту. Однако, если у пациента имеется, например, генетический дефект, лежащий в основе конкретного патологического состояния, такой дефект можно предупредить путем генетической манипуляции полученных клеток или применения клеток-предшественников или стволовых клеток, выделенных из ткани, которая не принадлежит пациенту, также известной из уровня техники как аллогенная трансплантация стволовых клеток.

Если предполагается введение таких клеток пациенту, может быть предпочтительным, чтобы ткань печени, подвергнутая воздействию способа по настоящему изобретению для получения клеток-предшественников или стволовых клеток, была выбрана таким образом, чтобы максимально увеличить, в по меньшей мере достижимых пределах, тканевую совместимость между пациентом и введенными клетками. Несмотря на эти усилия, риск отторжения введенных клеток иммунной системой пациента остается высоким (например, отторжение «трансплантат против хозяина»). Композиция, содержащая полученные из печени клетки-предшественники согласно настоящему изобретению дополнительно снижает риск отторжения аллогенных LCT или LSCT,

поэтому и в дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена композиция для применения при аллогенной трансплантации.

Проблема, касающаяся терапевтического применения клеток-предшественников или стволовых клеток по настоящему изобретению, заключается в количестве клеток, необходимом для достижения оптимального эффекта. Дозы для введения могут быть различными, могут включать начальное введение с последующими введениями и могут быть определены специалистом в данной области, вооруженным настоящим изобретением. Обычно вводимая доза или дозы будут обеспечивать терапевтически эффективное количество клеток, т. е. количество, обеспечивающее требуемый местный или системный эффект и эффективность. Кроме того, специалист в данной области может легко определить необязательные добавки, основы и/или носитель в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, которые следует вводить субъекту. Как правило, любые добавки (кроме активной (активных) клетки-предшественника (клеток-предшественников) или стволовой клетки (стволовых клеток) и/или цитокина (цитокинов)) могут присутствовать в количестве от 0,001 до 50% (вес/вес или вес/об.) раствора в забуференном фосфатом физиологическом растворе, и активный ингредиент обычно может присутствовать в количестве от микрограммов до миллиграммов, например от приблизительно 0,0001 до приблизительно 5% (вес/вес или вес/об.), предпочтительно от приблизительно 0,0001 до приблизительно 1%, наиболее предпочтительно от приблизительно 0,0001 до приблизительно 0,05% или от приблизительно 0,001 до приблизительно 20%, предпочтительно от приблизительно 0,01 до приблизительно 10% и наиболее предпочтительно от приблизительно 0,05 до приблизительно 5%.

При введении терапевтической композиции, содержащей HLA-E-положительные клетки-предшественники печени или их популяцию, она обычно может быть получена в виде стандартной лекарственной формы. В любом случае может быть желательно включить средства и/или адаптировать известные способы введения клеток пациентам, которые обеспечивают жизнеспособность клеток по настоящему изобретению или популяции этих клеток, например, путем включения клеток в биополимер или синтетический полимер. Примеры подходящих биополимеров включают без ограничения фибронектин, фибрин, фибриноген, тромбин, коллаген и протеогликаны, ламинины, адгезивные молекулы, протеогликаны, гиалуронаны,

гликозаминогликановые цепи, хитозан, альгинат, природные или синтетически модифицированные пептиды, которые получены из таких белков, и синтетические, биоразлагаемые и биосовместимые полимеры. Эти композиции могут быть получены с включением или без включения цитокинов, факторов роста и введены в виде суспензии или трехмерного геля с заключенными в него клетками.

Стерильные растворы для инъекций могут быть получены путем включения клеток, применяемых при практическом осуществлении настоящего изобретения, в необходимом количестве подходящего растворителя с различными количествами других ингредиентов, при необходимости. Такие композиции могут дополнительно находиться в смеси с подходящим носителем, разбавителем или наполнителем, таким как стерильная вода, физиологический солевой раствор, глюкоза, декстроза или т. п. Композиции могут содержать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, рН-буферные средства, желирующие или повышающие вязкость добавки, консерванты, ароматизаторы, красители и т. п., в зависимости от пути введения и требуемого препарата.

Далее настоящее изобретение описано с помощью следующих неограничивающих примеров, которые дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение и не предназначены, а также не могут быть интерпретированы для ограничения объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

1. Получение прекондиционированных HLA-E-положительных клеток-предшественников или стволовых клеток печени

(a) Получение клеток-предшественников печени

Клетки-предшественники печени взрослого человека выделяли, как описано в EP 3 140 393 или WO 2017 149 059, из печени трупов здоровых доноров или доноров без сердечных сокращений.

Вкратце, препараты клеток печени повторно суспендировали в среде Е Вильямса с добавлением 10% FBS, 10 мг/мл INS, 1 мМ DEX. Первичные клетки культивировали в колбах Corning® CellBIND® и культивировали при 37°C в полностью увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Через 24 часа среду меняли с удалением

неприкрепившихся клеток, а затем обновляли дважды в неделю, тогда как культуру ежедневно контролировали под микроскопом. Среду для культивирования меняли через 12-16 дней на среду DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 9% FBS. Образовывался и пролиферировал тип клеток с подобной мезенхимальной морфологией. При достижении 70-95% конфлюентности клетки трипсинизировали рекомбинантным трипсином и 1 mM EDTA и повторно высевали с плотностью $1-10 \times 10^3$ клеток/см². При каждом пассаже клетки трипсинизировали при 80-90% конфлюентности.

(b) Прекондиционирование клеток-предшественников печени

Примирование воспаления осуществляли на P5 на клетках, достигающих 80-90% конфлюентности, с помощью IL-1 β (5-100 нг/мл, PeproTech, ссылка: 200-1B), IFN γ (5-100 нг/мл, Prospec, ссылка: CYT-206), TNF α (5-100 нг/мл, Prospec, ссылка: CYT-223), IL-10 (5-100 нг/мл, PeproTech, ссылка: 200-10-10UG) и/или их комбинаций в течение 48 часов, где «Все вместе» применяли для обозначения клеток, обработанных комбинацией IL-1 β , IFN γ , TNF α и IL-10. После этого для анализа собирали супернатанты и клетки трипсинизировали рекомбинантным трипсином (trypLE; LifeTech) и 1 mM EDTA.

2. Экспрессия HLA-E: характеристика клеток с помощью проточной цитометрии

Экспрессию HLA-E на необработанных и обработанных клетках оценивали с помощью проточной цитометрии.

Всего 5×10^5 клеток инкубировали в буфере PBS в течение 30 минут при 4°C или 15 минут при комнатной температуре с антителом к HLA-E-PE человека. Соответствующие контрольные изотипические антитела применяли для оценки неспецифического связывания моноклональных антител. Сдвиг гистограмм от изотипа указывал на повышенную экспрессию HLA-E по сравнению с изотипом. Эти результаты демонстрировали повышенные уровни экспрессии HLA-E в прекоиндированных клетках по сравнению с необработанным состоянием.

Как представлено на фигуре 1 и фигуре 2, прекоиндирование клеток-предшественников печени путем добавления одного или более цитокинов в клеточную среду клеток согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения

приводило к получению клеток с повышенными уровнями экспрессии HLA-E по сравнению с исходным уровнем экспрессии HLA-E в непрекондиционированных клетках (контрольное состояние).

Результаты, представленные на фигуре 3, показывали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) клеток, окрашенных специфическим mAb, и подтверждали HLA-E-положительную идентичность прекондиционированной популяции клеток-предшественников печени, которая характеризовалась повышенными уровнями MFI по сравнению с контрольным состоянием (необработанным). Результаты представлены в виде среднего значения \pm SEM. Все данные анализировали с помощью программного обеспечения Prism 5.

3. Количественная оценка экспрессии генов с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (RT-PCR)

Прекокондиционированные клетки-предшественники печени взрослых и контрольные клетки получали, как описано в примере 1.

Экспрессию генов характеризовали с помощью RT-PCR. cDNA синтезировали с применением коммерческого набора в соответствии с инструкциями производителя. Образцы анализировали в двух повторностях на устройстве для ПЦР в реальном времени. Относительную количественную оценку экспрессии генов определяли путем нормализации интенсивности сигнала относительно эндогенных контрольных транскриптов. После нормализации данные наносили на график и сравнивали среди популяций клеток-предшественников печени, прекокондиционированных различными комбинациями цитокинов.

Более подробно, клетки извлекали с экстракцией общей РНК с применением набора GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma – RTN070). Во время экстракции РНК обработку ДНКазой проводили с применением набора для расщепления ДНКазой I на колонке (Sigma, ссылка: DNASE70). Затем количественно оценивали РНК с помощью NanoDrop (Thermo Scientific). cDNA первой цепи синтезировали с применением набора для синтеза первой нити cDNA Transcriptor (Roche – 04897030001) в соответствии с инструкциями производителя. Смеси для ПЦР-амплификации (конечный объем 20 мкл), содержащие матричную cDNA, буфер Taqman Master Mix (10 мкл; Applied Biosystems) и ПЦР с прямым и обратным праймером анализировали в двух

повторностях и анализ осуществляли в системе ПЦР в реальном времени ViiA 7 (Applied Biosystems). Условия цикла включали активацию полимеразы в течение 10 мин. при 95°C, 40 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 1 мин. Количественную оценку нормализовали относительно гена домашнего хозяйства GAPDH.

Коммерческие праймеры и зонды, применяемые в настоящем исследовании, приведены ниже (все продукты от Thermo Fisher): GAPDH - Hs99999905_m1, HLA-G - Hs00365950_g1, HLA-E - Hs03045171_m1,IDO1 - Hs00984148_m1, HGF - Hs00300159_m1, PTGS2 - Hs00153133_m1, IL-6 - Hs00174131_m1, IL-10 - Hs00961622_m1.

На фигуре 4 показано, что прекондиционированные клетки-предшественники печени были положительны в отношении HLA-E. Прекондиционированные клетки-предшественники печени характеризовались повышенными уровнями экспрессии HLA-E по сравнению с исходной экспрессией HLA-E в непрекондиционированных клетках-предшественниках печени. Кроме того, на фигуре 4 показано, что прекондиционированные HLA-E-положительные клетки также могли быть положительными по HLA-G. Результаты выражены в виде среднего значения \pm SEM (n = 3). Все данные анализировали с помощью программного обеспечения Prism 5.

Клетки-предшественники печени, которые были HLA-E-положительными или которые характеризовались повышенными уровнями HLA-E, также могли характеризоваться повышенными уровнями экспрессии генов одного или более цитокинов и/или факторов с иммуномодулирующими свойствами по сравнению с исходным уровнем экспрессии, выявленным в непрекондиционированных клетках-предшественниках или стволовых клеткам печени (контроль). На фигуре 5 показано, что уровни экспрессии генов индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (IDO1), простагландин-эндопероксидсинтазы 2 (PTGS2), IL-6 и IL-10 были повышены в популяции прекондиционированных клеток-предшественников печени, содержащих повышенное количество HLA-E положительных клеток. Тесты проводили на клетках-предшественниках печени или стволовых клетках, выделенных от трех различных доноров (n = 3). Результаты выражены в виде среднего значения \pm SEM.

4. Секрция HLA-G: количественная оценка растворимого HLA-G с помощью CLIA (принцип хемилюминесцентного сэндвича) в популяции, содержащей HLA-E-положительные клетки-предшественники или стволовые клетки печени

Прекондиционированные клетки-предшественники печени получали, как описано в примере 1.

Экспрессию растворимых белков измеряли в супернатантах, собранных из прекоинкубированных клеток-предшественников печени. Количественную оценку растворимого белка HLA-G проводили с применением коммерческого набора для иммуноферментного анализа (ELISA), описанного ниже.

ELISA для растворимого HLA-G проводили с применением набора CLIA: набор для ELISA HLA-G человека (CLIA) – LS-F30041. 100 мкл супернатантов клеточных культур или стандартов инкубировали с захватывающим антителом в течение 90 минут при 37°C. После инкубации в каждую лунку добавляли 100 мкл биотинилированного выявляющего антитела на 1 час при 37°C. После стадии промывки 100 мкл/вес. конъюгированного HRP инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После пяти промывок планшет инкубировали с хемилюминесцентным субстратом в течение 5 мин. при 37°C в защищенном от света месте. В конце времени инкубации планшет незамедлительно анализировали с определением относительных световых единиц (RLU) каждой лунки с применением люминометра для микропланшетов. Диапазон выявления анализа составлял 0,16-10 нг/мл sHLA-G. Каждый образец тестировали в двух повторностях.

Результаты, представленные на фигуре 6, показали, что прекоинкубированные клетки-предшественники печени характеризовались повышенными уровнями HLA-G в супернатанте.

5. Экспрессия иммуномодулирующих цитокинов и/или иммуномодулирующих факторов в HLA-E-положительных клетках-предшественниках или стволовых клетках печени

Прекондиционированные HLA-E-положительные клетки-предшественники печени получали, как описано в примере 1.

Экспрессию растворимых белков измеряли с применением коммерческого набора для иммуноферментного анализа (ELISA). HLA-E-положительные клетки-предшественники или клетки-предшественники печени, характеризующиеся повышенными уровнями экспрессии HLA-E по сравнению с исходной экспрессией HLA-E, дополнительно характеризовались повышенными уровнями секреции простагландина E2 (PGE2) по сравнению с выявленным исходным уровнем PGE2 в некондиционированных клетках-предшественниках или стволовых клетках печени (необработанных).

Фигура 7 подтверждает повышенную секрецию иммуномодулирующего фактора PGE2 в клетках-предшественниках печени, характеризующихся повышенными уровнями HLA-E, после прекондиционирования одним или более цитокинами, выбранными из $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ и/или $IL-10$, согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. Тест проводили на клетках-предшественниках печени, выделенных от трех различных доноров ($n = 3$). Результаты выражены в виде среднего значения \pm SEM. Все данные анализировали с помощью программного обеспечения Prism 5.

6. Активность IDO1 усиливается в клетках-предшественниках печени HLA-E взрослых согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения

Преко́ндиционированные HLA-E-положительные клетки-предшественники печени получали, как описано в примере 1.

Ферментативную активность IDO1 измеряли с помощью флуорогенного проявителя, который избирательно реагирует с соединением N-формилкинуренином (NFK) с образованием продукта с высокой флуоресценцией ($Ex/Em = 402/488$ нм). Образование NFK напрямую связано с уровнем активности фермента IDO.

Как показано на фигуре 8, ферментативная активность IDO1 усиливается в преко́ндиционированных клетках-предшественниках печени по сравнению с исходной ферментативной активностью IDO1 в непреко́ндиционированных клетках-предшественниках печени (необработанные). Тест проводили на клетках-предшественниках печени, выделенных от трех различных доноров ($n = 3$). Результаты выражены в виде среднего значения \pm SEM. Все данные анализировали с помощью программного обеспечения Prism 5.

Предполагается, что настоящее изобретение не ограничивается никакой из ранее описанных форм реализации, и что некоторые модификации могут быть добавлены в представленный пример изготовления без пересмотра приложенной формулы изобретения.

7. Количественная оценка экспрессии HLA-E в клетках-предшественниках печени человека

Клетки размораживали и высевали по 30000 клеток/см² на поверхность связывания клеток в среде DMEM, содержащей 9% FBS. На следующий день клетки инкубировали с DMEM + 9% FBS (= нестимулированное состояние) или DMEM + 9% FBS с добавлением провоспалительной смеси, состоящего из 10 нг/мл IFN γ , 50 нг/мл TNF α , 20 нг/мл IL-1 β (= стимулированное состояние). Через 24 часа после инкубации клетки отделяли и определяли экспрессию HLA-E с применением проточной цитометрии.

Экспрессию HLA-E определяли с применением проточной цитометрии (MacQuant) с помощью антитела к HLA-E (№ 130-117-401, клон REA1031 от компании Miltenyi). Относительную медианную интенсивность флуоресценции (rMFI, MFI антитело/MFI изотипа), а также процент клеток, экспрессирующих HLA-E, определяли с помощью антитела изотипического контроля.

Результаты

Было обнаружено, что экспрессия HLA-E на клетку возрастала в стимулированных клетках по сравнению с нестимулированными клетками. Кроме того, процент HLA-E-положительных клеток в популяции был значительно увеличен, в результате чего получали популяцию клеток с высоким процентом HLA-E-экспрессирующих клеток, пригодных для применения в терапии.

На фигуре 9А представлены иллюстративные гистограммы, показывающие более высокую экспрессию HLA-E в клетках-предшественниках печени, стимулированных провоспалительной смесью. На фигуре 9В показан средний процент HLA-E-положительных клеток с провоспалительным кондиционированием или без него. Через 24 часа после кондиционирования в кондиционированной популяции наблюдали увеличение содержания HLA-E-положительных клеток по сравнению с некондиционированными клетками (14,7% по сравнению с 86,4%). В стимулированном

состоянии минимум 69,6% и максимум 98,2% составляли HLA-E-положительные клетки, тогда как в нестимулированной популяции, HLA-E-положительные клетки находились в диапазоне от 4,1% до 22,3%. Клетки считались HLA-E-положительными, если они характеризовались более высокой интенсивностью флуоресценции по сравнению с изотипическим контролем, как показано на фигуре 9А.

На фигуре 9С показано повышение экспрессии HLA-E через 24 часа стимуляции: среднее значение гMFI для стимулированных клеток составляло 8,3 по сравнению с 3,0 для нестимулированных клеток. В стимулированном состоянии наблюдали гMFI от 6,8 до 11,8, тогда как в нестимулированных клетках выявляли гMFI от 2,2 до 3,8. (гMFI: относительная медианная интенсивность флуоресценции или MFI антитела/MFI изотипа (флуоресцентный сигнал, когда клетки окрашиваются антителом к HLA-E, деленный на флуоресцентный сигнал, когда клетки окрашивают изотипическим контролем). (n = 5, включая двух различных доноров печени).

8. Экспрессия HLA-E снижает уничтожение стволовых клеток печени клетками-предшественниками печени NK- или CD8+-клетками

Клеточный анализ разрабатывали с применением CD8+ Т-клеток, выделенных из PBMC, для исследования влияния экспрессии HLA-E на стволовые клетки или клетки-предшественники печени.

Выделение и культивирование CD8+ Т-клеток человека

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли из лейкоцитарных пленок здоровых взрослых доноров центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Нураque. CD8+ Т-клетки выделяли с применением набора для CD8 Т-клеток Dynabeads®Untouched™ Humand в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen™). Чистоту и жизнеспособность выделенных клеток всегда определяли с применением проточного цитометрического анализа (APC-конъюгированное антитело к CD8 и DAPI), демонстрируя > 80% CD8+ клеток.

Культивирование стволовых клеток печени и прекондиционирование

За два дня до начала анализа цитотоксичности (= день -2) стволовые клетки печени размораживали и высевали на поверхности связывания клеток в среде DMEM, содержащей 9% FBS, по 30000 клеток/см². На следующий день клетки инкубировали с

DMEM + 9% FBS (= нестимулированное состояние) или DMEM + 9% FBS с добавлением провоспалительной смеси, состоящего из 10 нг/мл IFN γ , 50 нг/мл TNF α , 20 нг/мл IL-1 β (= стимулированное состояние). Через 24 часа преколонирования клетки обрабатывали трипсином, подсчитывали и применяли для цитотоксического анализа или характеристики (экспрессия HLA-E с применением проточной цитометрии). Экспрессию HLA-E проверяли с применением проточной цитометрии. Относительную медианную интенсивность флуоресценции (RMFI, MFI антитело/MFI изотипа), а также процент клеток, экспрессирующих HLA-E, определяли с помощью антитела изотипического контроля.

Анализ цитотоксичности CD8⁺ Т-клеток

Выполняли два последовательных совместных культивирования. CD8⁺ Т-клетки от первого контакта возвращали в культуру с той же партией стволовых клеток печени. Первый контакт в день 0 начинался с посева нестимулированных или стимулированных клеток в 24-луночный планшет по 20000 клеток/см² в среде X-VIVO. Через 4 часа инкубации (37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере) посев клеток проверяли, и в каждую лунку добавляли 2 миллиона CD8⁺ Т-клеток с конечным объемом 1 мл X-VIVO. Контрольные условия включали CD8⁺ Т-клетки, культивируемые отдельно, или с человеческим Т-активатором антителом к CD3/CD28 Dynabeads (в соответствии с протоколом производителя). В 4 день совместного культивирования в каждую лунку добавляли 100 МЕ/мл IL-2. Через 7 дней совместного культивирования 1-й контакт завершали путем сбора супернатанта, содержащего CD8⁺ Т-клетки. Супернатант культуры хранили при -80°C для дополнительных анализов ELISA, в то время как CD8⁺ Т-клетки ресуспендировали в X-VIVO, содержащем IL-2, и подсчитывали с применением проточной цитометрии (абсолютный подсчет CD8⁺-клеток). CD8⁺ Т-клетки возвращали в культуру для второго контакта с тем же условием стволовых клеток печени (стимулированные или нет), что и для первого контакта. Второй контакт длился 5 дней (= день 11), после чего собирали супернатанты после совместного культивирования, CD8⁺ Т-клетки и стволовые клетки печени. Жизнеспособность и количество клеток CD8⁺ Т-клеток и стволовых клеток печени оценивали с применением проточной цитометрии с помощью конъюгированных с APC антител к CD8 и DAPI.

Влияние провоспалительного прекондиционирования на устойчивость к цитотоксичности CD8⁺ Т-клеток оценивали с помощью оптической микроскопии, определения жизнеспособности и количества клеток в конце совместного культивирования, а также путем измерения секретируемого IFN γ (суррогат активации CD8⁺ Т-клеток) в супернатанте после совместного культивирования.

Результаты

На фигуре 10A показаны иллюстративные изображения стволовых клеток печени после совместного культивирования с CD8⁺ Т-клетками (день 5 второго контакта). Стволовые клетки печени, стимулированные провоспалительными цитокинами, все еще наблюдали в конце совместного культивирования, в то время как большинство нестимулированных клеток уничтожалось.

На фигуре 10B показано количество стволовых клеток печени в конце совместного культивирования с CD8⁺ Т-клетками (второй контакт). Количество клеток определяли с применением проточной цитометрии (абсолютное количество с применением MacsQuant от компании Miltenyi, за исключением CD8⁺ положительных клеток). При стимуляции клеток подсчитывали больше клеток по сравнению с нестимулированными клетками, в среднем 15199 по сравнению с 3581 клеткой соответственно (n = 4, включая двух различных доноров печени и двух доноров РВМС).

На фигуре 10C показано количество CD8⁺ Т-клеток в конце совместного культивирования со стволовыми клетками печени (второй контакт). Количество CD8⁺ Т-клеток измеряли в конце эксперимента, поскольку Т-клетки после активации пролиферировали. В среднем в конце совместного культивирования с нестимулированными клетками имелось больше CD8⁺ Т-клеток по сравнению со стимулированными клетками (188369 и 87930 клеток). Количество CD8⁺ Т-клеток подсчитывали с применением проточной цитометрии (абсолютное количество с применением MacsQuant от компании Miltenyi, включая только CD8⁺ положительные клетки). (n = 4, включая двух различных доноров печени и двух доноров РВМС.)

На фигуре 10D показана концентрация IFN γ в конце совместного культивирования популяции клеток-предшественников печени, экспрессирующих высокий уровень HLA-E/CD8⁺ Т-клеток (второй контакт). Концентрация IFN γ в супернатанте совместной культуры выше, когда CD8⁺ Т-клетки инкубировали с

нестимулированными клетками-предшественниками печени по сравнению со стимулированными клетками-предшественниками печени. Поскольку секреция IFN γ Т-клетками связана с активацией, это демонстрировало, что стимулированные стволовые клетки печени активировали меньше CD8⁺ Т-клеток. IFN γ измеряли с помощью ELISA в супернатантах совместной культуры CD8⁺ Т-клеток и стволовых клеток печени. (n = 12, включая двух различных доноров стволовых клеток печени и четырех доноров РВМС.)

Вывод

После стимуляции провоспалительной смесью популяция клеток-предшественников печени, экспрессирующих высокий уровень HLA-E, была защищена от цитолиза, опосредованного CD8⁺ Т-клетками. Кроме того, активация CD8⁺ Т-клеток снижалась при инкубации со стимулированными стволовыми клетками печени по сравнению с нестимулированными клетками (на что указывало снижение пролиферации Т-клеток и секреции IFN γ). Эта защита коррелировала с более высоким уровнем экспрессии HLA-E.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первоначально поданная формула изобретения

1. Композиция, содержащая полученные из печени взрослого человека клетки-предшественники или стволовые клетки, отличающаяся тем, что по меньшей мере 60% указанных клеток-предшественников или стволовых клеток экспрессируют маркер клеточной поверхности HLA-E.
2. Композиция по п. 1, где по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% указанных клеток-предшественников или стволовых клеток экспрессируют маркер клеточной поверхности HLA-E.
3. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где клетки, экспрессирующие HLA-E, характеризуются относительной медианной интенсивностью флуоресценции (rMFI) HLA-E, составляющей по меньшей мере 6,5, измеренной с применением проточной цитометрии и с применением антитела к HLA-E человека.
4. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где клетки, экспрессирующие HLA-E, демонстрируют относительную медианную интенсивность флуоресценции (rMFI) HLA-E, составляющую по меньшей мере 7, более предпочтительно по меньшей мере 8, более предпочтительно по меньшей мере 9, более предпочтительно по меньшей мере 10, измеренную с применением проточной цитометрии.
5. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где указанные полученные из печени взрослого человека клетки-предшественники или стволовые клетки являются положительными по по меньшей мере одному мезенхимальному маркеру, выбранному из виментина, CD13, CD90, CD73, CD44, CD29, α -актина гладких мышц (ASMA) и/или CD140b.
6. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где указанная композиция содержит секретлируемый HLA-G.
7. Композиция по любому из предыдущих пунктов, отличающаяся тем, что указанная композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

8. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени, которая является положительной по HLA-E.
9. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по п. 8, где указанная клетка представляет собой клетку печени человека, предпочтительно клетку печени взрослого человека.
10. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по любому из предыдущих пунктов, где клетки, экспрессирующие HLA-E, характеризуются относительной медианной интенсивностью флуоресценции (rMFI) HLA-E, составляющей по меньшей мере 6,5, измеренной с применением проточной цитометрии и с применением антитела к HLA-E человека.
11. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по любому из предыдущих пунктов, где указанная клетка прекондиционирована одним или более цитокинами.
12. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по п. 11, где указанная клетка характеризуется повышенными уровнями экспрессии HLA-E по сравнению с исходной экспрессией HLA-E в непрекондиционированной клетке-предшественнике или стволовой клетке печени.
13. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по п. 11 или п. 12, где указанные цитокины выбраны из $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-10$ и любых их комбинаций.
14. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по любому из пп. 11-13, где указанные цитокины добавлены к клеточной среде указанной клетки в общей концентрации от 5 нг/мл до 400 нг/мл.
15. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по любому из пп. 11-14, где концентрация отдельных цитокинов в клеточной среде составляет от 5 нг/мл до 100 нг/мл.
16. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по любому из пп. 11-15, где указанные цитокины представляют собой по меньшей мере $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$.

17. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по п. 16, где указанные цитокины дополнительно содержат IL-1 β .
18. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по любому из пп. 11-17, где указанная клетка прекондиционирована в течение от 1 часа до 72 часов, более предпочтительно от 12 до 60 часов.
19. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по любому из пп. 11-18, где указанная клетка дополнительно является положительной по HLA-G.
20. Выделенная клетка-предшественник или стволовая клетка печени по любому из пп. 11-19, где указанная клетка дополнительно характеризуется повышенными уровнями секреции PGE2 по сравнению с исходной секрецией PGE2 в непрекондиционированных клетках-предшественниках или стволовых клетках печени; и/или повышенными уровнями ферментативной активностиIDO по сравнению с исходной ферментативной активностью IDO в непрекондиционированных клетках-предшественниках или стволовых клетках печени.
21. Популяция клеток, содержащая выделенные клетки-предшественники или стволовые клетки печени по любому из пп. 8-20.
22. Популяция клеток по п. 21, где по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% указанных клеток-предшественников или стволовых клеток экспрессируют маркер клеточной поверхности HLA-E.
23. Композиция, содержащая клетки по любому из пп. 8-20 или популяцию клеток по п. 21 или п. 22.
24. Композиция по любому из пп. 1-7 или п. 23, выделенные клетки-предшественники печени по любому из пп. 8-20 или популяция клеток по п. 21 или п. 22 для применения в иммунотерапии и/или в лечении нарушений с нежелательным иммунным ответом.

25. Композиция по любому из пп. 1-7 или п. 23, выделенные клетки-предшественники печени по любому из пп. 8-20 или популяция клеток по п. 21 или п. 22 для применения в лечении фиброзных нарушений.

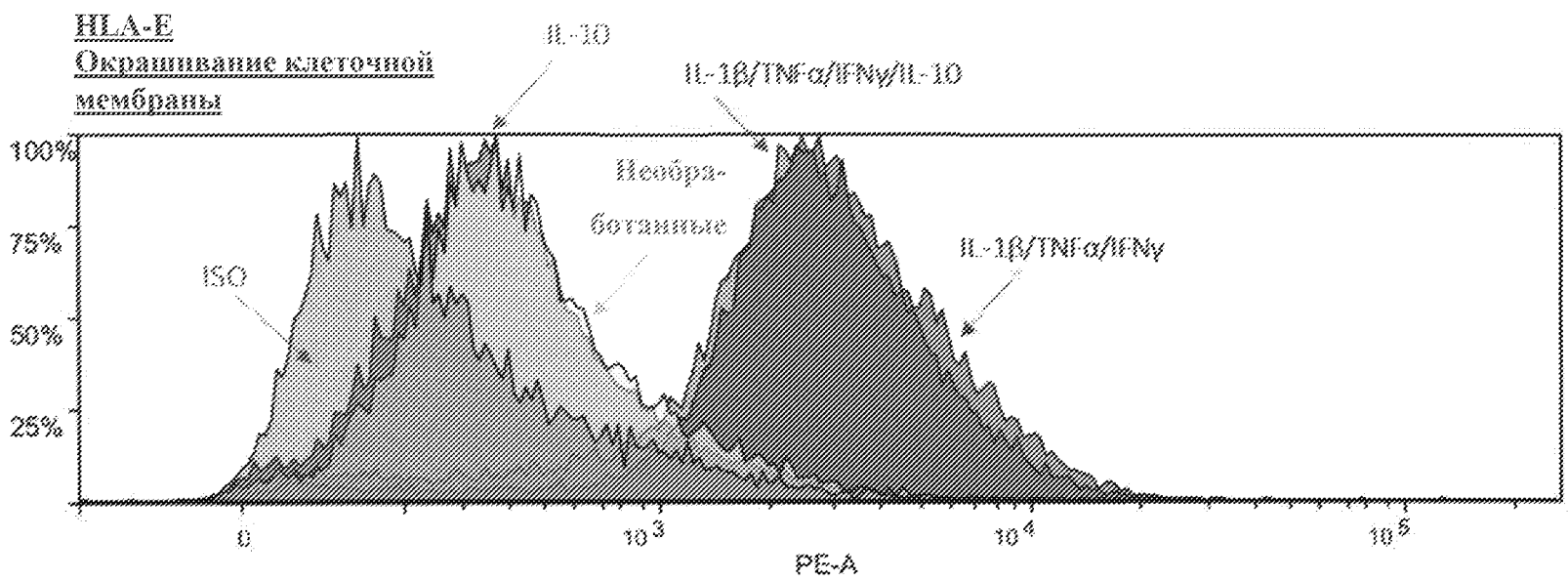
26. Композиция по любому из пп. 1-7, выделенные клетки-предшественники печени по любому из пп. 8-20 или популяция клеток по п. 21 или п. 22 для применения в лечении заболеваний печени.

27. Композиция, выделенные клетки или популяция клеток для применения по п. 26, где указанное заболевание печени представляет собой фибровоспалительное хроническое заболевание печени.

28. Композиция, выделенные клетки или популяция клеток для применения по п. 26 или п. 27, где указанное заболевание печени выбрано из перечня, состоящего из синдрома Алажиля, алкогольной болезни печени (алкогольного цирроза), недостаточности α 1-антитрипсина (все фенотипы), типов гиперлипидемии и других нарушений липидного обмена, аутоиммунного гепатита, синдрома Бадда-Киари, билиарной атрезии, прогрессирующего семейного холестаза I, II и III типов, рака печени, болезни Кароли, синдрома Криглера-Наджара, фруктоземии, галактоземии, дефектов, связанных с недостаточностью гликозилирования углеводами, других нарушений углеводного обмена, болезни Рефсума и других пероксисомальных заболеваний, болезни Ниманна-Пика, болезни Вольмана и других лизосомальных нарушений, тирозинемии, синдрома, предусматривающего гиперорнитинемию-гипераммониемию-гомоцитруллинурию, и других нарушений обмена аминокислот, синдрома Дубина-Джонсона, жировых заболеваний печени, в том числе неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD) и неалкогольного стеатогепатита (NASH), хронической печеночной недостаточности, обострения хронической печеночной недостаточности (ACLF), синдрома Жильбера, болезни накопления гликогена I и III, гемохроматоза, гепатита A-G, порфирии, первичного билиарного цирроза, склерозирующего холангита, тирозинемии, недостаточностей фактора свертывания крови, гемофилии B, фенилкетонурии, болезни Вильсона, фульминантной печеночной недостаточности, печеночной недостаточности после гепатэктомии, заболеваний митохондриальной дыхательной цепи.

29. Композиция по любому из пп. 1-7 или п. 23, выделенные клетки-предшественники печени по любому из пп. 8-20 или популяция клеток по п. 21 или п. 22 для применения в трансплантации клеток, предпочтительно аллогенной трансплантации.
30. Способ получения HLA-E-положительных клеток-предшественников или стволовых клеток печени, при этом указанный способ включает стадию добавления одного или более цитокинов в среду для культивирования клеток-предшественников или стволовых клеток печени.
31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что цитокины выбраны из группы, состоящей из IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-10 и любых их комбинаций.
32. Способ по п. 30 или п. 31, отличающийся тем, что указанные цитокины добавляются в общей концентрации от 5 нг/мл до 400 нг/мл и/или при этом концентрация отдельных цитокинов составляет от 5 до 200 нг/мл.
33. Способ по любому из пп. 30-32, отличающийся тем, что указанные цитокины представляют собой по меньшей мере IFN γ и TNF α и необязательно IL-1 β .

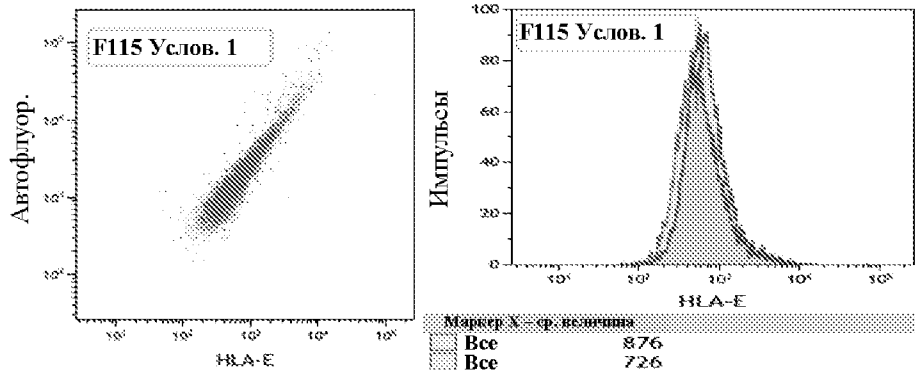
Фигура 1



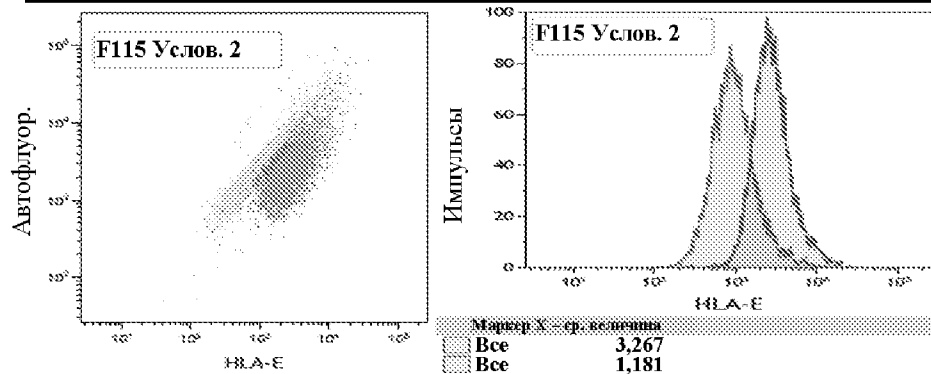
Фигура 2А

F115 (антитело: красный; изотип: зеленый)

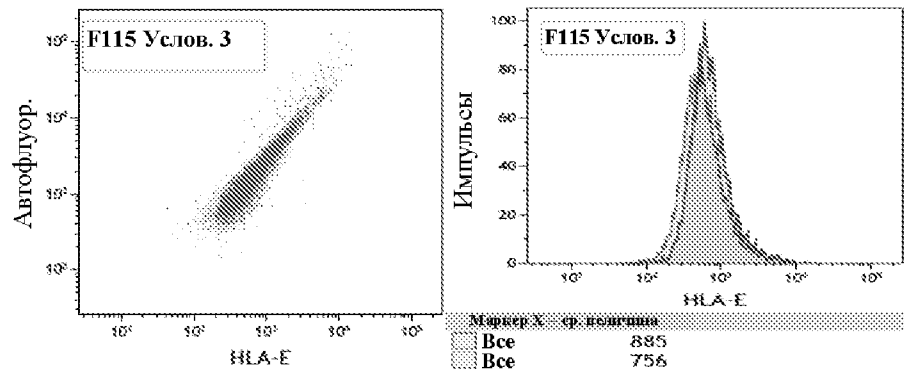
Необработанные



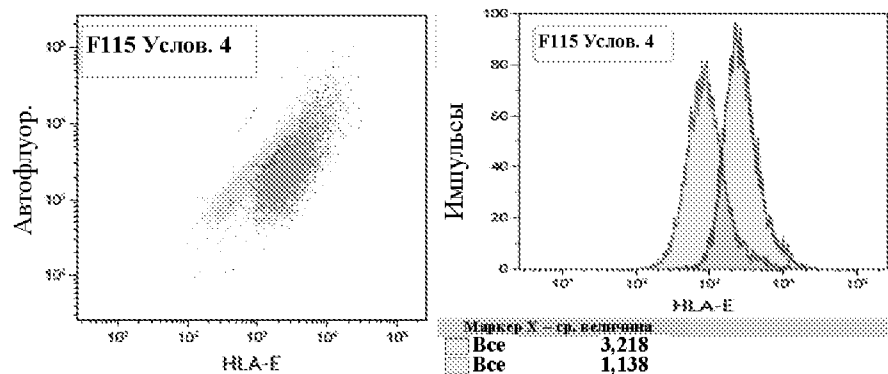
IL-10/TNFi/IFN γ



IL-10



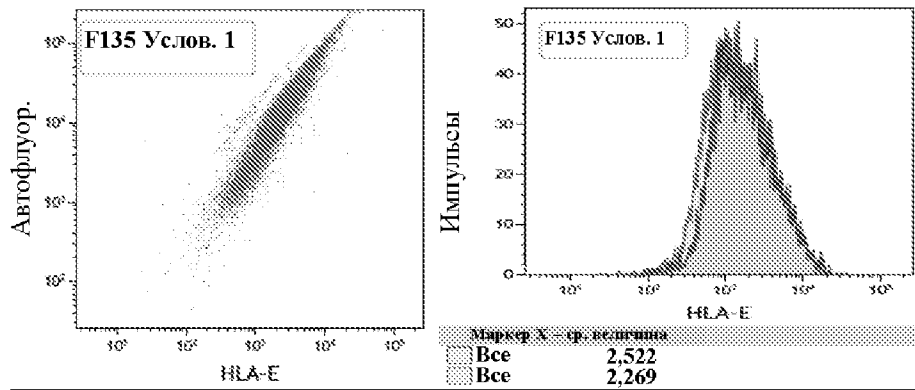
*IL-10/TNFi/IFN γ
 + IL-10*



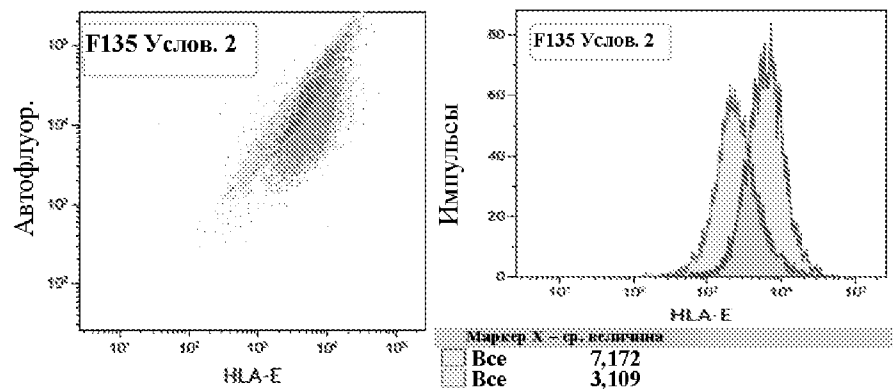
Фигура 2В

F135 (СИНТЕТИЧЕСКИЙ; ИСТОЧНИК: СОСЫСЫ)

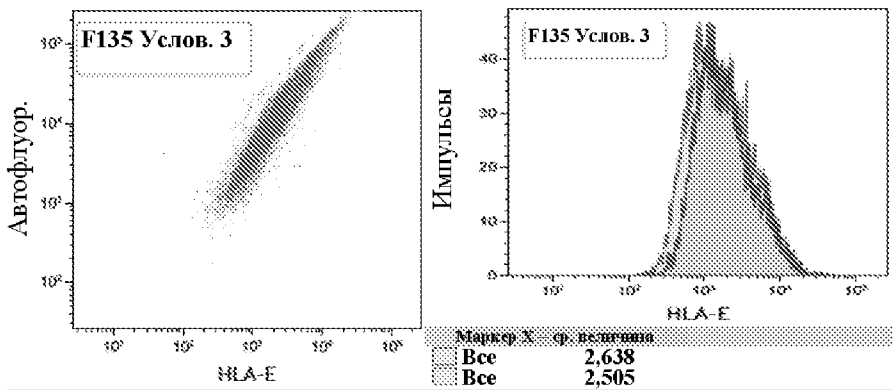
Необработанные



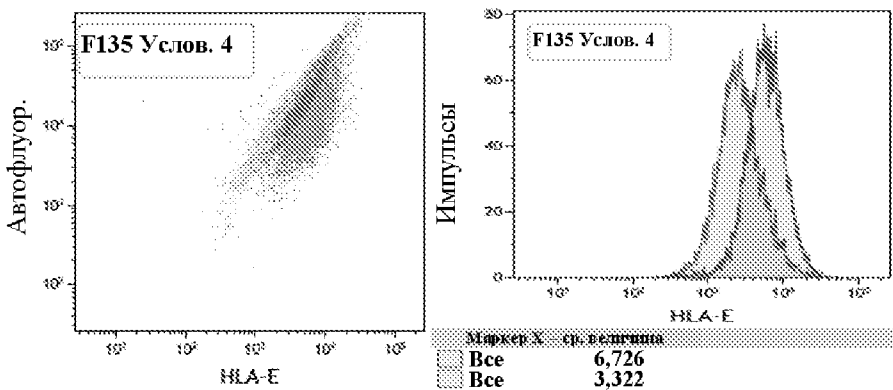
IL-10/TNF α /IFN γ



IL-10



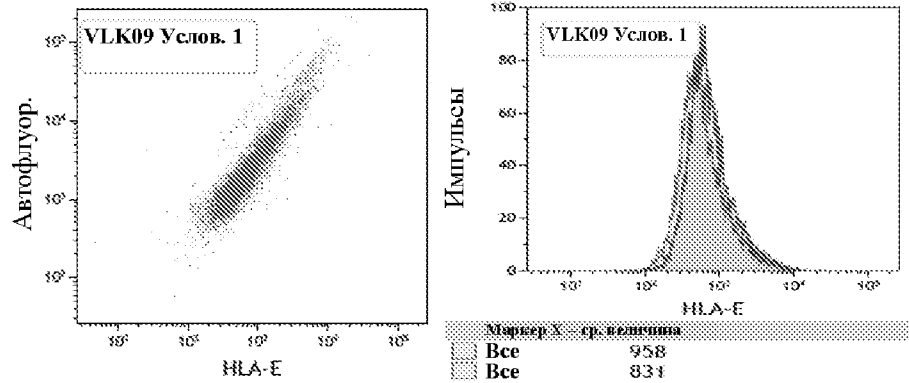
*IL-10/TNF α /IFN γ
+ IL-10*



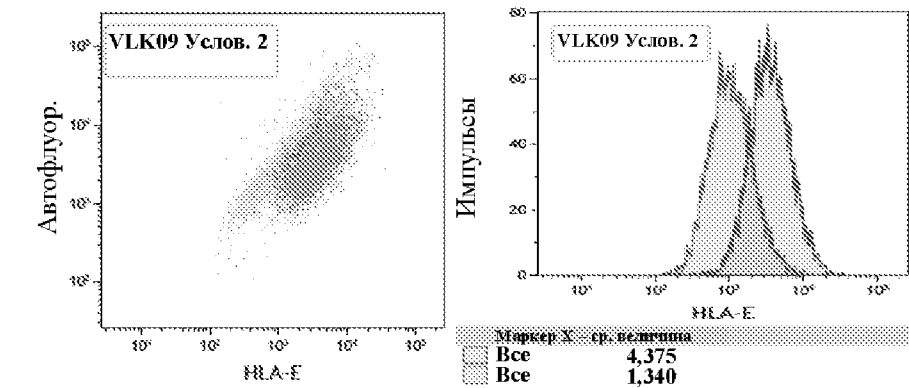
Фигура 2С

VLK019 (ИНТЕРЛЕУКИНОВЫЙ РЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС)

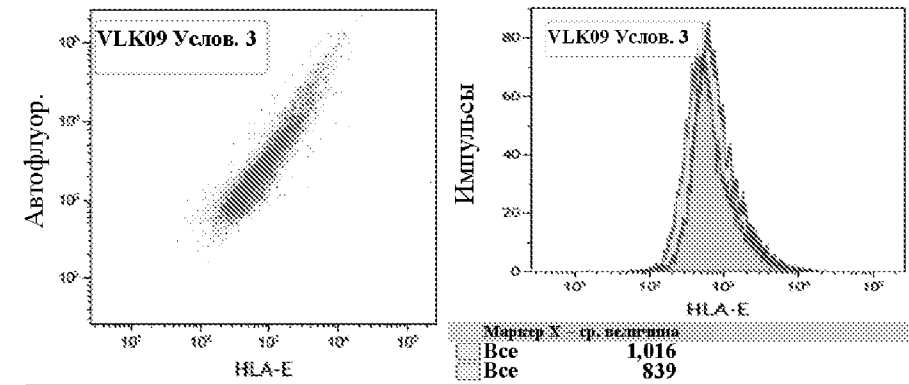
Необработанные



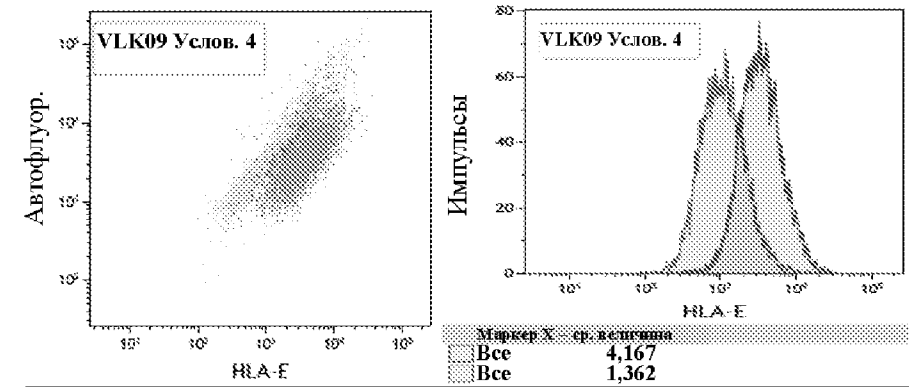
IL-1β/TNFα/IFNγ



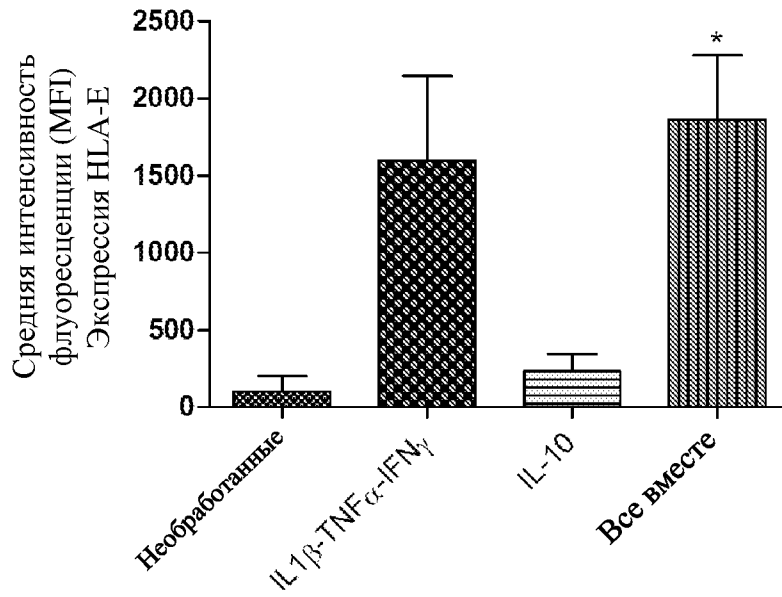
IL-10



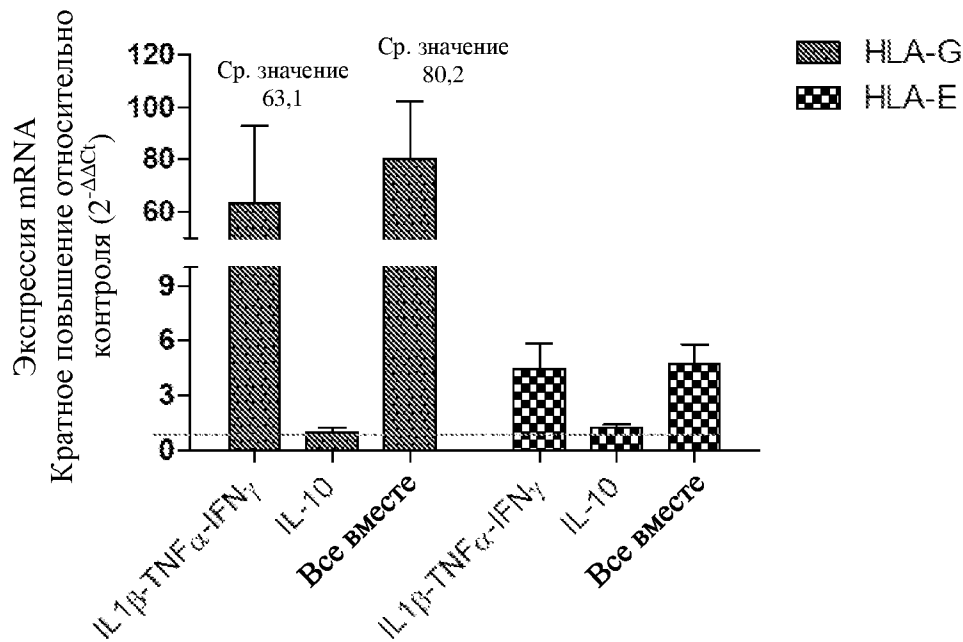
IL-1β/TNFα/IFNγ
+ IL-10



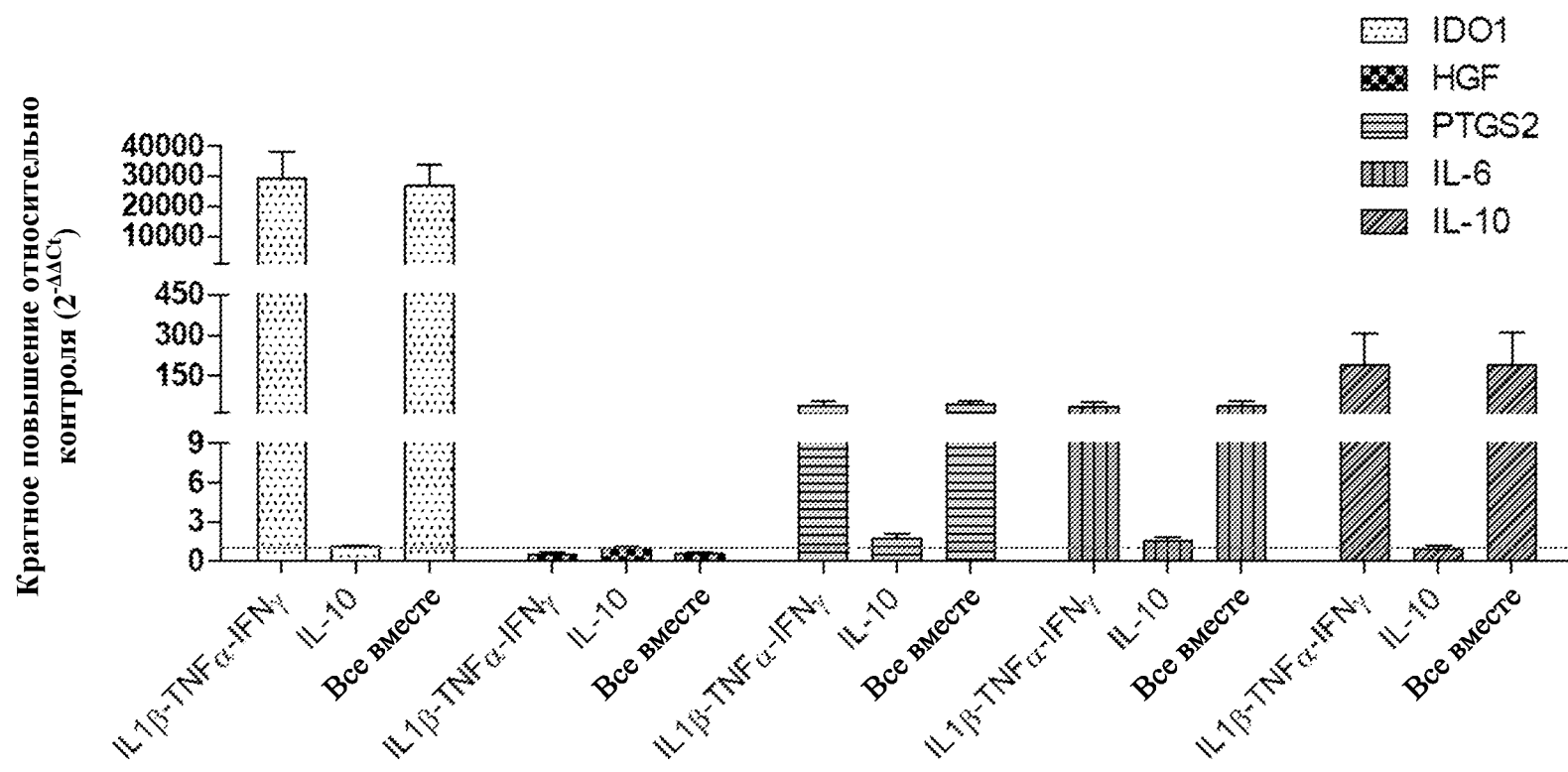
Фигура 3



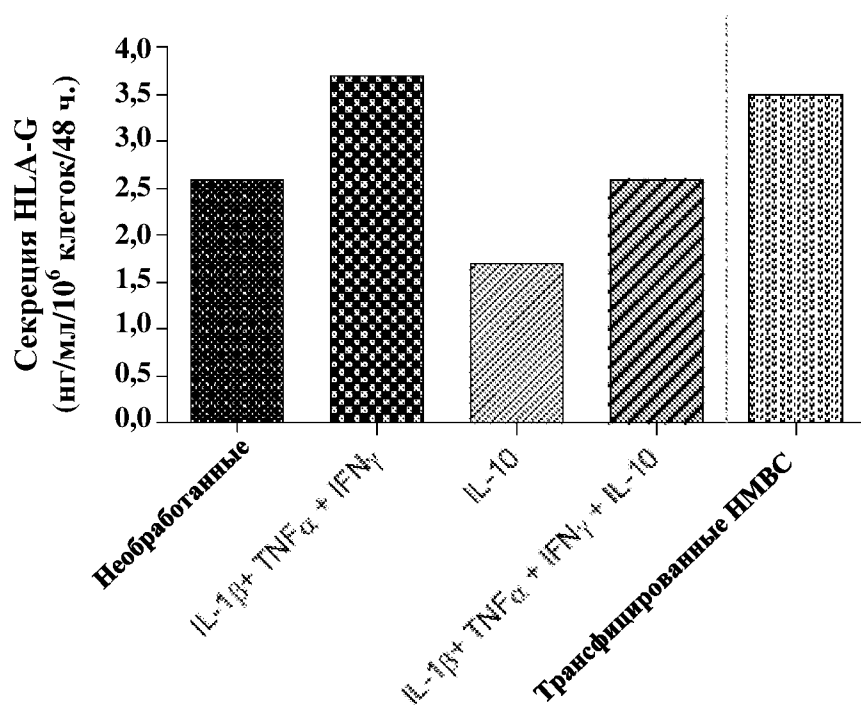
Фигура 4



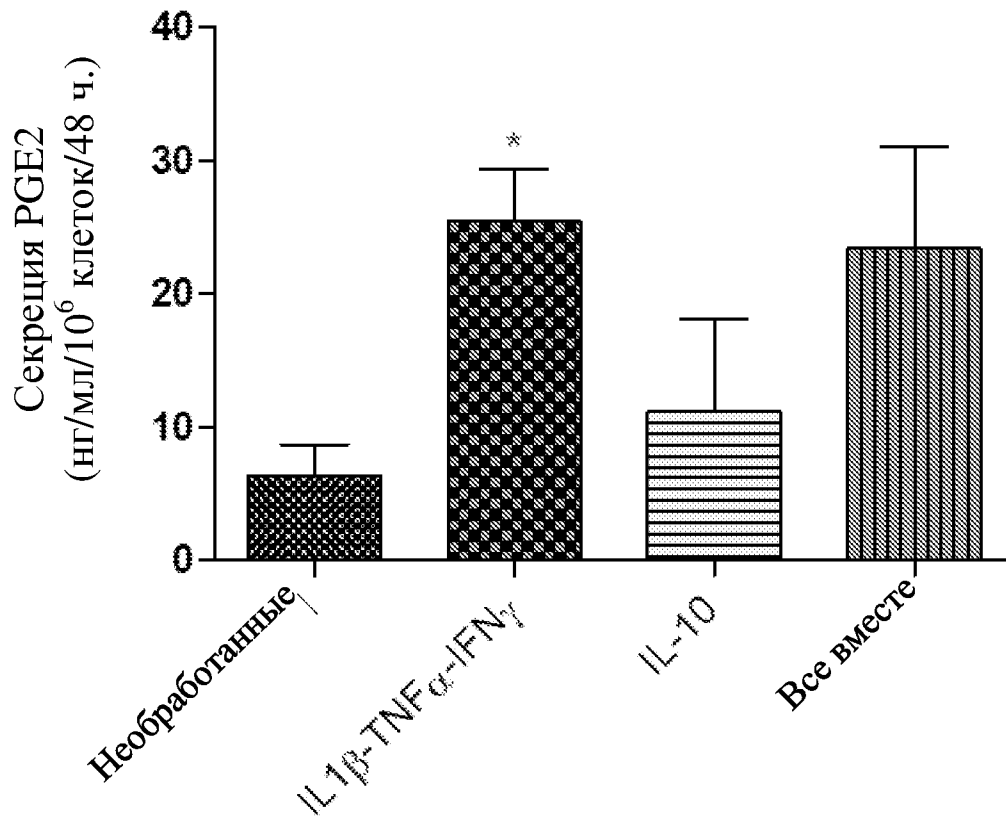
Фигура 5



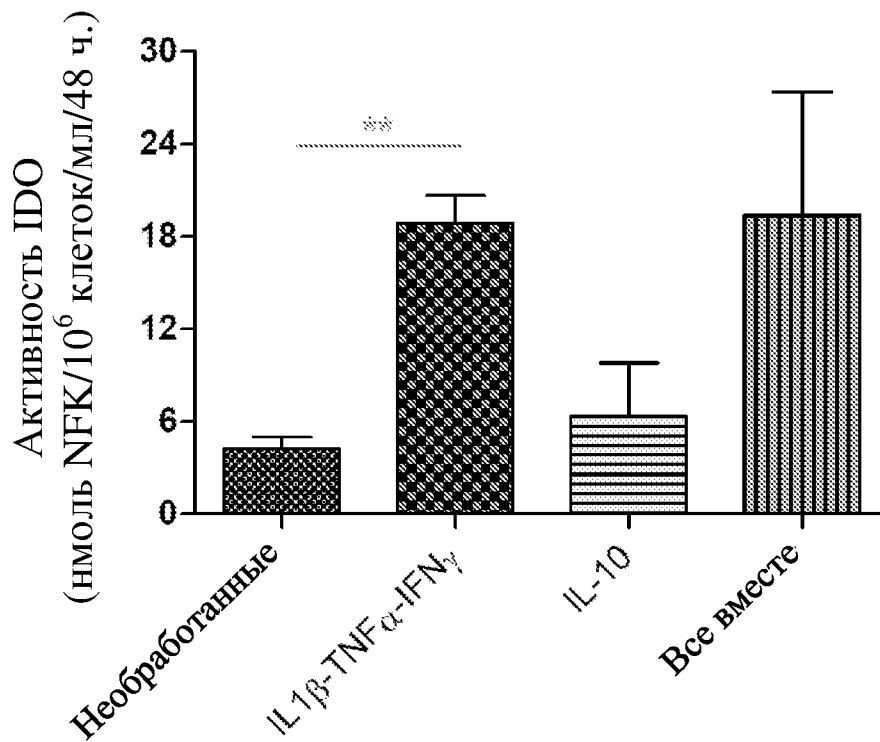
Фигура 6



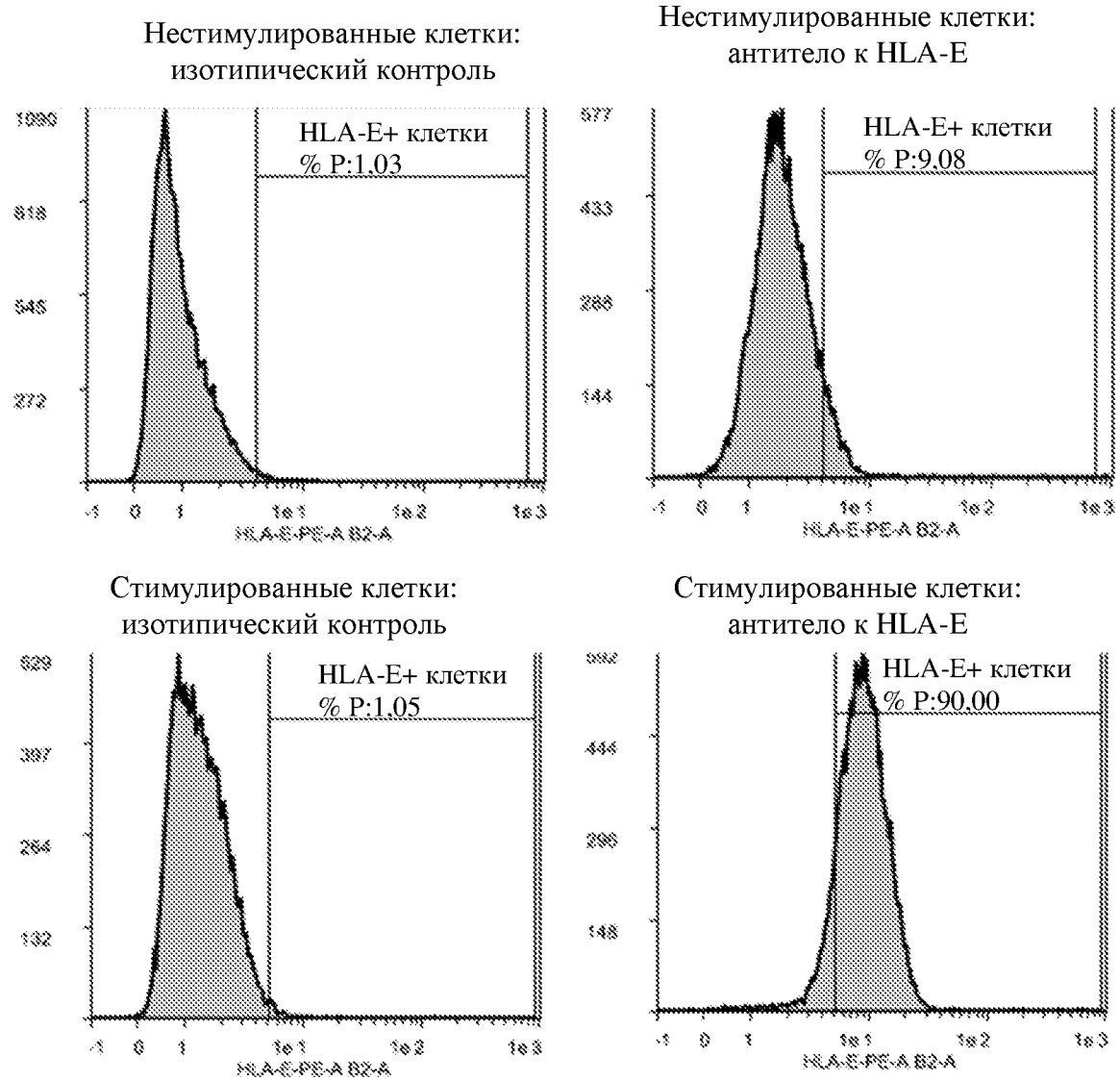
Фигура 7



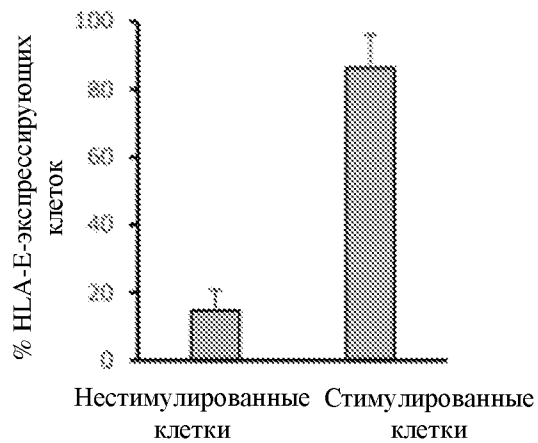
Фигура 8



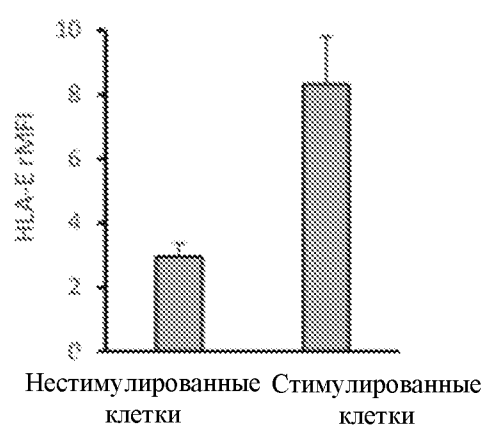
Фигура 9А

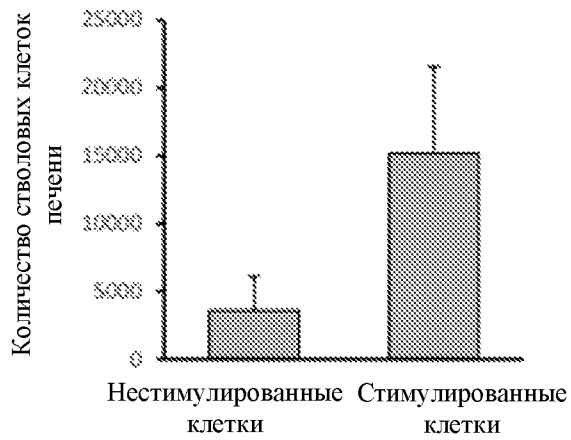


Фигура 9В

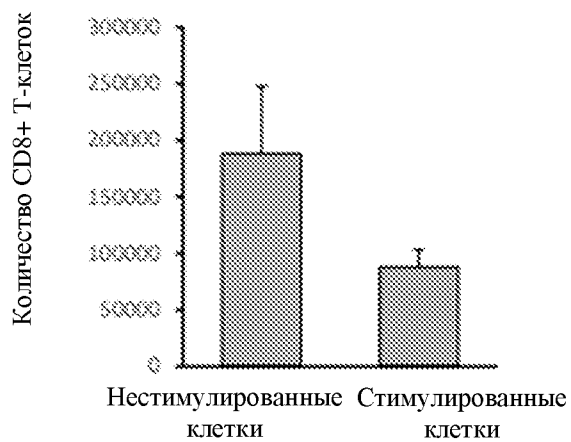


Фигура 9С

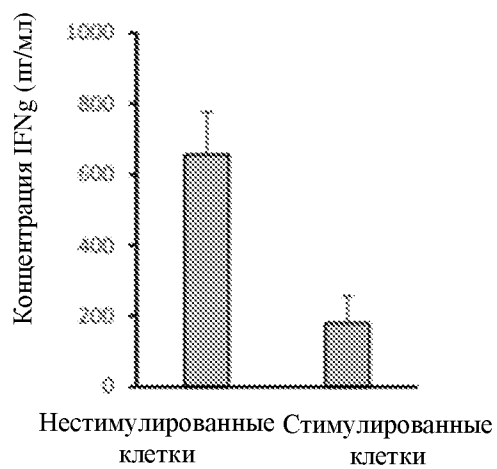


Фигура 10А**Фигура 10В**

Количество клеток-предшественников после второго контакта с CD8+ T-клетками

Фигура 10С

Количество CD8+ T-клеток после второго контакта с CD8+ T-клетками

Фигура 10D

Секреция IFN γ (замена активации T-клеток)