

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292157** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.16

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
C12N 5/0797 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.01.22

**(54) ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ Т-КЛЕТОК БЕЗ СТРОМЫ ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

(31) 62/964,857; 63/025,412

(32) 2020.01.23; 2020.05.15

(33) US

(86) PCT/US2021/014654

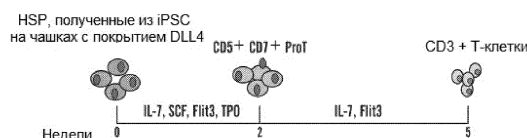
(87) WO 2021/150919 2021.07.29

(71) Заявитель:
**ЗЕ ЧИЛДРЕН'С МЕДИКАЛ СЕНТЕР
КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:
Дэйли Джордж К., Цзин Жань (US)

(74) Представитель:
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Прищепный С.В., Джермакян
Р.В. (RU)**

(57) Описанная в изобретении технология направлена на способы дифференциации Т-клеток без использования стромы. Также в изобретении описаны иммунные клетки, дифференцированные способами без использования стромы, а также композиции, содержащие такие иммунные клетки. В некоторых вариантах выполнения иммунные клетки могут быть генетически модифицированы. В некоторых вариантах выполнения иммунные клетки или композиции, содержащие указанные иммунные клетки, можно вводить пациенту в рамках заместительной клеточной терапии для лечения патологии.



A1

202292157

202292157

A1

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ Т-КЛЕТОК БЕЗ СТРОМЫ ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

ОПИСАНИЕ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[0001] В соответствии с 35 USC §119(e) настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на выдачу патента США № 62/964857, поданной 23 января 2020 года, и предварительной заявки на выдачу патента США № 63/025412, поданной 15 мая 2020 года, содержание каждой из которых включено сюда во всей их полноте посредством ссылки.

Государственная поддержка

[0002] Это изобретение сделано при государственной поддержке в рамках гранта № 2U01DK104218, выданного Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на настоящее изобретение.

Перечень последовательностей

[0003] Настоящая заявка включает Перечень последовательностей, который был представлен в формате ASCII через EFS-Web, и тем самым он полностью включен посредством ссылки. Указанный файл ASCII, созданный 22 января 2021 года, имеет название 701039-096580WOPT_SL.txt и размер 108672 байта.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[0004] Описанная здесь технология относится к способам дифференциации иммунных клеток.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[0005] Для заместительной клеточной терапии *in vivo*, терапии множества заболеваний, расстройств и состояний, а также для исследований и моделирования заболеваний *in vitro*, скрининга лекарств и гематологических заболеваний не хватает функциональных иммунных клеток. Т-клетки являются ключевыми компонентами адаптивной иммунной системы человека, и они обладают большим терапевтическим потенциалом. Однако современная Т-клеточно-опосредованная терапия основана на аутологичных Т-клетках, что препятствует ее широкому применению. Индуцированные

человеком плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) представляют собой идеальный источник для масштабируемого производства готовых продуктов для клеточной терапии. Однако получение зрелых и функциональных Т-клеток из iPSC оказалось затруднительным. Кроме того, дифференциация iPSC требует совместного культивирования со стромальными клетками мыши, что ограничивает трансляционный потенциал Т-клеток, полученных из iPSC. Таким образом, существует потребность в высокоэффективных, клинически применимых способах дифференциации Т-клеток.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[0006] Описанная здесь технология направлена на способы дифференциации Т-клеток. В одном аспекте способ, описанный здесь, представляет собой способ дифференциации Т-клеток без стромы, т.е. способ, который не предусматривает совместного культивирования со стромальными клетками или поддерживающими клетками любого другого типа. Совместное культивирование со стромальными клетками, такими как стромальные клетки мыши, ограничивает трансляционный потенциал Т-клеток, полученных из iPSC; например, могут быть опасения отторжения трансплантата из-за наличия стромальных клеток. Кроме того, Т-клетки, дифференцированные с использованием стромальных клеток, имеют врожденный фенотип (например, по данным экспрессии TCRgd, который является маркером для гамма-дельта Т-клеток). Предпочтительно, чтобы Т-клетки проявляли адаптивный фенотип, например, характеризующийся экспрессией TCR α и β . Кроме того, как описано здесь, способы дифференциации Т-клеток без стромы приводят к увеличению количества CD3⁺ Т-клеток (например, клеток CD4⁺CD8⁺), по сравнению со способами дифференциации, предусматривающими совместное стромальное культивирование.

[0007] Соответственно, Т-клетки, дифференцированные способами без использования стромы, и в одном варианте выполнения изобретения - в сочетании с ингибированием эпигенетического регулятора (например, гистонметилтрансферазы (HMT); например, EZH1, G9a/GLP), проявляют по меньшей мере следующие неожиданные преимущества по сравнению со способами с совместным культивированием с использованием стромы: (1) повышенный потенциал для трансплантации у людей; (2) уменьшенное количество врожденно-подобных Т-клеток; (3) повышенное количество и/или процентное содержание образующихся Т-клеток (например, CD5⁺CD7⁺ Pro-T-клеток; CD3⁺ Т-клеток; CD4⁺CD8⁺ Т-клеток; CD4⁺ Т-клеток; CD8⁺ Т-клеток; альфа-бета Т-клеток); (4) профили экспрессии генов наиболее сходны с альфа-бета-Т-клетками; (5)

более разнообразный репертуар TCR; и/или (6) увеличение длины CDR TCR (см., например, пример 1, Фиг. 1C-1D, Фиг. 3A-3B, Фиг. 4, Фиг. 5A-5D, Фиг. 6-16).

[0008] В одном аспекте здесь предложен способ, предусматривающий (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; (b) ингибирование гистонметилтрансферазы в образовавшейся популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (c) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[0009] В другом аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; (b) ингибирование эпигенетического регулятора в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (c) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[0010] В другом аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; (b) ингибирование G9a и/или GLP в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (c) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[0011] В другом аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[0012] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения лиганд Notch присоединен к твердой подложке.

[0013] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения лиганд Notch присоединен к чашке для культивирования клеток.

[0014] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения лиганд Notch не происходит из стромальной клетки.

[0015] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения дифференциация гомогенного эндотелия в присутствии лиганда Notch не предусматривает совместного культивирования со стромальной клеткой, экспрессирующей лиганд Notch.

[0016] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения дифференциация гомогенного эндотелия в присутствии лиганда Notch не предусматривает совместного культивирования с клетками OP9-DL1 или клетками OP9-DL4.

[0017] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения лиганд Notch выбран из группы, состоящей из Delta-like-1 (DLL1), Delta-like-4 (DLL4), иммобилизованного Delta1^{ext-IgG} и иммобилизованного Delta4^{ext-IgG}.

[0018] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения иммобилизованный Delta1^{ext-IgG} состоит из внеклеточного домена Delta-like-1 человека, слитого с доменом Fc IgG1 человека.

[0019] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток составляет по меньшей мере 4 недели.

[0020] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток не содержит сыворотки.

[0021] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток содержит FLT3 и IL7.

[0022] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток содержит 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7.

[0023] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл тромбопоэтина (ТРО) и/или 30 нг/мл SCF в течение по меньшей мере первых 2 недель дифференциации в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток.

[0024] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащая ТРО, способствует дифференциации в популяцию CD5⁺ CD7⁺ Pro Т-клеток.

[0025] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения популяция CD3⁺ Т-клеток включает популяцию CD4⁺CD8⁺ Т-клеток.

[0026] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает дифференциацию популяции CD4⁺CD8⁺ Т-клеток в среде для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD4⁺ клеток и популяцию CD8⁺ клеток.

[0027] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD4⁺CD8⁺ Т-клеток в популяцию CD4⁺ Т-клеток и популяцию CD8⁺ клеток составляет по меньшей мере 1 неделю.

[0028] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34⁺ гомогенного эндотелия в популяцию CD4⁺ Т-клеток и популяцию CD8⁺ клеток составляет по меньшей мере 5 недель.

[0029] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения среда для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки содержит 10 нг/мл IL-15 и активатор Т-клеток.

[0030] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения активатор Т-клеток содержит 10 мкл/мл активатора CD3/CD28 Т-клеток.

[0031] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения активатор Т-клеток содержит одну гранулу активатора CD3/CD28 Т-клеток Dynabeads на клетку.

[0032] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает стадию обогащения клеток CD4⁺ и/или обогащения клеток CD8⁺ по меньшей мере через 1 неделю.

[0033] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения популяция плюрипотентных стволовых клеток включает индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) или эмбриональные стволовые клетки (ESC).

[0034] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем введения в зрелые клетки только факторов перепрограммирования *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и необязательно *c-MYC* или *nanog* и *LIN28*.

[0035] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем введения факторов перепрограммирования в зрелые клетки два или более раз.

[0036] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения популяция плюрипотентных стволовых клеток дифференцируется в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия с использованием эмбрионидных телец или двумерных (2D) адгезивных культур.

[0037] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия составляет по меньшей мере 8 дней.

[0038] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения среда для агрегации содержит BMP4, SB-431542, CHIR99021, bFGF, VEGF, IL-6, IL-11, IGF-1, SCF и EPO.

[0039] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения среда для агрегации содержит 10 нг/мл BMP4, 6 мМ SB-431542, 3 мМ CHIR99021, 5 нг/мл bFGF, 15 нг/мл VEGF, 10 нг/мл IL-6, 5 нг/мл IL-11, 25 нг/мл IGF-1, 50 нг/мл SCF и 2 ЕД/мл EPO.

[0040] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает отбор или выделение полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия с использованием экспрессии поверхностных маркеров на популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия.

[0041] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов популяция CD34⁺ гемогенного эндотелия является CD45-отрицательной/низкой.

[0042] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов популяция CD34⁺ гемогенного эндотелия является CD38-отрицательной/низкой.

[0043] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения способ дополнительно предусматривает стадию генетической модификации полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия или полученной популяции CD3⁺ Т-клеток.

[0044] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения генетическая модификация представляет собой редактирование эндогенного HLA, удаление эндогенного TCR и/или экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR).

[0045] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения гистонметилтрансфераза катализирует присоединение метильной группы к остатку лизина 9 гистона 3 (H3K9) и/или к остатку лизина 27 гистона 3 (H3K27).

[0046] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения гистонметилтрансферазу H3K9 и/или H3K27 ингибируют низкомолекулярным ингибитором или ингибитором нуклеиновой кислоты.

[0047] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы H3K9 и/или H3K27 представляет собой гетероорганическое соединение или металлоорганическое соединение.

[0048] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы H3K9 и/или H3K27 выбран из группы, состоящей из BIX-01294, UNC0638, E72, BRD4770, A-366, хетоцина, UNC0224, UNC0631, UNC0646, EPZ005687, EPZ-6438 (E7438), 3-деазанепланоцина А (DZNep), EI1, GSK343, GSK126 и UNC1999.

[0049] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой нуклеиновую кислоту, нацеленную на экспрессию гистонметилтрансферазы.

[0050] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой РНК-интерферирующий ингибитор или агент.

[0051] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой EZH1-специфическую нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из аптамера, связывающего EZH1, EZH1-специфического агента РНК-интерференции и вектора, кодирующего EZH1-специфического агента РНК-интерференции, где РНК-интерферирующий агент содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 11-19.

[0052] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения эпигенетический регулятор представляет собой ДНК-метилтрансферазу (DNMT); белок метил-CpG-связывающего домена (MBD); ДНК-деметилазу; гистонметилтрансферазу (HMT); белок, связывающий метилгистон; гистондеметилазу; гистон-ацетилтрансферазу (HAT); ацетилсвязывающий белок; или гистондеацетилазу (HDAC).

[0053] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов ингибитор эпигенетического регулятора выбран из группы, состоящей из UNC0224; MC1568 и CAY10591.

[0054] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения ингибитор эпигенетического регулятора представлен в концентрации по меньшей мере 500 нМ.

[0055] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34⁺ клеток в популяцию CD5⁺CD7⁺ рго Т-клеток составляет приблизительно 14 дней.

[0056] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов ингибитор G9a и/или GLP выбран из группы, состоящей из: UNC0224; UNC0638; A366; BRD4770; BIX01294; UNC0642; UNC0631; UNC0646; UNC0321; E72; BIX-01338; BRD9539; хетоцина и DCG066.

[0057] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения ингибитор G9a и/или GLP представляет собой UNC0224.

[0058] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения ингибитор G9a и/или GLP представлен в концентрации от 300 нМ до 5 мкМ.

[0059] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34⁺ клеток в популяцию CD5⁺CD7⁺ ргоТ-клеток составляет приблизительно 14 дней.

[0060] В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ, предусматривающий: (а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение по меньшей мере 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток; при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл TPO и 30 нг/мл SCF по меньшей мере в течение первых двух недель.

[0061] В одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ, предусматривающий: (а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение по меньшей мере 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток; при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл TPO, 30 нг/мл SCF и ингибитор G9a/GLP, в течение по меньшей мере первых двух недель.

[0062] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, наиболее сходный с альфа-бета-Т-клетками.

[0063] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или более подобен альфа-бета Т-клеткам.

[0064] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,85.

[0065] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет значение продуктивной клональности Симпсона равное приблизительно 0,025.

[0066] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет определяющую комплементарность область (CDR) Т-клеточного рецептора (TCR), которая по меньшей мере на 3 нуклеотида длиннее, чем у иммунной клетки, дифференцированной без ингибирования метилтрансферазы или с использованием стромальных клеток.

[0067] В одном аспекте, описанном здесь, предложена иммунная клетка, полученная способом, описанным здесь.

[0068] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, наиболее сходный с альфа-бета-Т-клетками.

[0069] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или более подобен альфа-бета Т-клеткам.

[0070] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,85.

[0071] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения иммунная клетка имеет значение продуктивной клональности Симпсона равное приблизительно 0,025.

[0072] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения иммунная клетка имеет определяющую комплементарность область (CDR) Т-клеточного рецептора (TCR), которая по меньшей мере на 3 нуклеотида длиннее, чем у

иммунной клетки, дифференцированной без ингибирования метилтрансферазы с использованием стромальных клеток.

[0073] В другом аспекте, описанном здесь, предложена композиция, содержащая иммунную клетку, описанную здесь, или ее популяцию.

[0074] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0075] В одном аспекте, описанном здесь, предложена фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку, описанную здесь, или ее популяцию, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0076] В другом аспекте, описанном здесь, предложена фармацевтическая композиция, описанная здесь, для применения в клеточной заместительной терапии у субъекта.

[0077] В одном аспекте, описанном здесь, предложен способ клеточной заместительной терапии, где способ предусматривает введение иммунных клеток, описанных здесь, или их популяции, или композиции, описанной здесь, или фармацевтической композиции, описанной здесь, субъекту-реципиенту, нуждающемуся в этом.

[0078] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения субъект-реципиент прошел химиотерапию и/или облучение.

[0079] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения субъект-реципиент имеет недостаточность иммунной функции и/или восстановления лимфоцитов.

[0080] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения иммунную клетку или ее популяцию перед трансплантацией обрабатывают *ex vivo* простагландином E2 и/или антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином (NAC) для стимуляции последующего приживания трансплантата у субъекта-реципиента.

[0081] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения иммунная клетка или ее популяция являются аутологичными по отношению к субъекту-реципиенту.

[0082] В некоторых вариантах выполнения любого из аспектов настоящего изобретения иммунная клетка или ее популяция имеет тип HLA, совпадающий с типом у субъекта-реципиента.

Краткое описание фигур

[0083] На **Фиг. 1A-1D** представлена серия схем и графиков, показывающих дифференциацию Т-клеток без стромы из плюрипотентных стволовых клеток человека. **Фиг. 1A** представлена схема, показывающая дифференциацию $CD3^+$ Т-клеток с использованием способа без стромы. Вкратце, планшеты, обработанные нетканевой культурой, покрывали рекомбинантными белками DL1/DL4-Fc человека (10 мкг/мл в PBS, 3 часа при комнатной температуре). Полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPC; например, $CD34^+$ гемогенный эндотелий) культивировали на планшетах, покрытых лигандом Notch (например, Delta Like Canonical Notch Ligand 4 (DLL4)) в среде, содержащей IL-7, фактор стволовых клеток (SCF), Flt3 и тромбопоэтин (TPO). Через 2 недели дифференцируются $CD5^+ CD7^+$ Т-клетки-предшественники (Pro T). Клетки Pro T продолжают дифференциацию в планшетах, покрытых DLL4, в среде, содержащей IL-7 и Flt3; еще приблизительно через 3 недели $CD3^+$ Т-клетки дифференцировались. На **Фиг. 1B** представлена серия графиков проточной цитометрии, показывающих экспрессию CD5 и CD7 (например, в качестве маркеров Т-клеток-предшественников) после 2 недель дифференциации (вверху слева, 28,1% $CD5^+ CD7^+$) или 5 недель дифференциации (вверху справа, 59,2% $CD5^+ CD7^+$) и экспрессию CD3 (например, в качестве маркера для Т-клеток) после 2 недель дифференциации (внизу слева, 4,70% $CD3^+$) или 5 недель дифференциации (внизу справа, 58,8% $CD3^+$). Следует обратить внимание на высокую долю $CD5^+ CD7^+$ Т-клеток-предшественников на 2-й и 5-й неделе и высокую долю $CD3^+$ Т-клеток на 5-й неделе. На **Фиг. 1C** представлена серия графиков проточной цитометрии, показывающих экспрессию CD4 и CD8 до (левый график) и после (правый график) стимуляции $CD3^+$ клеток антителом против CD3/CD28. Следует обратить внимание на более высокую долю одиночно-положительных клеток CD4 и CD8 после стимуляции по сравнению с клетками до стимуляции. На **Фиг. 1D** представлена серия графиков проточной цитометрии, показывающих экспрессию TCRgd (например, в качестве маркера врожденно-подобных Т-клеток или гамма-дельта Т-клеток) на Т-клетках, дифференцированных с использованием клеток стромы OP9-DL1 (левый график, 55,4% TCRgd⁺) или способом без стромы, описанным здесь (правый график, 5,71% TCRgd⁺). Следует обратить внимание на более низкую долю TCRgd⁺ врожденно-подобных Т-клеток при использовании способа без стромы, по сравнению со способом с использованием стромальных клеток OP9-DL1.

[0084] На **Фиг. 2A-2D** представлена серия схем и графиков, показывающих образование происходящих из iPSC химерного антигенного рецептора (CAR) Т-клеток. На **Фиг. 2A** представлена схема, показывающая введение анти-CD19 CAR в HSPC iPSC;

результатом дифференциации Т-клеток является популяция CAR iPSC-Т-клеток. На **Фиг. 2В** представлена серия графиков проточной цитометрии, показывающих экспрессию mCherry (например, в качестве маркера для CD19 CAR) в: нетрансдуцированных (UTD) контрольных клетках, которые не подвергались Т-клеточной дифференциации (левый график, 0,95% mCherry⁺); CD19 CAR трансдуцированных клетках, которые не подверглись Т-клеточной дифференциации (средний график, 64,3% mCherry⁺); и клетках, трансдуцированных CD19 CAR, после дифференциации Т-клеток (правый график, 80,9% mCherry⁺). Следует обратить внимание, что экспрессия mCherry (например, в качестве маркера CD19 CAR) сохранялась во время дифференциации. На **Фиг. 2С** представлен линейный график, показывающий размножение Т-клеток в контроле UTD и клетках, трансдуцированных CAR, в течение 1 недели в культуре. На **Фиг. 2D** представлена серия графиков проточной цитометрии, показывающих экспрессию CD8 и CD107a (например, с CD107a в качестве маркера активации иммунных клеток и цитотоксической дегрануляции) в: CAR-iPSC Т-клетках без стимуляции (левый график; 32,0% CD8⁻ CD107a⁻, 55,0% CD8⁺ CD107a⁻, 7,14% CD8⁻ CD107a⁺, 5,39% CD8⁺ CD107a⁺); UTD-iPSC Т-клетках, стимулированных клетками CD19-K562 (средний график; 28,0% CD8⁻ CD107a⁻, 50,2% CD8⁺ CD107a⁻, 11,7% CD8⁻ CD107a⁺, 10,1% CD8⁺ CD107a⁺); и CAR-iPSC Т-клетках, стимулированных клетками CD19-K562 (правый график; 29,1% CD8⁻ CD107a⁻, 10,7% CD8⁺ CD107a⁻, 29,8% CD8⁻ CD107a⁺, 30,4% CD8⁺ CD107a⁺). Следует обратить внимание на повышенную экспрессию CD107a в стимулированных CAR-iPSC Т-клетках по сравнению с нестимулированными CAR-iPSC Т-клетками и стимулированными UTD-iPSC Т-клетками.

[0085] На **Фиг. 3А-3В** представлена серия карт откликов, показывающих уровни экспрессии (**Фиг. 3А**) сигнатурных генов Т-клеток, участвующих в функции и активности TCR, и (**Фиг. 3В**) генов, которые отличают αβ Т-клетки от γδ Т-клеток. Обозначения: abT - αβ Т-клетки периферической крови; gdT - γδ Т-клетки периферической крови; NK - NK-клетки периферической крови; conT_OP9 - Т-клетки, полученные из iPSC, с использованием системы совместного культивирования OP9-DL4; conT_SF - iPSC Т-клетки без стромы; CB_T - Т-клетки, дифференцированные из CD34⁺ HSPC пуповинной крови с использованием способа без стромы, описанного здесь; EZ_T - iPSC Т-клетки без стромы с нокдауном EZH1. Следует обратить внимание, что как на **Фиг. 3А**, так и на **Фиг. 3В** клетки EZ_T демонстрируют профиль экспрессии генов, наиболее сходный с профилем экспрессии генов альфа-бета Т-клеток из периферической крови донора (abT; см. последние 6 столбцов каждой карты откликов), в то время как другие Т-клетки, полученные из iPSC, больше похожи на врожденно-подобные клетки (например, гамма-

дельта Т- или NK-клетки). На основании данных **Фиг. 3А-3В** рассчитан коэффициент корреляции Пирсона между EZ-T и abT, значение которого составило 0,8886. Значение может варьироваться от -1 до 1, где 1 означает идеальную положительную корреляцию. Этот результат указывает на то, что клетки EZ-T очень похожи на альфа-бета-Т-клетки PBMC.

[0086] На **Фиг. 4** представлена серия схем, показывающих, что клетки EZ-T демонстрируют разнообразный репертуар TCR. Клетки EZ-T относятся к Т-клеткам, дифференцированным из CD34⁺ HE, включая ингибирование EZH1 и дифференциацию Т-клеток без стромы, как описано здесь. Секвенирование бета-цепи TCR было выполнено на клетках EZ-T, и были идентифицированы десятки тысяч уникальных реаранжировок TCR в результате случайной рекомбинации генов TCR во время дифференциации Т-клеток. Круговая диаграмма (слева) показывает использование семействами генов переменной бета-цепи Т-клеточного рецептора (TCRBV) в клетках EZ-T. Каждый оттенок представляет одно семейство TCRBV. Значение продуктивной клональности Симпсона составило 0,0233, что указывает на очень разнообразный репертуар TCR.

[0087] На **Фиг. 5А-5D** представлена серия схем и графиков, показывающих, что клетки EZ-T имеют более длинные сегменты CDR3, чем контрольные PSC Т-клетки. CDR3 является наиболее вариабельной областью TCR, и ее длина может определяться активностью фермента TdT, который случайным образом добавляет нуклеотиды во время перестройки TCR. На **Фиг. 5А** представлена схема, показывающая активность TdT (см., например, **SEQ ID NO: 49-50**). Сообщалось, что CDR3 короче в незрелых Т-клетках и Т-клетках, полученных из iPSC, по сравнению со зрелыми Т-клетками PBMC. На **Фиг. 5В-5Е** представлен ряд гистограмм, показывающих процент продуктивных реаранжировок TCR (например, каждая продуктивная реаранжировка TCR может быть транслирована в уникальную цепь TCR) определенной длины (на **Фиг. 5В** показана длина CDR от 6 до 27 нуклеотидов (нт)), на **Фиг. 5С** показана длина CDR от 30 до 54 нт, на **Фиг. 5D** показана длина CDR от 57 до 78 нт. На **Фиг. 5В-5Е** показано, что клетки EZ-T (темно-серые, левые столбцы в каждой группе) демонстрируют увеличенную длину CDR3 по сравнению с контрольными Т-клетками, полученными из iPSC (светло-серые, правые столбцы в каждой группе; контрольные iPSC Т-клетки были дифференцированы с использованием способа дифференциации без стромы и без нокдауна EZH1), и они были более похожи на Т-клетки PBMC (средне-серые, средние столбцы в каждой группе).

[0088] На **Фиг. 6** представлена схема, показывающая первичный скрининг низкомолекулярных ингибиторов эпигенетических факторов, которые способствуют спецификации Т-клеток, с использованием способов дифференциации Т-клеток без

стромы, как описано здесь. «Клетки 5F» относятся к клеткам, экспрессирующим 5 факторов транскрипции (HOXA9, ERG, RORA, SOX4 и MYB). Эпигенетическая библиотека Cayman содержит более 140 небольших молекул, которые, как известно, модулируют активность различных эпигенетических белков «пишущих и стирающих» и «читающих». Она может включать соединения, которые модулируют активность метилтрансфераз, деметилаз, гистонов ацетилтрансфераз, гистонов деацетилаз и ацетилированных белков, связывающих гистоны; см., например, [caymanchem.com/product/11076/epigenetics-screening-library-\(96-well\)](http://caymanchem.com/product/11076/epigenetics-screening-library-(96-well)).

[0089] На **Фиг. 7** представлена диаграмма рассеяния, показывающая идентификацию первичных попаданий со скрина, описанного на **Фиг. 6**. Показатели Z рассчитывали для всех малых молекул на основе количества Т-предшественников после обработки. Любое низкомолекулярное соединение с показателем Z больше 3 считалась первичным попаданием (хитом). См., например, **Таблицу 2**.

[0090] На **Фиг. 8** представлена гистограмма, показывающая кратность изменения количества рго Т-клеток, полученных из 5F HSPC, после обработки первичными хитами, указанными на **Фиг. 7** (см., например, **Таблицу 2**). Подтверждено, что три низкомолекулярных соединения способствуют спецификации Т-клеток: UNC0224, MC1568 и CAY10591.

[0091] На **Фиг. 9** представлена схема, показывающая второй скрининг с использованием гомогенных эндотелиальных (HE) клеток CD34+, полученных из iPSC дикого типа (не 5F HSPC, например, как используется на **Фиг. 6-9** и в **Таблице 2**), для тестирования низкомолекулярных ингибиторов эпигенетических факторов, способствующих дифференциации Т-клеток.

[0092] На **Фиг. 10A-10B** представлена серия графиков, показывающих результаты скрина с **Фиг. 9**. На **Фиг. 10A** представлена диаграмма рассеяния Z-показателей, которые были рассчитаны для всех низкомолекулярных соединений на основании количества Т-предшественников после обработки. Любое низкомолекулярное соединение с показателем Z больше 3 считалась первичным попаданием. На **Фиг. 10B** представлена гистограмма, показывающая проверку основных попаданий. Первичные попадания тестировались в трехкратной повторности. Обработка UNC0224 приводила к значительному увеличению рго Т-клеток, полученных из клеток CD34+ HE.

[0093] На **Фиг. 11** представлена схема, показывающая, что два независимых скрининга идентифицировали UNC0224 для улучшения спецификации Т-клеток. См., например, **Фиг. 6-10, Таблицу 2**.

[0094] На **Фиг. 12А-12В** представлена серия схем и графиков, показывающих, что UNC0224 способствует спецификации Т-клеток дозозависимым образом. На **Фиг. 12А** представлена схема, обобщающая эксперименты (см., например, **Фиг. 6-11, Таблицу 2**). На **Фиг. 12В** представлена гистограмма, показывающая кратность изменения рго Т-клеток, полученных из клеток CD34+ HE после обработки UNC0224 в различных дозах.

[0095] На **Фиг. 13А-13F** представлена серия схем и графиков, показывающих, что ингибиторы G9 способствуют дифференциации Т-клеток с использованием способов дифференциации без стромы, как описано здесь. На **Фиг. 13А** представлена схема, обобщающая эксперименты (см., например, **Фиг. 6-12, Таблицу 2**). На **Фиг. 13В-13Е** представлены гистограммы, показывающие кратность изменения рго Т-клеток, полученных из клеток CD34+ HE, после обработки другими ингибиторами G9a в различных дозах. На **Фиг. 13В** показана зависимость дифференциации Т-клеток от дозы UNC0638. На **Фиг. 13С** показана зависимость дифференциации Т-клеток от дозы A366. На **Фиг. 13D** показана зависимость дифференциации Т-клеток от дозы BRD4770. На **Фиг. 13Е** показана зависимость дифференциации Т-клеток от дозы BIX01294. На **Фиг. 13F** показана зависимость дифференциации Т-клеток от дозы UNC0642. По меньшей мере четыре небольшие молекулы, в дополнение к UNC0224, способны стимулировать дифференциацию Т-клеток: UNC0638; BRD4770; BIX01294 и UNC0642; см., например, **Таблицу 3**.

[0096] На **Фиг. 14А-14С** представлена серия схем и графиков, показывающих, что UNC0224 усиливает коммитацию Т-клеток за счет эритроидного/миелоидного потенциала. На **Фиг. 14А** представлена схема, показывающая тест оценки того, влияет ли UNC0224 специфически на дифференциацию Т-клеток. Клетки CD34+ HE, полученные из iPSC, обрабатывали UNC0224 и дифференцировали в CD34+CD45+ гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники (HSPC). Эти HSPC использовали для получения Т-клеток, эритроидных клеток и миелоидных клеток для определения их мультипотентности. На **Фиг. 14В** представлена гистограмма, показывающая кратность изменения рго Т-клеток, полученных из клеток CD34+CD45+ HSPC, после обработки UNC0224 (500 нМ). Следует обратить внимание, что обработка UNC0224 приводит к значительному увеличению CD5+CD7+ Рго Т-клеток. На **Фиг. 14С** представлена гистограмма, показывающая количество различных типов колоний, полученных из CD34+CD45+ HSPC в анализе колониеобразующих единиц (КОЕ). Обозначения: Е - эритроидные; М - макрофаги; G - гранулоциты; GM - гранулоциты/макрофаги; GEMM - гранулоциты/эритроидные/макрофаги/мегакариоциты. Следует обратить внимание, что

обработка UNC0224 приводит к значительному снижению клеток эритроидного или миелоидного происхождения.

[0097] На **Фиг. 15A-15C** представлена серия графиков, показывающих, что UNC0224 способствует спецификации Т-клеток, а не пролиферации клеток. На **Фиг. 14B** представлена гистограмма, показывающая кратность изменения про Т-клеток, полученных из клеток CD34⁺ CD45⁺ HSPC, после обработки UNC0224 (500 нМ). Следует обратить внимание, что обработка UNC0224 приводит к значительному увеличению CD5⁺ CD7⁺ Про Т-клеток. На **Фиг. 14B** представлена гистограмма, показывающая кратность изменения общего числа клеток после 14 дней дифференциации CD34⁺CD45⁺ HSPC Т-клеток, обработанных DMSO или UNC0224. Следует обратить внимание, что обработка UNC0224 приводит к значительному снижению общего количества клеток. На **Фиг. 14C** представлена гистограмма, показывающая процент про Т-клеток, полученных из CD34⁺CD45⁺ HSPC, обработанных DMSO или UNC0224. Следует обратить внимание, что обработка UNC0224 приводит к значительному увеличению процента CD5⁺CD7⁺ Про Т-клеток. N=3, **** P≤0,0001.

[0098] На **Фиг. 16** представлена схема, показывающая иллюстративную гипотезу, касающуюся метилирования H3K9 и дифференциации Т-клеток. Не желая быть связанными теорией, ожидается, что метилирование H3K9 опосредует репрессию лимфоидных генов. Таким образом, обработка ингибиторами метилирования H3K9 (см., например, **Фиг. 6-15, Таблицы 2-3**) способствует дифференциации Т-клеток, например, при использовании способов дифференциации Т-клеток без стромы, как описано здесь.

[0099] На **Фиг. 17** представлена схема, показывающая дифференциацию CD3⁺ Т-клеток с использованием способа без стромы. Вкратце, планшеты, обработанные нетканевой культурой, покрывали рекомбинантными белками DL1/DL4-Fc человека (10 мкг/мл в PBS, 3 часа при комнатной температуре). Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), полученные из гемопоэтических стволовых клеток и клеток-предшественников (HSPC; например, CD34⁺ гемогенный эндотелий), культивировали на планшетах, покрытых лигандом Notch (например, Delta Like Canonical Notch Ligand 4 (DLL4)), в среде, содержащей IL-7, фактор стволовых клеток (SCF), Flit3 и тромбопоэтин (TPO). Через 2 недели дифференцируются CD5⁺ CD7⁺ Т-клеточные предшественники (Про Т). Клетки Про Т продолжают дифференциацию в планшетах, покрытых DLL4, в среде, содержащей IL-7, SCF и Flit3; еще приблизительно через 3 недели CD3⁺ Т-клетки дифференцировались.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[00100] Варианты выполнения описанной здесь технологии включают способы дифференциации Т-клеток. В одном аспекте способ, описанный здесь, представляет собой способ дифференциации Т-клеток без стромы, т.е. способ, который не предусматривает совместного культивирования со стромальными клетками или поддерживающими клетками любого другого типа. Совместное культивирование со стромальными клетками, такими как стромальные клетки мыши, ограничивает трансляционный потенциал Т-клеток, полученных из iPSC; например, могут быть опасения отторжения трансплантата из-за наличия стромальных клеток. Кроме того, Т-клетки, дифференцированные с использованием стромальных клеток, проявляют врожденный фенотип (например, по данным экспрессии TCRgd, который является маркером для гамма-дельта Т-клеток). Предпочтительно, чтобы Т-клетки проявляли адаптивный фенотип, например, характеризующийся экспрессией TCR α и β .

[00101] Кроме того, как описано здесь, способы дифференциации Т-клеток без стромы приводят к увеличению числа CD3⁺ Т-клеток (например, CD4⁺CD8⁺ клеток) по сравнению со способами дифференциации, предусматривающими совместное стромальное культивирование. Соответственно, Т-клетки, дифференцированные без использования стромальных клеточных способов, и в одном варианте выполнения в сочетании с ингибированием эпигенетического регулятора (например, HMT; например, EZH1, G9a/GLP), демонстрируют по меньшей мере следующие неожиданные преимущества по сравнению со стромальными способами сокультивирования: (1) повышенный потенциал для трансплантации у людей; (2) уменьшенное количество врожденно-подобных Т-клеток; (3) повышенное количество и/или процентное содержание образующихся Т-клеток (например, CD5⁺CD7⁺ Pro Т-клетки; CD3⁺ Т-клетки; CD4⁺CD8⁺ Т-клетки; CD4⁺ Т-клетки; CD8⁺ Т-клетки; альфа-бета-Т-клетки); (4) профили экспрессии генов наиболее сходны с альфа-бета-Т-клетками; (5) более разнообразный репертуар TCR; и/или (6) увеличение длины CDR TCR (см., например, пример 1, Фиг. 1C-1D, Фиг. 3A-3B, Фиг. 4, Фиг. 5A-5D, Фиг. 6-16).

Способы дифференциации

[00102] В одном аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺ Т-клеток в присутствии

лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[00103] В некоторых вариантах выполнения способ дополнительно предусматривает ингибирование гистонметилтрансферазы в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия. Такое ингибирование может повысить эффективность дифференциации в Т-клетки. Соответственно, в одном аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; (b) ингибирование гистонметилтрансферазы в образовавшейся популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (с) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[00104] В одном варианте выполнения популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия культивируют в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 100 нг/мл SCF, 100 нг/мл FLT3 и 50 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг/ мл лиганда Notch в течение не менее 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[00105] В одном варианте выполнения популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия культивируют в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 100 нг/мл FLT3 и 50 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение по меньшей мере 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[00106] В одном варианте выполнения популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия культивируют в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 30 нг/мл SCF, 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг/ мл лиганда Notch в течение не менее 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[00107] В одном варианте выполнения популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия культивируют в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг/мл лиганда Notch в течение по меньшей мере 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

[00108] В одном аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение по меньшей мере

4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток; при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл TPO и 30 нг/мл SCF по меньшей мере в течение первых двух недель.

[00109] В другом аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение по меньшей мере 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток; при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл TPO, 30 нг/мл SCF и ингибитор G9a в течение по меньшей мере первых двух недель.

[00110] В другом аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 100 нг/мл SCF, 100 нг/мл FLT3 и 50 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение не менее 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток; при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит TPO (50 нг/мл) в течение по меньшей мере первых двух недель.

[00111] В другом аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 100 нг/мл SCF, 100 нг/мл FLT3 и 50 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение не менее 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток; при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит TPO (50 нг/мл) и ингибитор G9a/GLP, в течение по меньшей мере первых двух недель.

[00112] В другом аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 100

нг/мл FLT3 и 50 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение по меньшей мере 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток; при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 50 нг/мл TPO и 100 нг/мл SCF, по меньшей мере в течение первых двух недель.

[00113] В другом аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (b) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 100 нг/мл FLT3 и 50 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение по меньшей мере 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток; при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 50 нг/мл TPO, 100 нг/мл SCF и ингибитор G9a, в течение по меньшей мере первых двух недель.

Плюрипотентные стволовые клетки

[00114] В некоторых вариантах выполнения способ дифференциации Т-клеток без стромы предусматривает дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток. Плюрипотентные стволовые клетки (PSC) могут дать начало всем соматическим тканям. В одном варианте выполнения любого способа, клеток или композиции, описанных здесь, популяция плюрипотентных стволовых клеток представляет собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) или эмбриональные стволовые клетки (ESC). Клетки iPSC и ESC могут быть получены любым способом, известным в данной области. В некоторых вариантах выполнения популяция плюрипотентных стволовых клеток включает эмбриональные стволовые клетки (ESC). Эмбриональные стволовые клетки (ESC) представляют собой стволовые клетки, полученные из недифференцированных клеток внутренней массы эмбриона человека.

[00115] Направленная дифференциация PSC направлена на повторение эмбрионального развития для создания тканей, соответствующих пациенту, путем определения трех зародышевых листков. Общей идеей направленной дифференциации во всех зародышевых листках является склонность PSC давать эмбриональные и фетальные типы клеток, что создает проблему для интеграции и функционирования у взрослого реципиента. Это различие особенно бросается в глаза в системе кроветворения, которая возникает в виде разделенных во времени и пространстве волн в течение онтогенеза. Самые ранние «примитивные» предшественники появляются в желточном мешке через 8,5 дней после оплодотворения, и они дают начало ограниченному репертуару

макрофагов, мегакариоцитов и ядерных эритроцитов. Эти ранние эмбрионоподобные предшественники обычно имеют миелоидную основу и не могут функционально заселять костный мозг взрослых реципиентов. Напротив, «дефинитивные» клетки с потенциалом гемопоэтических стволовых клеток (HSC) появляются позже в артериальном эндотелии в пределах аорто-гонадно-мезонефральной области (AGM) и других анатомических областях. Направленная дифференциация PSC дает начало гемопоэтическим предшественникам, которые напоминают клетки, обнаруженные в желточном мешке раннего эмбриона. У них отсутствует функциональный потенциал восстановления, они смещены к миелоидным линиям и экспрессируют эмбриональные глобины. Таким образом, понимание ключевых механизмов, определяющих судьбу, которые способствуют развитию либо примитивных, либо дефинитивных клонов, имеет решающее значение для спецификации HSC и др. типов клеток, подобных взрослым клеткам (например, эритроцитам) из PSC.

[00116] В некоторых вариантах выполнения популяция плюрипотентных стволовых клеток (PSC) включает индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки). В некоторых вариантах выполнения индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем введения в зрелые клетки только факторов перепрограммирования *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и необязательно *c-MYC* или *nanog* и *LIN28*. В некоторых вариантах выполнения индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем введения факторов перепрограммирования два или более раз в зрелые клетки.

[00117] В некоторых вариантах выполнения плюрипотентные стволовые клетки (PSC), описанные здесь, представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Преимущество использования iPSC заключается в том, что клетки могут быть получены от того же субъекта, которому в конечном итоге будут повторно введены иммунные клетки. То есть соматическая клетка может быть получена от субъекта, перепрограммирована в индуцированную плюрипотентную стволовую клетку, а затем трансфицирована и дифференцирована в модифицированную иммунную клетку для введения субъекту (например, в аутологичные клетки). Поскольку клетки-предшественники в основном происходят из аутологичного источника, риск отторжения трансплантата или аллергических реакций снижается по сравнению с использованием клеток другого субъекта или группы субъектов. В некоторых вариантах выполнения клетки для получения iPSC получены из неаутологичных источников. Кроме того, использование iPSC сводит на нет потребность в клетках, полученных из эмбрионального

источника. Таким образом, в одном варианте выполнения PSC, используемые в раскрытых способах, не являются эмбриональными стволовыми клетками.

[00118] Хотя дифференциация обычно необратима в физиологических условиях, недавно было разработано несколько способов перепрограммирования соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Типичные способы известны специалистам в данной области и кратко описаны ниже.

[00119] Используемый здесь термин «перепрограммирование» относится к процессу, который изменяет или обращает вспять состояние дифференциации дифференцированной клетки (например, соматической клетки). Другими словами, перепрограммирование относится к процессу обратного направления дифференциации клетки к более недифференцированному или более примитивному типу клеток. Следует отметить, что помещение большого количества первичных клеток в культуру может привести к некоторой потере полностью дифференцированных характеристик. Таким образом, простое культивирование таких клеток, охватываемых термином дифференцированные клетки, не превращает эти клетки в недифференцированные клетки (например, недифференцированные клетки) или плюрипотентные клетки. Переход дифференцированной клетки к плюрипотентности требует перепрограммирования стимула помимо стимулов, которые приводят к частичной утрате дифференцированного признака в культуре. Перепрограммированные клетки также обладают способностью к длительному пассированию без потери потенциала роста по сравнению с первичными родительскими клетками, которые обычно обладают способностью к ограниченному числу делений в культуре.

[00120] Перепрограммируемая клетка может быть либо частично, либо окончательно дифференцирована перед перепрограммированием. В некоторых вариантах выполнения перепрограммирование предусматривает полный возврат состояния дифференциации для дифференцированной клетки (например, соматической клетки) к плюрипотентному состоянию или мультипотентному состоянию. В некоторых вариантах выполнения перепрограммирование предусматривает полный или частичный возврат состояния дифференциации для дифференцированной клетки (например, соматической клетки) в недифференцированную клетку (например, эмбрионоподобную клетку). Перепрограммирование может привести к экспрессии клетками определенных генов, экспрессия которых в дальнейшем способствует перепрограммированию. В некоторых вариантах выполнения, описанных здесь, перепрограммирование дифференцированной клетки (например, соматической клетки) приводит к тому, что дифференцированная клетка принимает недифференцированное состояние (например, становится

недифференцированной клеткой). Полученные клетки называют «перепрограммированными клетками» или «индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (iPSC или iPS-клетками)».

[00121] Перепрограммирование может включать изменение, например, обращение по меньшей мере некоторых наследственных паттернов модификации нуклеиновых кислот (например, метилирование), конденсацию хроматина, эпигенетические изменения, геномный импринтинг и т.п., которые происходят во время клеточной дифференциации. Перепрограммирование отличается от простого поддержания существующего недифференцированного состояния клетки, которая уже является плюрипотентной, или поддержания существующего менее чем полностью дифференцированного состояния клетки, которая уже является мультипотентной клеткой (например, обычная миелоидная стволовая клетка). Перепрограммирование также отличается от стимулирования самообновления или пролиферации клеток, которые уже являются плюрипотентными или мультипотентными, хотя описанные здесь композиции и способы также могут быть использованы для таких целей в некоторых вариантах выполнения.

[00122] Конкретный подход или способ, используемый для получения плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток (широко именуемый «перепрограммированием»), не обязательно имеет решающее значение для описанных здесь способов. Таким образом, любой способ, который перепрограммирует соматическую клетку на плюрипотентный фенотип, будет подходящим для использования в способах, описанных здесь.

[00123] Методологии перепрограммирования для получения плюрипотентных клеток с использованием определенных комбинаций факторов транскрипции были описаны для индукции плюрипотентных стволовых клеток из соматических клеток. Yamanaka и Takahashi преобразовали соматические клетки мыши в клетки, подобные ES клеткам, с расширенным потенциалом развития путем прямой трансдукции Oct4, Sox2, Klf4 и, необязательно, с-Мус (см. патенты США № 8058065 и 9045738, выданные Yamanaka и Takahashi). iPSC напоминают ES клетки, поскольку они восстанавливают связанные с плюрипотентностью схемы транскрипции и большую часть эпигенетического окружения. Кроме того, iPSC мыши удовлетворяют всем стандартным тестам на плюрипотентность: в частности, дифференциации *in vitro* в типы клеток трех зародышевых листков, образования тератомы, вклада в химеры, передачи зародышевой линии и тетраплоидной комплементации.

[00124] Последующие исследования показали, что iPS-клетки человека могут быть получены с использованием сходных методов трансдукции, а трио факторов транскрипции, OCT4, SOX2 и NANOG, было установлено в качестве основного набора факторов транскрипции, которые регулируют плюрипотентность. Продукция iPS-клеток может быть достигнута путем введения последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих гены, ассоциированные со стволовыми клетками, во взрослую соматическую клетку с использованием вирусных векторов.

[00125] OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC являются исходными четырьмя транскрипционными факторами, идентифицированными для перепрограммирования мышинных фибробластов в iPSC. Этим же четырем факторам также было достаточно для получения iPSC человека. OCT3/4 и SOX2 функционируют как основные транскрипционные факторы сети плюрипотентности, регулируя экспрессию генов, ассоциированных с плюрипотентностью. Krüppel-подобный фактор 4 (KLF4) является нижележащей мишенью передачи сигналов LIF-STAT3 в мышинных ES клетках и регулирует самообновление. iPSC человека также можно получить с использованием четырех альтернативных факторов; для этого необходимы OCT4 и SOX2, но KLF4 и c-MYC могут быть заменены NANOG, гомеобоксным белком, важным для поддержания плюрипотентности как в ES-клетках, так и в ранних эмбрионах, и РНК-связывающим белком LIN28. Сообщалось, что комбинация факторов перепрограммирования OCT4, SOX2, NANOG и LIN28 также достаточна для продуцирования iPSC человека.

[00126] В одном варианте выполнения любого способа, клеток или композиции, описанных здесь, iPSC получают, например, путем введения экзогенных копий только трех факторов перепрограммирования OCT4, SOX2 и KLF4 в зрелые или соматические клетки. В одном варианте выполнения любого способа, клетки или композиции, описанных здесь, c-MYC или nanog и/или LIN28 дополнительно вводят в iPSC, имеющие копии экзогенного гена, кодирующего OCT4, SOX2 и KLF4, для дифференциации в зрелые или соматические клетки. В одном варианте выполнения любого способа, клеток или композиции, описанных здесь, iPSC получают путем введения экзогенных копий факторов перепрограммирования OCT4, SOX2 и KLF4 и, необязательно, c-MYC или nanog и/или LIN28 для дифференциации в зрелые или соматические клетки.

[00127] В одном варианте выполнения любого способа, клеток или композиции, описанных здесь, iPSC продуцируют путем контакта зрелых клеток по меньшей мере с одним вектором, где по меньшей мере один вектор несет экзогенную копию гена, кодирующую факторы перепрограммирования OCT4, SOX2 и KLF4, и

необязательно, с-MYC или nanog, и/или LIN28 для дифференциации в зрелые или соматические клетки, и где факторы перепрограммирования экспрессируются *in vivo* в контактировавших зрелых или соматических клетках. Контакт происходит в условиях *in vitro* или *ex vivo*. Все факторы перепрограммирования, необходимые для дифференциации, могут экспрессироваться одним вектором (например, вектором, который несет экзогенный ген, кодирующий копию OCT4, SOX2, KLF4 и с-MYC). Альтернативно, факторы перепрограммирования могут быть экспрессированы более чем в одном векторе, каждый из которых используется для контакта с iPSC. Например, iPSC могут быть приведены в контакт с первым вектором, несущим экзогенную копию гена, кодирующего OCT4, SOX2, и со вторым вектором, несущим экзогенную копию гена KLF4 и с-MYC.

[00128] В одном варианте выполнения любого раскрытого способа iPSC-клетка содержит по меньшей мере экзогенную копию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей фактор перепрограммирования, выбранный из группы, состоящей из генов Oct4 (Pou5f1), Sox2, cMyc, Klf4, Nanog, Lin 28 и Glis1. В некоторых вариантах используются комбинации факторов перепрограммирования. Например, комбинация четырех факторов перепрограммирования, состоящая из Oct4, Sox2, cMyc и Klf4, или комбинация четырех факторов перепрограммирования, состоящая из Oct4, Sox2, Nanog и Lin 28.

[00129] В одном варианте выполнения любого способа, клеток или композиции, описанных здесь, iPSC получают путем введения в зрелые или соматические клетки раскрытых факторов перепрограммирования или любой комбинации факторов перепрограммирования два или более раз. В одном варианте выполнения комбинация факторов перепрограммирования отличается, когда комбинацию вводят в iPSC более одного раза, например, в iPSC сначала вводят комбинацию Oct4 (Pou5f1), Sox2, cMyc, Klf4, Nanog, а затем в iPSC вводят комбинацию Oct4 (Pou5f1), Sox2, cMyc. В одном варианте выполнения любого способа, клеток или композиции, описанных здесь, iPSC продуцируют путем контакта зрелых клеток с раскрытыми векторными факторами, которые вводят два или более раз в зрелые/соматические клетки.

[00130] В некоторых вариантах выполнения популяция плюрипотентных стволовых клеток (например, iPSC) дифференцируют при отсутствии лиганда Notch. В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации, используемая для стимуляции дифференциации популяции плюрипотентных стволовых клеток (например, iPSC) в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия, не содержит лиганда Notch. В некоторых вариантах выполнения сосуд для клеточной культуры, используемый во время

дифференциации популяции плюрипотентных стволовых клеток (например, iPSC) в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия, не содержит лиганда Notch.

[00131] iPС-клетки могут быть образованы или получены из терминально дифференцированных соматических клеток, а также из взрослых стволовых клеток или соматических стволовых клеток. То есть неплюрипотентная клетка-предшественник может быть сделана плюрипотентной или мультипотентной путем перепрограммирования. В таких случаях нет необходимости включать столько факторов перепрограммирования, сколько необходимо для перепрограммирования терминально дифференцированной клетки. Кроме того, перепрограммирование может быть вызвано введением невирусных факторов перепрограммирования, например, введением самих белков, или введением нуклеиновых кислот, кодирующих факторы перепрограммирования, или введением информационных РНК, которые при трансляции продуцируют факторы перепрограммирования (см., например, Warren et al., Cell Stem Cell, 2010 Nov 5; 7(5):618-30; содержание этой публикации полностью включено в настоящее описание посредством ссылки). Перепрограммирование может быть достигнуто путем введения комбинации нуклеиновых кислот, кодирующих гены, ассоциированные со стволовыми клетками, включая, например, Oct-4 (также известный как Oct-3/4 или Pou5f1), Sox1, Sox2, Sox3, Sox 15, Sox 18, NANOG, Klf1, Klf2, Klf4, Klf5, NR5A2, c-Myc, l-Myc, n-Myc, Rem2, Tert и LIN28. В одном варианте выполнения перепрограммирование с использованием описанных здесь способов и композиций может дополнительно предусматривать введение в соматические клетки одного или нескольких Oct-3/4, члена семейства Sox, члена семейства Klf и члена семейства Myc. В одном варианте выполнения способы и композиции, описанные здесь, дополнительно предусматривают введение для перепрограммирования одного или нескольких из каждого Oct 4, Sox2, Nanog, c-MYC и Klf4. Как отмечалось выше, точный способ, используемый для перепрограммирования, не обязательно имеет решающее значение для способов и композиций, описанных здесь. Однако если клетки, дифференцированные из перепрограммированных клеток, должны использоваться, например, в терапии человека, то в этом варианте выполнения перепрограммирование не осуществляют способом, который изменяет геном. Таким образом, в таких вариантах перепрограммирование достигается, например, без использования вирусных или плазмидных векторов.

[00132] Эффективность перепрограммирования клеток (т.е. количество перепрограммированных клеток), полученных из популяции исходных клеток, может быть повышена путем добавления различных низкомолекулярных соединений, как показано в публикациях Shi, Y., et al (2008) Cell-Stem Cell 2:525-528, Huangfu, D., et al

(2008) *Nature Biotechnology* 26(7):795-797, и Marson, A., et al (2008) *Cell-Stem Cell* 3:132-135, содержание каждой из них полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, агент или комбинация агентов, которые повышают эффективность или скорость индуцированной продукции плюрипотентных стволовых клеток, могут быть использованы для получения iPSC, специфичных для пациента или заболевания. Некоторые неограничивающие примеры агентов, повышающих эффективность перепрограммирования, включают растворимый Wnt, среду, кондиционированную Wnt, BIX-01294 (гистонметилтрансферазу G9a), PD0325901 (ингибитор MEK), ингибиторы ДНК метилтрансферазы, ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), вальпроевую кислоту, 5'-азацитидин, дексаметазон, субероиланилид гидроксамовой кислоты (SAHA), витамин C, трихостатин (TSA) и другие.

[00133] Другие неограничивающие примеры агентов, усиливающих перепрограммирование, включают: субероиланилид гидроксамовой кислоты (SAHA (например, MK0683, вориностат) и другие гидроксамовые кислоты), BML-210, депудецин (например, (-)-депудецин), токсин HC, нульскрипт (4-(1,3-диоксо-1H,3H-бензо[де]изохинолин-2-ил)-N-гидроксипутанамид), фенилбутират (например, фенилбутират натрия), вальпроевую кислоту ((VPA) и другие короткоцепочечные жирные кислоты), скриптаид, сурамин натрия, трихостатин А (TSA), соединение 8 APHA, апицидин, бутират натрия, пивалоилоксиметилбутират (пиванекс, AN-9), трапоксин В, хламидоцин, депсипептид (также известный как FR901228 или FK228), бензамиды (например, CI-994 (например, N-ацетилдиналин) и MS-27-275), MGCD0103, NVP-LAQ-824, СВНА (бисгидроксамовая кислота м-карбоксикоричной кислоты), JNJ16241199, тубацин, А-161906, проксамид, оксамфлатин, 3-Cl-UCHA (например, 6-(3-хлорфенилуреидо)капроновая гидроксамовая кислота), АОЕ (2-амино-8-оксо-9,10-эпоксидекановая кислота), CHAP31 и CHAP 50. Другие агенты, усиливающие перепрограммирование, включают, например, доминирующие неактивные формы HDAC (например, каталитически неактивные формы), кРНК-ингибиторы HDAC и антитела, которые специфически связываются с HDAC. Такие ингибиторы доступны, например, от BIOMOL International, Fukasawa, Merck Biosciences, Novartis, Gloucester Pharmaceuticals, Aton Pharma, Titan Pharmaceuticals, Schering AG, Pharmion, MethylGene и Sigma Aldrich.

[00134] Чтобы подтвердить индукцию плюрипотентных стволовых клеток при использовании описанных здесь способов, выделенные клоны можно протестировать на экспрессию маркера стволовых клеток. Такая экспрессия в клетке, полученной из соматической клетки, идентифицирует клетки как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Маркеры стволовых клеток могут быть выбраны из неограничивающей

группы, включающей SSEA3, SSEA4, CD9, Nanog, Fbx15, Ecat1, Esg1, Eras, Gdf3, Fgf4, Cripto, Dax1, Zpf296, Slc2a3, Rex1, Utf1 и Nat1. В одном варианте выполнения клетка, которая экспрессирует Oct4 или Nanog, идентифицируется как плюрипотентная. Способы обнаружения экспрессии таких маркеров могут включать, например, ОТ-ПЦР и иммунологические способы, которые обнаруживают присутствие кодируемых полипептидов, такие как вестерн-блоттинг или проточный цитометрический анализ. В некоторых вариантах выполнения обнаружение включает не только ОТ-ПЦР, но также включает обнаружение белковых маркеров. Внутриклеточные маркеры можно лучше всего идентифицировать с помощью ОТ-ПЦР, в то время как маркеры клеточной поверхности легко идентифицировать, например, с помощью иммуноцитохимии.

[00135] Характер выделенных плюрипотентных стволовых клеток может быть подтвержден тестами, оценивающими способность iPSC дифференцироваться в клетки каждого из трех зародышевых листков. Для оценки плюрипотентного характера выделенных клонов можно использовать в качестве одного из примеров образование тератомы у голых мышей. Клетки вводят голым мышам и проводят гистологию и/или иммуногистохимию опухоли, происходящей из клеток. Например, рост опухоли, содержащей клетки всех трех зародышевых листков, дополнительно указывает на то, что эти клетки являются плюрипотентными стволовыми клетками.

[00136] Многие патенты США и публикации заявок на выдачу патента раскрывают и описывают способы получения iPSC и связанные с ними объекты. Например, см. патенты США № № 8058065, 9347044, 9347042, 9347045, 9340775, 9341625, 9340772, 9250230, 9132152, 9045738, 9005975, 9005976, 8927277, 8993329, 8900871, 8852941, 8802438, 8691574, 8735150, 8765470, 8058065, 8048675, и публикации заявок на выдачу патента США №№ 20090227032, 20100210014, 20110250692, 20110201110, 20110200568, 20110223669, 20110306516, 20100021437, 20110256626, 20110044961, 20120276070, 20120214243, 20120263689, 20120128655, 20120100568, 20130295064, 20130029866, 20130059386, 20130183759, 20130189786, 20130295579, 20130130387, 20130157365, 20140234973, 20140227736, 20140093486, 20140301988, 20140170746, 20140178989, 20140349401, 20140065227 и 20150140662, содержание которых во всей их полноте включено сюда посредством ссылки.

[00137] В некоторых вариантах выполнения iPSC могут быть получены из соматических клеток. Соматические клетки, как этот термин используется здесь, относятся к любым клеткам, образующим тело организма, за исключением клеток зародышевой линии. Каждый тип клеток в организме млекопитающих, за исключением клеток сперматозоидов и яйцеклеток, из которых они состоят (гаметоциты), и

недифференцированных стволовых клеток, представляет собой дифференцированную соматическую клетку. Например, внутренние органы, кожа, кости, кровь и соединительная ткань состоят из дифференцированных соматических клеток. В одном варианте выполнения любого способа, клеток или композиции, описанных здесь, зрелые клетки, из которых получают iPS-клетки, включают любые соматические клетки, такие как В-лимфоциты (В-клетки), Т-лимфоциты (Т-клетки), а также фибробласты и кератиноциты.

[00138] Дополнительные типы соматических клеток для применения с композициями и способами, описанными в настоящем документе, включают: фибробласт (например, первичный фибробласт), мышечную клетку (например, миоцит), клетку кумулюса, нервную клетку, клетку молочной железы, гепатоцит и островковую клетку поджелудочной железы. В некоторых вариантах выполнения соматическая клетка представляет собой первичную клеточную линию, или она является потомством первичной или вторичной клеточной линии. В некоторых вариантах выполнения соматическую клетку получают из образца от человека, например, из волосяного фолликула, образца крови, биопсии (например, биопсии кожи или биопсии жировой ткани), образца мазка (например, образца мазка из ротовой полости) и, таким образом, она является соматической клеткой человека.

[00139] Некоторые неограничивающие примеры дифференцированных соматических клеток включают, но без ограничения, эпителиальные, эндотелиальные, нейрональные, жировые, сердечные, скелетно-мышечные, кожные, иммунные клетки, клетки печени, селезенки, легких, клетки периферической циркулирующей крови, желудочно-кишечные, почечные клетки, клетки костного мозга и клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах выполнения соматическая клетка может быть первичной клеткой, выделенной из любой соматической ткани, включая, помимо прочего, головной мозг, печень, кишечник, желудок, кишечник, жир, мышцы, матку, кожу, селезенку, эндокринный орган, кость и т.д. Кроме того, соматическая клетка может происходить от любого вида млекопитающих, включая, как неограничивающие примеры, клетки мышц, крупного рогатого скота, обезьяны, свиньи, лошади, овцы или человека. В некоторых вариантах выполнения соматическая клетка представляет собой соматическую клетку человека.

[00140] Когда перепрограммированные клетки используют для получения клеток-предшественников, используемых при терапевтическом лечении заболевания, желательно, но не обязательно, использовать соматические клетки, выделенные от пациента, которого лечат. Например, можно использовать соматические клетки,

участвующие в заболеваниях, и соматические клетки, участвующие в терапевтическом лечении заболеваний и т.п. В некоторых вариантах выполнения способ отбора перепрограммированных клеток из гетерогенной популяции, включающей перепрограммированные клетки и соматические клетки, из которых они были получены или произведены, может быть осуществлен любым известным способом. Например, ген лекарственной устойчивости или подобный, такой как ген селектируемого маркера, можно использовать для выделения перепрограммированных клеток с использованием селектируемого маркера в качестве индекса.

[00141] Репрограммированные соматические клетки, как раскрыто здесь, могут экспрессировать любое количество маркеров плюрипотентных клеток, включая: щелочную фосфатазу (AP); ABCG2; стадию специфичного эмбрионального антигена-1 (SSEA-1); SSEA-3; SSEA-4; TRA-1-60; TRA-1-81; Tra-2-49/6E; ERas/ECAT5, E-кадгерин; бета-III-тубулин; альфа-актин гладких мышц (α -SMA); фактор роста фибробластов 4 (Fgf4), Cripto, Dax1; белок цинковых пальцев 296 (Zfp296); N-ацетилтрансфераза-1 (Nat1); транскрипт 1, ассоциированный с ES-клетками (ECAT1); ESG1/DPPA5/ECAT2; ECAT3; ECAT6; ECAT7; ECAT8; ECAT9; ECAT10; ECAT15-1; ECAT15-2; Fthl17; Sal14; недифференцированный фактор транскрипции эмбриональных клеток (Utf1); Rex1; p53; G3PDH; теломеразу, включая TERT; молчащие гены X-хромосомы; Dnmt3a; Dnmt3b; TRIM28; F-бокс, содержащий белок 15 (Fbx15); Nanog/ECAT4; Oct3/4; Sox2; Klf4; c-Myc; Esrrb; TDGF1. GABRB3, Zfp42, FoxD3, GDF3, CYP25A1, белок 2 плюрипотентности, связанной с развитием (DPPA2), точка разрыва Т-клеточной лимфомы 1 (Tcl1), DPPA3/Stella, DPPA4, а также другие общие маркеры плюрипотентности и подобное. Другие маркеры могут включать Dnmt3L; Sox15, Stat3, Grb2, β -катенин и Bmi1. Такие клетки также могут характеризоваться подавлением маркеров, характерных для соматической клетки, из которой получают индуцированную плюрипотентную стволовую клетку. В одном варианте выполнения iPSC получают из зрелых дифференцированных соматических клеток.

[00142] В некоторых вариантах популяция плюрипотентных стволовых клеток, используемых в способах дифференциации, описанных здесь, не содержит CD34⁺ HSPC или мультипотентных лимфоидных предшественников (MLP), выделенных из образца от пациента. В некоторых вариантах популяция плюрипотентных стволовых клеток не включает стволовые клетки, выделенные или очищенные из образцов пуповинной крови или костного мозга. В некоторых вариантах популяция плюрипотентных стволовых клеток не происходит из стволовых клеток, выделенных из образца от пациента (например, из пуповинной крови или костного мозга). В

предпочтительном варианте популяция плюрипотентных стволовых клеток включает iPSC, такие как полученные из образца соматических клеток от пациента. См., например, Tabatabaei-Zavareh et al., J Immunol May 1, 2017, 198 (1 Supplement) 202.9.

Гемогенный эндотелий

[00143] В некоторых вариантах выполнения способы, описанные здесь, предусматривают дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток (например, iPSC) в популяцию клеток с гемопоэтическим потенциалом. В некоторых вариантах выполнения популяция клеток с гемопоэтическим потенциалом включает гемогенный эндотелий и/или гемопоэтические стволовые клетки (HSC). Клетки с гематопоэтическим потенциалом (например, гемогенный эндотелий, HSC) могут быть получены с использованием любого способа, известного в данной области.

[00144] Один типичный подход к получению HSC из hPSC состоит в том, чтобы специфицировать HSC из его онтогенетических предшественников. В настоящее время широко признано, что HSC происходят из гемогенного эндотелия (HE) в аорто-гонадно-мезонефросе (AGM) и артериального эндотелия в других анатомических участках. Недавняя работа по направленной дифференциации HE от hPSC предоставила ценную информацию о некоторых сигнальных путях, которые контролируют появление примитивных или дефинитивных популяций; однако эндотелиально-гематопоэтический переход (например, HE в HSC) остается не до конца изученным в отношении развития гемопоэза человека.

[00145] Используемый здесь термин «гемогенный эндотелий» относится к уникальной подгруппе эндотелиальных клеток, разбросанных по кровеносным сосудам, которые могут дифференцироваться в гемопоэтические клетки. У развивающихся мышей HSC возникают начиная с 10,5 дня эмбрионального развития из небольшой популяции эндотелиальных клеток с гемогенным потенциалом (гемогенный эндотелий), расположенных в области аорта-гонадного-мезонефроса. В процессе, известном как переход от эндотелия к кроветворению (ЕНТ), эндотелиальные клетки дна аорты округляются и отпочковываются во внесосудистое пространство с последующим возвращением в кровообращение через подлежащую вену. В некоторых вариантах популяция клеток, обладающая свойствами гемогенного эндотелия, дифференцируется *in vitro* из популяции плюрипотентных стволовых клеток (например, iPSC). Указанные «клетки, обладающие свойствами гемогенного эндотелия» также могут называться здесь гемогенным эндотелием.

[00146] Попытки получить HSC из плюрипотентных стволовых клеток (PSC) осложняются тем фактом, что эмбриональное кроветворение состоит из двух программ, примитивной и дефинитивной, но только дефинитивный гематопозз генерирует HSC и, следовательно, лимфоидную линию. Окончательный гемопозз, определяемый Т-лимфоидным потенциалом, возникает после установления примитивной гемопозэтической программы и развивается из популяции предшественников, которая проявляет свойства гемогенного эндотелия.

[00147] В некоторых вариантах выполнения способ дифференциации Т-клеток без стромы предусматривает дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия. В некоторых вариантах выполнения полученный CD34⁺ гемогенный эндотелий может подвергаться окончательному гемопоззу и/или он проявляет лимфоидный потенциал. В некоторых вариантах выполнения гемогенный эндотелий дифференцируется или он является дифференцированным в гемопозэтические стволовые клетки (HSC).

[00148] В некоторых вариантах популяция плюрипотентных стволовых клеток (например, iPSC) дифференцируется в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия с использованием эмбрионидных телец (EB) или двумерных (2D) адгезивных культур; см., например, публикацию Pineda et al., Differentiation patterns of embryonic stem cells in two versus three dimensional culture, Cells Tissues Organs. 2013; 197(5): 399–410, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. EB представляют собой трехмерные агрегаты плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемых и культивируемых *in vitro* в присутствии сыворотки. EB могут продуцировать смесь примитивных и дефинитивных типов гемопозэтических клеток-предшественников. Примитивные предшественники приравниваются к тем, которые естественным образом возникают *in vivo* на самых ранних стадиях эмбрионального развития, тогда как на более поздних стадиях созревания эмбриональные популяции дают начало дефинитивным клеткам-предшественникам, которые ведут себя аналогично клеткам, типичным для кроветворения у взрослых.

[00149] В некоторых вариантах выполнения время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия, составляет по меньшей мере 8 дней (например, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 дней или более). В некоторых вариантах выполнения время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного

эндотелия, составляет по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней или более.

[00150] В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации содержит BMP4, SB-431542, CHIR99021, bFGF, VEGF, IL-6, IL-11, IGF-1, SCF и EPO или любую их комбинацию. В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации содержит 10 нг/мл BMP4, 6 мМ SB-431542, 3 мМ CHIR99021, 5 нг/мл bFGF, 15 нг/мл VEGF, 10 нг/мл IL-6, 5 нг/мл IL-11, 25 нг/мл IGF-1, 50 нг/мл SCF и 2 ЕД/мл EPO. См., например, Пример 2 и Таблицу 1, представленные здесь.

[00151] В некоторых вариантах выполнения компоненты среды агрегации изменяют во время дифференциации плюрипотентных стволовых клеток в гомогенный эндотелий. В качестве неограничивающего примера служит процесс, когда эмбрионидные тельца дифференцируют в присутствии BMP4 с последующим стадийно-специфическим добавлением bFGF, VEGF и гемопоэтических цитокинов (например, IL-6, IL-11, IGF-1, SCF и EPO). Можно манипулировать путем передачи сигналов активин-узла (например, с помощью SB-431542 и CHIR99021) между 2 и 3 днями. См., например, пример 2, приведенный здесь ниже; и публикацию Sturgeon et al., Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells, *Nat Biotechnol.* 2014 Jun; 32(6): 554–561, содержание которой включено сюда посредством ссылки.

[00152] В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации содержит BMP (например, 10 мкг/мл BMP) в дни 0, 1 и/или 2 дифференциации. В некоторых вариантах выполнения среда агрегации не содержит BMP в дни 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дифференциации.

[00153] В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации содержит SB-431542 (например, 6 мМ SB-431542) и/или CHIR99021 (например, 3 мМ CHIR99021) в течение 2-го дня дифференциации. SB-431542 представляет собой низкомолекулярный антагонист передачи сигналов активин-узла. CHIR99021 представляет собой ингибитор GSK-3 и агонист Wnt. Было показано, что ингибирование передачи сигналов активин-узла и активация передачи сигналов Wnt стимулирует дифференциацию PSC в дефинитивные предшественники ($KDR^+CD235a^-$) с лимфоидным потенциалом (см., например, публикацию Sturgeon 2014, приведенную выше, которая включена в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации не содержит SB-431542 и/или CHIR99021 в дни 0, 1, 3, 4, 5, 6, 7 и/или 8 дифференциации.

[00154] В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации содержит bFGF (например, 5 нг/мл bFGF) в дни 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и/или 8 дифференциации. В

некоторых вариантах выполнения среда для агрегации не содержит bFGF в течение дня 0 дифференциации.

[00155] В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации содержит VEGF (например, 15 нг/мл VEGF) в дни 3, 4, 5, 6, 7 и/или 8 дифференциации. В некоторых вариантах выполнения среда для агрегации не содержит VEGF в дни 0, 1 или 2 дифференциации.

[00156] В некоторых вариантах выполнения среда агрегации содержит гемопоэтический цитокин(ы) в дни 6, 7 и/или 8 дифференциации. В некоторых вариантах выполнения среда агрегации не содержит гемопоэтический цитокин(ы) в дни 0, 1, 2, 3, 4 или 5 дифференциации. В некоторых вариантах выполнения гемопоэтические цитокины выбраны из группы, состоящей из: IL-6 (например, 10 нг/мл IL-6), IL-11 (например, 5 нг/мл IL-11), IGF-1 (например, 25 нг/мл IGF-1), SCF (например, 50 нг/мл SCF) и EPO (например, 2 Ед/мл EPO).

[00157] В некоторых вариантах выполнения способ дифференциации дополнительно предусматривает отбор или выделение полученной популяции CD34+ гемогенного эндотелия с использованием экспрессии поверхностных маркеров в популяции CD34+ гемогенного эндотелия. Неограничивающие примеры способов отбора или выделения гемогенного эндотелия включают сортировку клеток, активируемую магнитным полем (MACS), и сортировку клеток, активируемую флуоресценцией (FACS). В некоторых вариантах выполнения поверхностным маркером гемогенного эндотелия является CD34 (например, высокая поверхностная экспрессия CD34).

[00158] В некоторых вариантах выполнения дополнительные положительные или отрицательные маркеры гемогенного эндотелия могут включать, но без ограничения, CD45, CD38, KDR, CD235 и CD43. В некоторых вариантах выполнения популяция CD34+ гемогенного эндотелия является CD45-отрицательной/низкой. В некоторых вариантах выполнения популяция CD34+ гемогенного эндотелия является CD38-отрицательной/низкой. В некоторых вариантах популяция CD34+ гемогенного эндотелия представляет собой KDR+. В некоторых вариантах популяция CD34+ гемогенного эндотелия является CD235-отрицательной/низкой. В некоторых вариантах популяция CD34+ гемогенного эндотелия является CD43-отрицательной/низкой.

[00159] В некоторых вариантах выполнения гемогенный эндотелий и/или HSC получают с использованием любого способа, известного в данной области. В качестве неограничивающего примера способ дифференциации PSC в гемогенный эндотелий может предусматривать введение факторов транскрипции, таких как ERG, HOXA5, HOXA9, HOXA10, LCOR, RUNX1 и/или SPI1; см., например, международную

патентную заявку № WO 2018/048828, заявку на выдачу патента США № 2019/0225940, публикации Doulatov et al., Cell Stem Cell. 2013 October 3, 13(4); Vo et al., Nature 2018, 553(7689): 506–510; при этом содержание каждого документа полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00160] В некоторых вариантах выполнения гомогенный эндотелий не происходит из PSC, а скорее происходит непосредственно из эндотелиальных клеток. Например, эндотелиальные клетки (например, из легких, мозга и других тканей) могут быть непосредственно перепрограммированы в гомогенный эндотелий путем трансдукции транскрипционными факторами (например, Fosl, Gfl, Runx1 и Spl) и совместного культивирования с клетками иммортализованной эндотелиальной клеточной линии; эндотелиальные клетки могут дополнительно подвергаться воздействию внешних клеточных факторов (например, сыворотки, SB-431542 и/или эндотелиального митогена). См., например, публикации Lis et al., Nature. 2017 May 25, 545(7655):439–445; Blaser and Zon, Blood. 2018 Sep 27; 132(13): 1372–1378, содержание которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Ингибирование эпигенетического регулятора

[00161] В некоторых аспектах в настоящем документе описан способ дифференциации Т-клеток, предусматривающий стадию ингибирования по меньшей мере одного эпигенетического регулятора. Используемый здесь термин «эпигенетический регулятор» относится к фактору, например, полипептиду, например, ферменту, который влияет на метилирование ДНК и/или на модификацию гистонов (например, на ацетилирование гистонов, метилирование гистонов), и который влияет на уровни транскрипции генов без изменения (например, замены или делеции) нуклеотидной последовательности генома. Неограничивающие примеры эпигенетических регуляторов включают: ДНК-метилтрансферазу (DNMT; например, DNMT1; DNMT3a; DNMT3b); белок метил-СрG-связывающего домена (MBD) (например, MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4, KAISO, ZBTB4, ZBTB38, UHRHRF2); ДНК-деметиразу (например, 5'-метилцитоксингидроксилаза; TET1; TET2; TET3); гистонметилтрансферазу (HMT; например, SUV39, SET1, EZH1, EZH2, Set2, PRDM, SMYD, DOT1L, PRMT, G9a, GLP); метил-гистон-связывающий белок (например, HP1; Chd1; BPTF; L3MBTL1; ING2; BHC80; JMJD2A); гистондеметиразу (например, KDM, например, LSD, JHDM, JMJD, JARID, Uts, PHF); гистон-ацетилтрансферазу (HAT; например, HAT1; GCN5; PCAF; MYSTs; p300; CBP; SRC/p160); ацетилсвязывающие белки (например, белки, содержащие домен BROMO, домен DPF или домен YEATS); гистондеацетиразу (HDAC; например, HDAC1;

HDAC2; HDAC3; HDAC4; HDAC5; HDAC6; HDAC7; HDAC8; HDAC9; HDAC10; HDAC11; Sirt1; Sirt2; Sirt3; Sirt4; Sirt5; Sirt6; Sirt7). См., например, публикацию Cheng et al., Signal Transduction and Targeted Therapy, volume 4, Article number: 62 (2019); содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00162] В некоторых вариантах выполнения способ предусматривает после стадии дифференциации популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34+ гемогенного эндотелия, выполнение стадии ингибирования эпигенетического регулятора в полученной популяции CD34+ гемогенного эндотелия. В некоторых вариантах выполнения способ предусматривает перед стадией дифференциации популяции CD34+ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3+ Т-клеток, выполнение стадии ингибирования эпигенетического регулятора в популяции CD34+ гемогенного эндотелия.

[00163] Соответственно, в одном аспекте здесь предложен способ, предусматривающий: (а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34+ гемогенного эндотелия; (b) ингибирование эпигенетического регулятора в полученной популяции CD34+ гемогенного эндотелия; и (с) дифференциацию полученной популяции CD34+ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3+ Т-клеток.

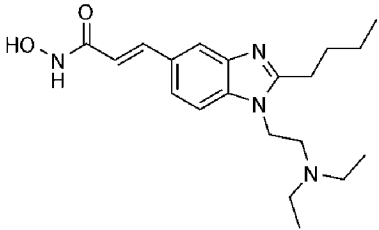
[00164] В некоторых вариантах гемогенный эндотелий CD34+ обрабатывают ингибитором эпигенетического регулятора. Типичные ингибиторы эпигенетического регулятора включают ингибитор по меньшей мере одного из следующих: DNMT; MBD; ДНК-деметилаза; HMT; белок, связывающий метилгистон; гистондеметилаза; HAT; ацетилсвязывающий белок; или HDAC. В некоторых вариантах выполнения эпигенетический регулятор представляет собой метилтрансферазу H3K9. Метилирование H3K9 у людей зависит главным образом от членов семейства Suv39, а именно от EHMT1/GLP, EHMT2/G9a, SUV39H1, SUV39H2, SETDB1 и SETDB2, а также ферментов PRDM2 и ASH1L, не относящихся к Suv39.

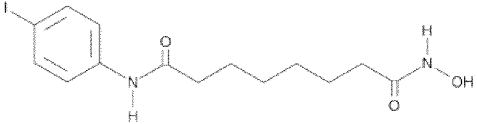
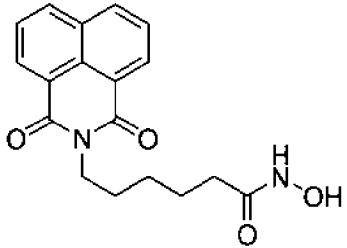
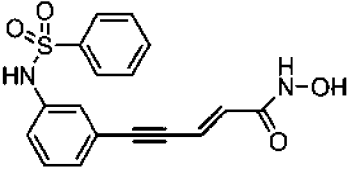
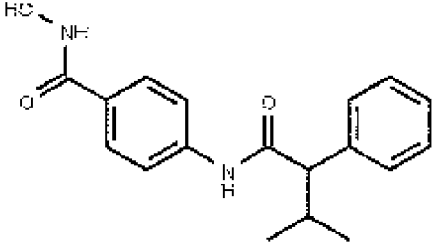
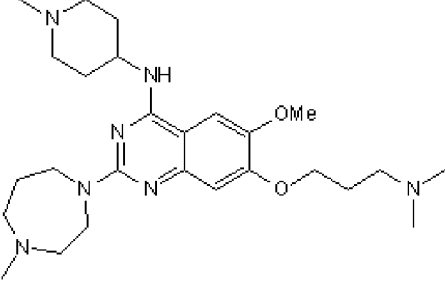
[00165] Неограничивающие примеры ингибиторов DNMT включают азацитидин; децитабин; гуадецитабин; гидралазин. Неограничивающие примеры ингибиторов HMT включают пинометостат; таземетостат; HSC2816126; CPI-1205; TCP; ORY-2001; HSC2879552; 4SC-202. Неограничивающие примеры ингибиторов HDAC

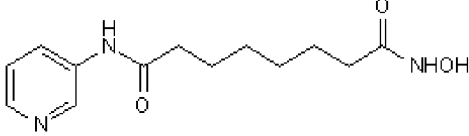
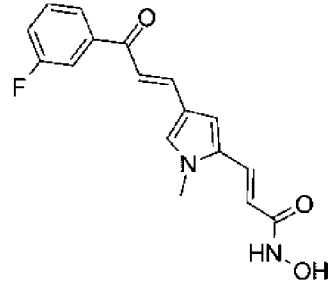
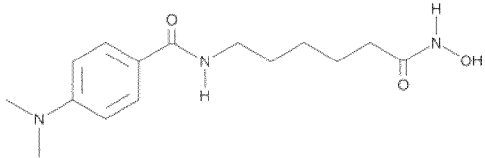
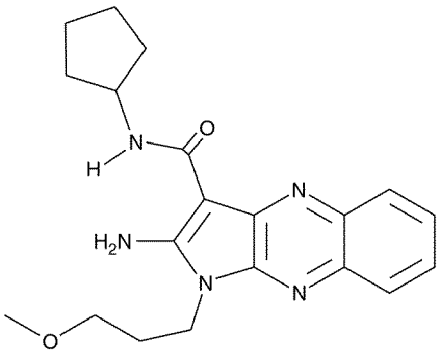
включают вальпроевую кислоту, фенилбутират; вориностат; трихостатин А; белиностат; энтиностат; панобиностат; моцетиностат; CI-994; ромидепсин; никотинамид; сурамин; PRI-724; HSC525762; CPI-0610; PO6870810; МК-8628.

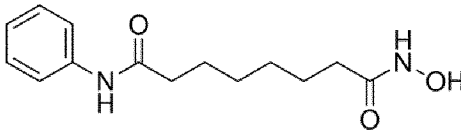
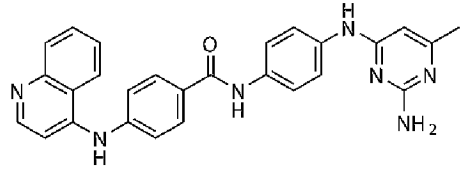
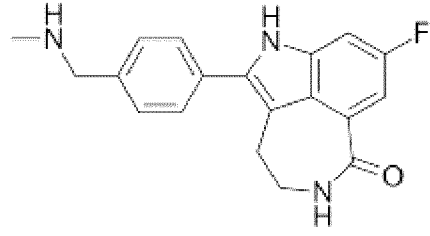
[00166] В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора выбран из **Таблицы 2**. В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора выбран из группы, состоящей из: SB939 (прациностат); 4-йод-SAHA; скриптайда; оксафлатина (т.е. оксамфлатин); s-HDAC-42; UNC0224; пироксамида; MC1568; CAY10398; CAY10591; SAHA (вориностат) (SIH-359); SGI-1027 и рукапариба (Rubraca™). В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора выбран из группы, состоящей из: SB939 (прациностат); 4-йод-SAHA; скриптайда; оксафлатина (т.е. оксамфлатин); s-HDAC-42; UNC0224; пироксамида; MC1568; CAY10398; CAY10591 и SAHA (вориностат) (SIH-359); см., например, **Фиг. 7** и **Таблицу 2**.

[00167] **Таблица 2: Низкомолекулярные ингибиторы, которые могут стимулировать дифференциацию Т-клеток** (например, при 500 нМ; низкомолекулярные соединения с показателем Z более 3 выделены жирным шрифтом; см., например, **Фиг. 6-7**).

Расположение	CD5 ⁺ CD7 ⁺ %	Показатель Z	Низкомолекулярное соединение	Функция низкомолекулярного соединения	Структура низкомолекулярного соединения
1A4	39,4%	5,042400516	SB939 (прациностат)	Ингибитор Rap-HDAC (например, с IC50 от 40 до 140 нМ, за исключением HDAC6). Он не обладает активностью против изофермента класса III SIRT1.	

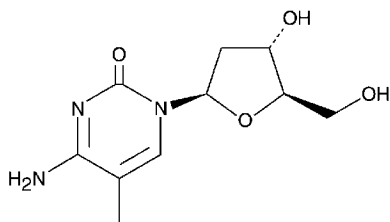
Расположение	CD5 ⁺ CD7 ⁺ %	Показатель Z	Низкомо- лекулярное соединение	Функция низкомоле- кулярного соединения	Структура низкомолекулярного соединения
1A6	25,3%	5,894930088	4-йод-САНА	4-йод-САНА представляет собой гидрофобное производное ингибитора HDAC классов I и II (например, HDAC1 или HDAC6) САНА.	
1B3	19,7%	3,857176477	Скриптайд	Ингибитор HDAC (см., например, патент США US 6544957).	
1H7	12,4%	6,539525618	Оксафлаггин (оксамфлаггин)	Ингибитор HDAC	
1H11	43,2%	4,262647859	c-HDAC-42	Ингибитор HDAC	
2A8	15,0%	3,475075737	UNC0224	Ингибитор G9a и GLP (метилтрансфераза H3K9)	

Расположение	CD5 ⁺ CD7 ⁺ %	Показатель Z	Низкомолекулярное соединение	Функция низкомолекулярного соединения	Структура низкомолекулярного соединения
2B2	11,6%	3,121963203	Пироксамид	Ингибитор HDAC (например, HDAC1)	
2E5	14,0%	5,829159302	MC1568	Ингибитор HDAC класса II (например, HDAC4 и HDAC5). Демонстрирует отсутствие ингибирования активности HDAC класса I (например, HDAC1, HDAC2, HDAC3).	
2F10	36,9%	4,181300807	CAY10398	Ингибитор HDAC (например, HDAC1)	
2G4	25,9%	8,575590126	CAY10591	Активатор SIRT1. Сиртуины (SIRT) представляют собой отдельный класс нечувстви- тельных к трихостатину А лизилдеаце- тилаз (HDAC класса III).	

Расположение	CD5 ⁺ CD7 ⁺ %	Показатель Z	Низкомолекулярное соединение	Функция низкомолекулярного соединения	Структура низкомолекулярного соединения
2G6	34,7%	7,987069235	SAHA (вориностат) (SIH-359)	Мощный обратимый ингибитор пангистон-деацетилазы HDAC, включая HDAC класса I и класса II.	
1D11	19,9%	0,093570319	SGI-1027	Ингибитор ДНК-метилтрансферазы (DNMT; например, DNMT1, DNMT3A или DNMT3B)	
1E 8	37,2%	0,467851594	Рукапариб (Rubraca™)	Ингибитор поли(ADP-рибозо)полимеразы (PARP; например, PARP1, PARP2, PARP3)	
Контрольные клетки	11,60%				

[00168] В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора выбран из группы, состоящей из: UNC0224; MC1568 и CAY10591 (см., например, **Фиг. 8**). В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора представляет собой UNC0224. В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора представляет собой MC1568. В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора представляет собой CAY10591.

[00169] В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора представляет собой UNC0224 или 5-метил-2'-дезокситидин (см., например, **Фиг. 10В** и структуру формулы I ниже). В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора представляет собой 5-метил-2'-дезокситидин. 5-Метил-2'-дезокситидин представляет собой пиримидиновый нуклеозид, который при включении в одноцепочечную ДНК может действовать в цис-положении, сигнализируя о метилировании ДНК *de novo*; см., например, Christman et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(16), 7347-7351 (1995).



I: 5-метил-2'-дезокситидин

[00170] В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора представлен в концентрации по меньшей мере 500 нМ. В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора представлен в концентрации по меньшей мере 1 нМ, по меньшей мере 2 нМ, по меньшей мере 3 нМ, по меньшей мере 4 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 6 нМ, по меньшей мере 7 нМ, по меньшей мере 8 нМ, по меньшей мере 9 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 20 нМ, по меньшей мере 30 нМ, по меньшей мере 40 нМ, по меньшей мере 50 нМ, по меньшей мере 60 нМ, по меньшей мере 70 нМ, по меньшей мере 80 нМ, по меньшей мере 90 нМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 150 нМ, по меньшей мере 200 нМ, по меньшей мере 300 нМ, по меньшей мере 400 нМ, по меньшей мере 500 нМ, по меньшей мере 600 нМ, по меньшей мере 700 нМ, по меньшей мере 800 нМ, по меньшей мере 900 нМ, по меньшей мере 1,0 мкМ, по меньшей мере 1,25 мкМ, по меньшей мере 1,5 мкМ, по меньшей мере 1,75 мкМ, по меньшей мере 2,0 мкМ, по меньшей мере 2,5 мкМ, по меньшей мере 3 мкМ, по меньшей мере 4 мкМ, по меньшей мере 5 мкМ, по меньшей мере 6 мкМ, по меньшей мере 7 мкМ, по меньшей мере 8 мкМ, по меньшей мере 9 мкМ или по меньшей мере 10 мкМ. В некоторых вариантах выполнения ингибитор эпигенетического регулятора представлен в концентрации от 1 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 50 нМ, от 50 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 1 мкм, от 1 мкм до 5 мкм или от 5 мкм до 10 мкм.

[00171] В некоторых вариантах выполнения клетки (например, CD34+ гемогенный эндотелий) культивируют, подвергая воздействию ингибитора эпигенетического регулятора, до развития CD5+CD7+ проТ-клеток. В некоторых

вариантах выполнения клетки (например, гемогенный эндотелий CD34+) культивируют, подвергая воздействию ингибитора эпигенетического регулятора, в течение приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах выполнения клетки (например, гемогенный эндотелий CD34+) культивируют при воздействии ингибитора эпигенетического регулятора в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 17 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 19 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 21 дня, по меньшей мере 22 дня, по меньшей мере 23 дней, по меньшей мере 24 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 26 дней, по меньшей мере 27 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 29 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 31 дня, по меньшей мере 32 дней, по меньшей мере 33 дней, по меньшей мере 34 дней, по меньшей мере 35 дней, по меньшей мере 36 дней, по меньшей мере 37 дней, по меньшей мере 38 дней, по меньшей мере 39 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 41 дня, по меньшей мере 42 дней, по меньшей мере 43 дней, по меньшей мере 44 дней, по меньшей мере 45 дней, по меньшей мере 46 дней, по меньшей мере 47 дней, по меньшей мере 48 дней, по меньшей мере 49 дней, по меньшей мере 50 дней и более.

Ингибирование G9a и/или GLP

[00172] В некоторых аспектах в настоящем документе описан способ дифференциации Т-клеток, предусматривающий стадию ингибирования G9a и/или GLP. В некоторых аспектах здесь предложен способ дифференциации Т-клеток, предусматривающий стадию ингибирования G9a. G9a также можно взаимозаменяемо называть эухроматической гистон-лизин-метилтрансферазой 2 (EHMT2); гистон H3-K9 метилтрансферазой 3; KMT1C; лизин-N-метилтрансферазой 1C; BAT8; или NG36. G9a представляет собой метилтрансферазу, которая метилирует остатки лизина гистона H3 (см., например, NCBI Gene ID: 10919; SEQ ID NO: 45-46 или последовательность, идентичную по меньшей мере на 95% и сохраняющая ту же функцию, или ее функциональный фрагмент). В некоторых аспектах в настоящем документе описан способ дифференциации Т-клеток, предусматривающий стадию ингибирования G9a-подобного белка (GLP). GLP также взаимозаменяемо называют эухроматической гистон-лизин-метилтрансферазой 1 (EHMT1); KMT1D; Eu-HMTase1; или гистон-лизин-N-

метилтрансферазой, H3-лизин-9 специфичная 5 (см., например, NCBI Gene ID: 79813; SEQ ID NO: 47-48, или последовательность, идентичная по меньшей мере на 95% и сохраняющая ту же функцию, или функциональную его фрагмент).

[00173] G9a и GLP существуют преимущественно в виде гетеромерного комплекса G9a-GLP. G9a и GLP являются первичными ферментами для моно- и диметилирования Lys 9 гистона H3 (H3K9me1 и H3K9me2) в эухроматине. H3K9me представляет собой специфическую метку для эпигенетической репрессии транскрипции за счет рекрутирования белков HP1 в метилированные гистоны. G9a/GLP также слабо метилирует Lys-27 гистона H3 (H3K27me). G9a/GLP также необходима для метилирования ДНК; активность гистон-метилтрансферазы G9a/GLP не требуется для метилирования ДНК, что позволяет предположить, что эти две активности функционируют независимо. G9a/GLP, вероятно, направляется к гистону H3 различными ДНК-связывающими белками, например, E2F6, MGA, MAX и/или DP1. Помимо активности гистонметилтрансферазы, G9a/GLP также метилирует негистоновые белки, например, диметилирование 'Lys-373' p53/TP53.

[00174] G9a также опосредует монометилирование Lys-56 гистона H3 (H3K56me1) в фазе G1, что способствует взаимодействию между гистоном H3 и PCNA и регулирует репликацию ДНК. G9a также метилирует гистон H1. G9a также метилирует CDYL, WIZ, ACIN1, DNMT1, HDAC1, ERCC6, KLF12 и себя. Во время фазы G0 GLP может способствовать молчанию генов, чувствительных к MYC и E2F, что указывает на роль в переходе G0/G1 в клеточном цикле. Помимо активности гистонметилтрансферазы, GLP также метилирует негистоновые белки: опосредует диметилирование 'Lys-373' p53/TP53.

[00175] **SEQ ID NO: 45**, эухроматическая гистонлизинметилтрансфераза 2 (EHMT2) Homo sapiens, вариант транскрипта 1, иРНК, ссылочная последовательность NCBI: NM_001289413.1 (участок 5-3706), 3702 п.н.

ATGCGGGGTCTACCGAGAGGGAGGGGGTTGATGCGGGCCCCGGGGGAGGGGT
CGTGCGGCCCCCTCCGGGCAGCCGAGGCCGCGGAAGGGGGGGGCCCCACAGAGGAA
GAGGTAGGCCCCGGAGCCTACTCTCTCTCCAGGGCCCAGGCATCCTGGACCCCCC
AACTCTCTACTGGGCTGACCAGCCCTCCTGTCCCTTGTCTCCCCTCCCAGGGGGAGG
CCCCCGCTGAGATGGGGGCGCTGCTGCTGGAGAAGGAAACCAGAGGAGCCACCGA
GAGAGTTCATGGCTCTTTGGGGGACACCCCTCGTAGTGAAGAAACCCTGCCCAAGG
CCACCCCCGACTCCCTGGAGCCTGCTGGCCCCCTCATCTCCAGCCTCTGTCACTGTCAC
TGTTGGTGATGAGGGGGCTGACACCCCTGTAGGGGCTACACCACTCATTGGGGATG
AATCTGAGAATCTTGAGGGAGATGGGGACCTCCGTGGGGGCGGATCCTGCTGGGC

CATGCCACAAAGTCATTCCCCTCTTCCCCCAGCAAGGGGGGTTCTGTCTAGCCGG
GCCAAGATGTCAATGACAGGGGCGGGAAAATCACCTCCATCTGTCCAGAGTTTGGC
TATGAGGCTACTGAGTATGCCAGGAGCCCAGGGAGCTGCAGCAGCAGGGTCTGAAC
CCCCTCCAGCCACCACGAGCCCAGAGGGACAGCCCAAGGTCCACCGAGCCCGCAAA
ACCATGTCCAAACCAGGAAATGGACAGCCCCCGGTCCCTGAGAAGCGGCCCCCTGA
AATACAGCATTTCGCATGAGTGATGATGTCCACTCACTGGGAAAGGTGACCTCAG
ATCTGGCCAAAAGGAGGAAGCTGAACTCAGGAGGTGGCCTGTCAGAGGAGTTAGGT
TCTGCCCCGGCGTTCAGGAGAAGTGACCCTGACGAAAGGGGACCCCGGGTCCCTGGA
GGAGTGGGAGACGGTGGTGGGTGATGACTTCAGTCTCTACTATGATTCTACTCTGT
GGATGAGCGCGTGGACTCCGACAGCAAGTCTGAAGTTGAAGCTCTAACTGAACAAC
TAAGTGAAGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAAGAAGAAGAAGAGGAAGAGGAGG
AGGAAGAGGAAGAAGAAGAGGAAGATGAGGAGTCAGGGAATCAGTCAGATAGGA
GTGGTTCCAGTGGCCGGCGCAAGGCCAAGAAGAAATGGCGAAAAGACAGCCCATG
GGTGAAGCCGTCTCGGAAACGGCGCAAGCGGGAGCCTCCGCGGGCCAAGGAGCCA
CGAGGGGTGTCCAATGACACATCTTCGCTGGAGACAGAGCGAGGGTTTGAGGAGTT
GCCCCTGTGCAGCTGCCGCATGGAGGCACCCAAGATTGACCGCATCAGCGAGAGGG
CGGGGCACAAGTGCATGGCCACTGAGAGTGTGGACGGAGAGCTGTCAGGCTGCAAT
GCCGCCATCCTCAAGCGGGAGACCATGAGGCCATCCAGCCGTGTGGCCCTGATGGT
GCTCTGTGAGACCCACCGCGCCCGCATGGTCAAACACCACTGCTGCCCCGGGCTGCG
GCTACTTCTGCACGGCGGGCACCTTCCTGGAGTGCCACCCTGACTTCCGTGTGGCCC
ACCGCTTCCACAAGGCCTGTGTGTCTCAGCTGAATGGGATGGTCTTCTGTCCCCACT
GTGGGGAGGATGCTTCTGAAGCTCAAGAGGTGACCATCCCCCGGGGTGACGGGGTG
ACCCACCGGCCGGCACTGCAGCTCCTGCACCCCCACCCCTGTCCCAGGATGTCCCC
GGGAGAGCAGACACTTCTCAGCCCAGTGCCCCGATGCGAGGGCATGGGGAACCCCG
GCGCCCCGCCCTGCGATCCCCTGGCTGACACCATGACAGCTCAGGGCCCTCCCTGAC
CCTGCCCAATGGGGGCTGCCTTTCAGCCGTGGGGCTGCCACTGGGGCCAGGCCGGG
AGGCCCTGGAAAAGGCCCTGGTCATCCAGGAGTCAGAGAGGCGGAAGAAGCTCCGT
TTCCACCCTCGGCAGTTGTACCTGTCCGTGAAGCAGGGCGAGCTGCAGAAGGTGATC
CTGATGCTGTTGGACAACCTGGACCCCAACTTCCAGAGCGACCAGCAGAGCAAGCG
CACGCCCCCTGCATGCAGCCGCCCAGAAGGGCTCCGTGGAGATCTGCCATGTGCTGCT
GCAGGCTGGAGCCAACATAAATGCAGTGGACAAACAGCAGCGGACGCCACTGATG
GAGGCCGTGGTGAACAACCACCTGGAGGTAGCCCGTTACATGGTGCAGCGTGGTGG
CTGTGTCTATAGCAAGGAGGAGGACGGTTCCACCTGCCTCCACCACGCAGCCAAAA
TCGGGAACTTGGAGATGGTCAGCCTGCTGCTGAGCACAGGACAGGTGGACGTCAAC
GCCCAGGACAGTGGGGGGTGGACGCCCATCATCTGGGCTGCAGAGCACAAGCACAT

CGAGGTGATCCGCATGCTACTGACGCGGGGCGCCGACGTCACCCTCACTGACAACG
 AGGAGAACATCTGCCTGCACTGGGCCTCCTTCACGGGCAGCGCCGCCATCGCCGAA
 GTCCTTCTGAATGCGCGCTGTGACCTCCATGCTGTCAACTACCATGGGGACACCCCC
 CTGCACATCGCAGCTCGGGAGAGCTACCATGACTGCGTGCTGTTATTCCTGTACGT
 GGGGCCAACCCTGAGCTGCGGAACAAAGAGGGGGACACAGCATGGGACCTGACTC
 CCGAGCGCTCCGACGTGTGGTTTGCGCTTCAACTCAACCGCAAGCTCCGACTTGGGG
 TGGGAAATCGGGCCATCCGCACAGAGAAGATCATCTGCCGGGACGTGGCTCGGGGC
 TATGAGAACGTGCCCATTCCCTGTGTCAACGGTGTGGATGGGGAGCCCTGCCCTGAG
 GATTACAAGTACATCTCAGAGAACTGCGAGACGTCCACCATGAACATCGATCGCAA
 CATCACCCACCTGCAGCACTGCACGTGTGTGGACGACTGCTCTAGCTCCAAGTGCCT
 GTGCGGCCAGCTCAGCATCCGGTGCTGGTATGACAAGGATGGGCGATTGCTCCAGG
 AATTTAACAAGATTGAGCCTCCGCTGATTTTCGAGTGTAACCAGGCGTGCTCATGCT
 GGAGAACTGCAAGAACCGGGTCTGTACAGAGTGGCATCAAGGTGCGGCTACAGCTC
 TACCGAACAGCCAAGATGGGCTGGGGGGTCCGCGCCCTGCAGACCATCCCACAGGG
 GACCTTCATCTGCGAGTATGTCGGGGAGCTGATCTCTGATGCTGAGGCTGATGTGAG
 AGAGGATGATTCTTACCTCTTCGACTTAGACAACAAGGATGGAGAGGTGTACTGCAT
 AGATGCCCCGTTACTATGGCAACATCAGCCGCTTCATCAACCACCTGTGTGACCCCAA
 CATCATTTCCCGTCCGGGTCTTCATGCTGCACCAAGACCTGCGATTTCCACGCATCGC
 CTTCTTCAGTTCCCGAGACATCCGGACTGGGGAGGAGCTAGGGTTTGACTATGGCGA
 CCGCTTCTGGGACATCAAAAGCAAATATTTACCTGCCAATGTGGCTCTGAGAAGTG
 CAAGCACTCAGCCGAAGCCATTGCCCTGGAGCAGAGCCGTCTGGCCCGCCTGGACC
 CACACCCTGAGCTGCTGCCCCGAGCTCGGCTCCCTGCCCCCTGTCAACACATGA

[00176] SEQ ID NO: 46, гистон-лизин-N-метилтрансфераза EHMT2,
 изоформа с (*Homo sapiens*), ссылочная последовательность NCBI: NP_001276342.1, 1233
 ак

MRGLPRGRGLMRARGRGRAAPPGSRGRGRGGPHRGRGRPRSLLSLPRAQASWTPQLST
 GLTSPVPCLPSQGEAPAEMGALLLEKETRGATERVHGS LGDTPRSEETLPKATPDSLEP
 AGPSSPASVTVTVGDEGADTPVGATPLIGDESENLEGDGDLRGGRILLGHATKSFPSSPS
 KGGSCPSRAKMSMTGAGKSPPSVQSLAMRLLSMPGAQGAAAAGSEPPPATTSPEGQPK
 VHRARKTMSKPGNGQPPVPEKRPPEIQHFRMSDDVHSLGKVTSDLAKRRKLNSGGGLS
 EELGSARRSGEVTLT KGDPGSLEEWETVVGDDFSLYYDSYSVDERVDSDSKSEVEALTE
 QLSEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEDEESGNQSDRSGSSGRRKAKKKWRKDSPWVKPS
 RKRRRKREPPRAKEPRGVSNDTSSLETERGFEEPLCSCRMEAPKIDRISERAGHKCMATE
 SVDGELSGCNAAILKRETMRPSSRVALMVLCETHRARMVKHHCCPGCGYFCTAGTFLE
 CHPDFRVAHRFHKACVSQLNGMVFCPHCGEDASEAQEVTIPRGDGVTPPAGTAAPAPP

LSQDVPGRADTSQPSARMRGHGEPRRPPCDPLADTIDSSGPSLTLPNGGCLSAVGLPLGP
 GREALEKALVIQESERRKKLRFHPRQLYLSVKQGELOKVILMLLDNLDPNFQSDQQSKR
 TPLHAAAQKGSVEICHVLLQAGANINAVDKQQRTPLEAVVNNHLEVARYMVQRGGC
 VYSKEEDGSTCLHHAAKIGNLEMVSLLLSTGQVDVNAQDSGGWTPIIWAAEHKHIEVIR
 MLLTRGADVTLTDNEENICLHWASFTGSAIAEVLLNARCDLHAVNYHGDTPHIAAR
 ESYHDCVLLFLSRGANPELRNKEGDTAWDLTPERSDVWFALQLNRKLRLGVGNRAIRT
 EKIIICRDVARGYENVPIPCVNGVDGEPCPEDYKYISENCETSTMNIDRNITHLQHCTCVD
 DCSSSNCLCGQLSIRCWYDKDGRLLQEFNKIEPLIFECNQACSCWRNCKNRVVQSGIK
 VRLQLYRTAKMGWGVRLALQTIPQGTFIGEYVGELISDAEADVREDDSYLFDLDNKDGE
 VYCIDARYYGNISRFINHLCDPNIIPVRVFMHLHQDLRFPRIAFFSSRDIRTGEELGFDYGDR
 FWDIKSKYFTCQCGSEKCKHSAEAIALEQSRLARLDPHPELLPELGSPPVNT

[00177] SEQ ID NO: 47, эухроматическая гистонлизинметилтрансфераза 1 (EHMT1) Homo sapiens, вариант транскрипта 2, иРНК, ссылочная последовательность NCBI: NM_001145527.2 (участок 25-2451), 2427 п.н.

ATGGCCGCCGCGGATGCCGAGGCAGTTCGCGCAGGGGGGAGCCTCAGCAG
 GATTGCTGTGTGAAAACCGAGCTGCTGGGAGAAGAGACACCTATGGCTGCCGATGA
 AGGCTCAGCAGAGAAACAGGCAGGAGAGGGCCACATGGCTGCGGACGGTGAGACC
 AATGGGTCTTGTGAAAACAGCGATGCCAGCAGTCATGCAAATGCTGCAAAGCACAC
 TCAGGACAGCGCAAGGGTCAACCCCCAGGATGGCACCAACACACTAACTCGGATAG
 CGGAAAATGGGGTTTCAGAAAGAGACTCAGAAGCGGCGAAGCAAAACACGTCAC
 TGCCGACGACTTTGTGCAGACTTCTGTTCATCGGCAGCAACGGATACATCTTAAATAA
 GCCGGCCCTACAGGCACAGCCCTTGAGGACTACCAGCACTCTGGCCTCTTCGCTGCC
 TGGCCATGCTGCAAAAACCTTCCTGGAGGGGCTGGCAAAGGCAGGACTCCAAGCG
 CTTTTCCCCAGACGCCAGCCGCCCCACCAGCCACCCTTGGGGAGGGGAGTGCTGAC
 ACAGAGGACAGGAAGCTCCCGGCCCTGGCGCCGACGTCAAGGTCCACAGGGCACG
 CAAGACCATGCCGAAGTCCGTCTGTGGGCCTGCATGCAGCCAGTAAAGATCCCAGAG
 AAGTTCGAGAAGCTAGAGATCATAAGGAACCAAAAAGAGGAGATCAACAAAAACAT
 TTCTGACTTTGGACGACAGCAGCTTTTACCCCCCTTCCCATCCCTTCATCAGTCGCTA
 CCTCAGAACCAGTGCTACATGGCCACCACAAAATCACAGACAGCTTGCTTGCCTTTT
 GTTTTAGCAGCTGCAGTATCTCGGAAGAAAAAACGAAGAATGGGAACCTATAGCCT
 GGTTCCCTAAGAAAAAGACCAAAGTATTAACACAGAGGACGGTGATTGAGATGTTTA
 AGAGCATAACTCATTCCACTGTGGGTTCGAAGGGGGAGAAGGACCTGGGCGCCAGC
 AGCCTGCACGTGAATGGGGAGAGCCTGGAGATGGACTCGGATGAGGACGACTCAGA
 GGAGCTCGAGGAGGACGACGGCCATGGTGCAGAGCAGGCGGCCGCGTTCCCCACAG
 AGGACAGCAGGACTTCCAAGGAGAGCATGTCTGGAGGCTGATCGCGCCCAGAAGATG

GACGGGGAGTCCGAGGAGGAGCAGGAGTCCGTGGACACCGGGGAGGAGGAGGAAG
 GCGGTGACGAGTCTGACCTGAGTTCGGAATCCAGCATTAAAGAAGAAATTTCTCAAG
 AGGAAAGGAAAGACCGACAGTCCCTGGATCAAGCCAGCCAGGAAAAGGAGGCGGA
 GAAGTAGAAAGAAGCCCAGCGGTGCCCTCGGTTCTGAGTCGTATAAGTCATCTGCA
 GGAAGCGCTGAGCAGACGGCACCAGGAGACAGCACAGGGTACATGGAAGTTTCTCT
 GGACTCCCTGGATCTCCGAGTCAAAGGAATTCTGTCTTCACAAGCAGAAGGGTTGGC
 CAACGGTCCAGATGTGCTGGAGACAGACGGCCTCCAGGAAGTGCCTCTCTGCAGCT
 GCCGGATGGAAACACCGAAGAGTCGAGAGATCACCACACTGGCCAACAACCAAGTGC
 ATGGCTACAGAGAGCGTGGACCATGAATTGGGCCGGTGCACAAACAGCGTGGTCAA
 GTATGAGCTGATGCGCCCCTCCAACAAGGCCCGCTCCTCGTGCTGTGTGAAGACCA
 CCGGGGCCGCATGGTGAAGCACCAAGTGTCTGTCTGGCTGTGGCTACTTCTGCACAGC
 GGGTAATTTTATGGAGTGTGAGCCCGAGAGCAGCATCTCTCACCGTTTCCACAAAGA
 CTGTGCCTCTCGAGTCAATAACGCCAGCTATTGTCCCCACTGTGGGGAGGAGAGCTC
 CAAGGCCAAAGAGGTGACGATAGCTAAAGCAGACACCACCTCGACCGTGACACCAG
 TCCCCGGGCAGGAGAAGGGCTCGGCCCTGGAGGGCAGGGCCGACACCACAACGGG
 CAGTGCTGCCGGGCCACCACTCTCGGAGGACGACAAGCTGCAGGGTGCAGCCTCCC
 ACGTGCCCGAGGGCTTTGATCCAACGGGACCTGCTGGGCTTGGGAGGCCAACTCCC
 GGCTTTTCCAGGGACCAAGGAAGGAAACCTTGGAGAGCGCTCTCATCGCCCTCGA
 CTCGGAAAAACCCAAGAAGCTTCGCTTCCACCCAAAGCAGCTGTACTTCTCCGCCAG
 GCAAGGGGAGCTTCAGAAGGTGCTCCTCATGCTGGTGGACGGAATTGACCCCAACT
 TCAAAATGGAGCACCAGAATAAGCGCTCTCCACTGCACGCCGCGGCAGAGGCTGGA
 CACGTGGACATCTGCCACATGCTGGTTCAGTTCTGCAGGCTGGGAAGCCCAAGGTCG
 AGGGGCTGCCTTTGGTGA

[00178] SEQ ID NO: 48, изоформа 2 гистон-лизин-N-метилтрансферазы
 EHMT1 (*Homo sapiens*), ссылочная последовательность NCBI: NP_001138999.1, 808
 аминокислот

MAAADAEAVPARGEPQQDCCVKTELLGEETPMAADEGSAEKQAGEAHMAADG
 ETNGSCENS DASSHANA AKHTQDSARVNPQDGTNTL TRIAENGVSERDSEAAKQNHVT
 ADDFVQTSVIGSNGYILNKPALQAQPLRTTSTLASSLPGHAAKTLPGGAGKGRTPSAFPQ
 TPAAPPATLGEGSADTEDRKLPAPGADV K VHRARKTMPKSVVGLHAASKDPREVRER
 DHKEPKKEEINKNISDFGRQQLLPFP SLHQSLPQNQC YMATTKSQTACL PFLAAAVSRK
 KKRRMGTYSLVPKKKTKVLKQRTVIEMFKSITHSTVGS KGEKDLGASSLHVNGESLEM
 DSDEDDSEELEDDGHGAEQAAAFPTEDSRTSKESMSEADRAQKMDGESEEEQESVDT
 GEEEEGGDESDLSSESIKKKFLKRKGKTDSPWIKPARKRRRRSRKKPSGALGSESYKSS
 AGSAEQTAPGDSTGYMEVSLDSLDRVKGILSSQA EGLANGPDVLETDGLQEVPLCSCR

METPKSREITTLANNQCMATESVDHELGRCTNSVVKYELMRPSNKAPLLVLCEDHRGR
 MVKHQCCPGCGYFCTAGNFMECQPESSISHRFHKDCASRVNNASYCPHCGEESSKAKE
 VTIAKADTTSTVTPVPGQEKGSALEGRADTTTGSAAAGPPLSEDDKLQGAASHVPEGFDP
 TGPAGLGRPTPGLSQGPGKETLESALIALDSEKPKKLRFHHPKQLYFSARQGELQKVLLML
 VDGIDPNFKMEHQNKRSPLHAAAEEAGHVDICHMLVQFCRLGSPRSRGCLW

[00179] В некоторых вариантах выполнения способ предусматривает после стадии дифференциации популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в CD34⁺ популяцию гемогенного эндотелия, выполнение стадии ингибирования G9a и/или GLP в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия. В некоторых вариантах выполнения способ предусматривает перед стадией дифференциации популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток, выполнение стадии ингибирования G9a и/или GLP в популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия.

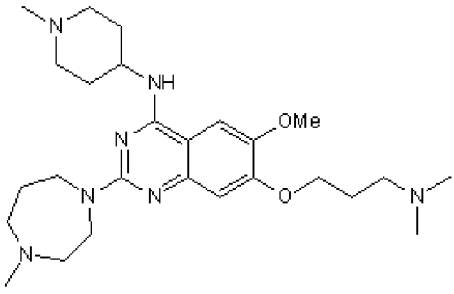
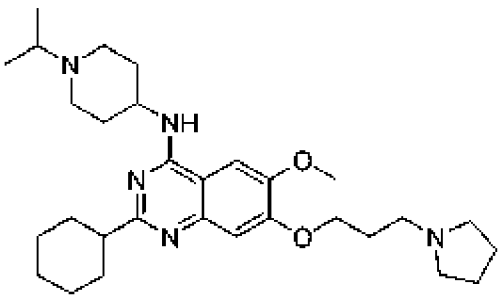
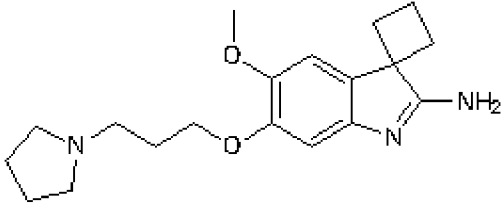
[00180] Соответственно, в одном из аспектов настоящего изобретения предложен способ, предусматривающий: (а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; (b) ингибирование G9a и/или GLP в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и (с) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

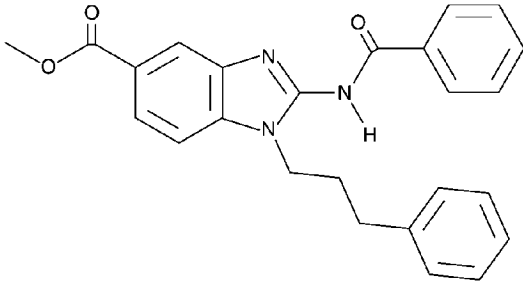
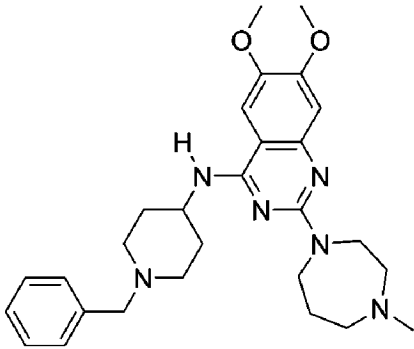
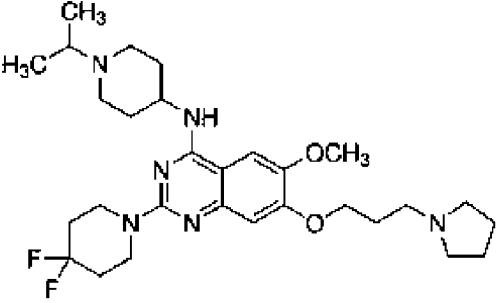
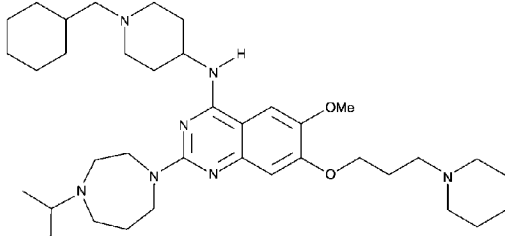
[00181] В одном варианте выполнения ингибитор представляет собой ингибитор G9a/GLP. В одном варианте выполнения ингибитор G9a/GLP выбран из числа соединений, указанных в **Таблице 3**, или их производных или аналогов. В одном варианте выполнения ингибитор G9a/GLP выбран из группы, состоящей из: UNC0224; UNC0638; A366; BRD4770; BIX01294; UNC0642; UNC0631; UNC0646; UNC0321; E72; BIX-01338; BRD9539; хетоцина и DCG066. В одном варианте выполнения ингибитор G9a/GLP выбран из группы, состоящей из: UNC0224; UNC0638; A366; BRD4770; BIX01294 и UNC0642 (см., например, **Фиг. 8, 10B, 12B, 13B-13F**). В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP выбран из группы, состоящей из: UNC0224; UNC0638; BRD4770; BIX01294 и UNC0642 (см., например, **Фиг. 8, 10B, 12B, 13B, 13D-13F**).

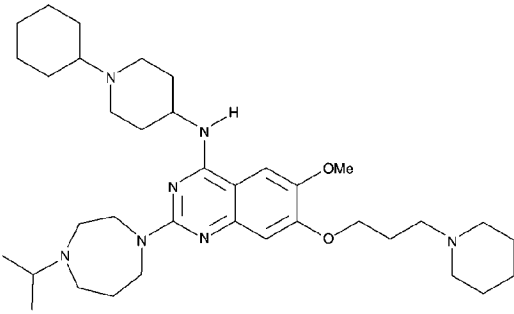
[00182] В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP представляет собой ингибитор G9a/GLP типа I (например, производное BIX-01294),

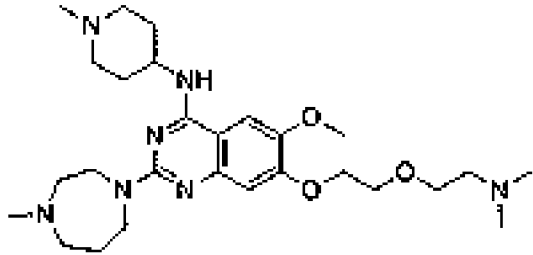
выбранный из группы, состоящей из: UNC0224; UNC0638; A366; BIX01294; UNC0642; UNC0631; UNC0646; UNC0321 и E72. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP представляет собой ингибитор G9a/GLP типа II (например, производное BIX-01338), выбранный из группы, состоящей из: BRD4770; BIX-01338 и BRD9539. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP представляет собой ингибитор G9a/GLP типа III, такой как хетоцин. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP представляет собой ингибитор G9a/GLP типа IV, выбранный из группы, состоящей из: DCG066.

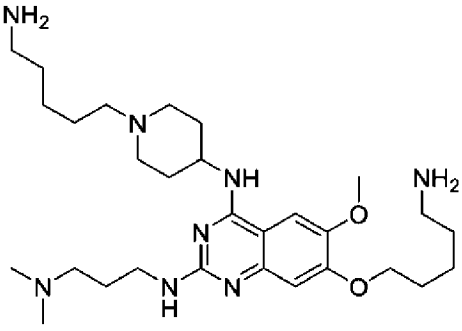
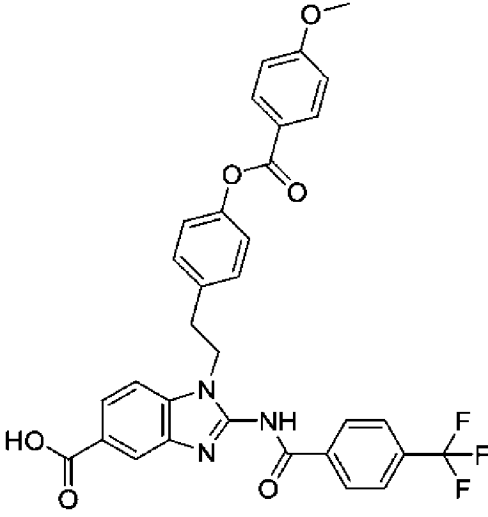
[00183] Таблица 3: Ингибиторы G9a/GLP, которые могут стимулировать дифференциацию Т-клеток (см., например, Фиг. 13А-13F). Все ссылки, процитированные в Таблице 3, включены в настоящее описание во всей своей полноте.

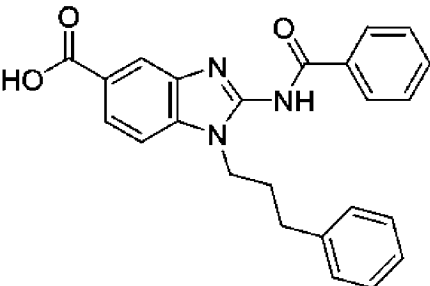
Ингиби- тор G9a/GLP	Иллюстративные результаты	Иллюстра- тивная эффектив- ная доза(ы)	Структура низкомолекулярных соединений
UNC0224 (например, ингибитор G9a типа I, производ- ное BIX- 01294)	См., например, Фиг. 8, 10В, 12В.	312 нМ, 625 нМ, 1,25 мкМ, 2,5 мкМ, 5 мкМ	
UNC0638 (например, ингибитор G9a типа I, производ- ное BIX- 01294)	См., например, Фиг. 13В.	8 нМ	
A366 (например, ингибитор G9a типа I, производ- ное BIX- 01294)	См., например, Фиг. 13С.	Н/Д	

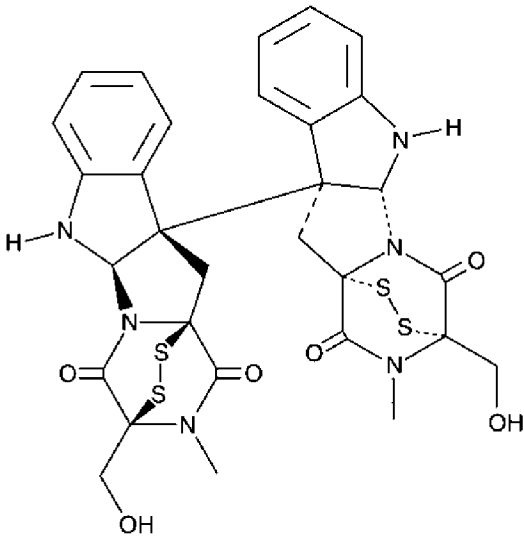
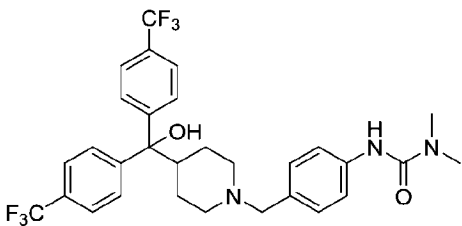
Ингиби- тор G9a/GLP	Иллюстративные результаты	Иллюстра- тивная эффектив- ная доза(ы)	Структура низкомолекулярных соединений
BRD4770 (например, ингибитор G9a типа II, производ- ное BIX- 01338)	См., например, Фиг. 13D ; см., например, Yuan et al., ACS Chem Biol. 2012 Jul 20; 7(7): 1152–1157.	200 нМ	
BIX01294 (например, ингибитор G9a типа I)	См., например, Фиг. 13E .	200 нМ	
UNC0642 (например, ингибитор G9a типа I, производ- ное BIX- 01294)	См., например, Фиг. 13F .	40 нМ	
UNC0631 (например, ингибитор G9a типа I, производ- ное BIX- 01294)	См., например, Liu et al. Medicinal Chemistry 54(17), 6139-6150 (2011).	Например, в клетках MDA-MB- 231 IC ₅₀ = 25 нМ.	

Ингиби- тор G9a/GLP	Иллюстративные результаты	Иллюстра- тивная эффектив- ная доза(ы)	Структура низкомолекулярных соединений
UNC0646 (например, ингибитор G9a типа I, производ- ное BIX- 01294)	См., например, Liu et al. Medicinal Chemistry 54(17), 6139-6150 (2011).	Например, в клетках MDA-MB- 231 $IC_{50} = 26$ нМ	

Ингиби- тор G9a/GLP	Иллюстративные результаты	Иллюстра- тивная эффектив- ная доза(ы)	Структура низкомолекулярных соединений
UNC0321 (например, ингибитор G9a типа I, производ- ное BIX-01294)	См., например Liu et al. J Med Chem. 2010 Aug 12; 53(15): 5844–5857; Liu et al. J Med Chem. 2009 Dec 24; 52(24): 7950–7953. Проницаемый для клеток аналог хиназолина, который сильно и селективно ингибирует PKMT G9a ($IC_{50} = 6 \text{ нМ}$ и 9 нМ в двух биохимических анализах на CLOT и ECSD, соответственно, и K_i Моррисона = 63 пМ, что приблизительно в 250 раз сильнее, чем у близкородственного аналога, BIX01294. Он ингибирует GLP с пониженной активностью (например, 15 нМ) и оказывается неактивным ($IC_{50} > 40 \text{ мкМ}$) по отношению к другим протеинлизин- и аргинин-метилтрансферазам, таким как SET7/9 (аH3K4 PKMT), SET8/PreSET7 (аH4K20 PKMT) и PRMT3, а также JMJD2E (> 1000-кратная селективность) в ферментативных анализах ECSD.	Например, G9a ($IC_{50} = 6 \text{ нМ}$ и 9 нМ и K_i Моррисона = 63 пМ; GLP (например, 15 нМ)	

Ингиби- тор G9a/GLP	Иллюстративные результаты	Иллюстра- тивная эффектив- ная доза(ы)	Структура низкомолекулярных соединений
E72 (например, ингибитор G9a типа I, производ- ное BIX- 01294)	См., например Chang et al. J Mol Biol. 2010 Jul 2; 400(1): 1– 7	Например, G9a EC ₅₀ 100 нМ	
BIX-01338 (например, ингибитор G9a типа II)	См., например, Greiner et al. Nature Chemical Biology 1(3), 143-145 (2005). Проницаемое для клеток аминок- бензимидазоловое соединение, которое, как показано, ингибирует широкий спектр гистоновых метилтрансфераз, включая активность me2 PRMT1 H4R3, активность me2 SET7/9 H3K4, активность me2 G9a H3K9, а также активность me3 H3K9 SUV39H1 (дикого типа и гиперактивный мутант H320R) и GLP (эффективная концентрация = 15 мкМ) в SAM-конкурентном режиме.	G9a/GLP эффектив- ная конц. = 15 мкМ	

Ингиби- тор G9a/GLP	Иллюстративные результаты	Иллюстра- тивная эффектив- ная доза(ы)	Структура низкомолекулярных соединений
BRD9539 (например, ингибитор G9a типа II, производное BIX-01338)	См., например, Yuan et al., ACS Chem Biol. 20 июля 2012 г.; 7 (7): 1152–1157. BRD9539 является ингибитором G9a со значением IC ₅₀ 6,3 мкМ. Он ингибирует поликомб-репрессивный комплекс 2 (PRC2) в аналогичной степени, при этом 54 и 43% активности остаются для G9a и PRC2, соответственно, при использовании в концентрации 10 мкМ. Он селективен в отношении G9a и PRC2 по сравнению с SU39H1 и NDMT1 до концентрации 40 мкМ. Он более эффективен, чем BRD4770 в ферментных анализах, но может потребоваться более высокая концентрация для клеточных анализов.	Например, G9a, значение IC ₅₀ 6,3 мкМ	

Ингиби- тор G9a/GLP	Иллюстративные результаты	Иллюстра- тивная эффектив- ная доза(ы)	Структура низкомолекулярных соединений
Хетоцин (например, (+)- хетоцин; ингибитор G9a типа III)	См., например, Greiner et al. Nature Chemical Biology 1(3), 143-145 (2005). Хетоцин является грибковым микотоксином, который ингибирует HMT SU(VAR)3-9 ($IC_{50} = 0,8$ мкМ). На селективность в отношении Lys9-HMT указывают более высокие значения IC_{50} (>90 мкМ) для Lys20-специфического PRSET7, Lys27-специфического EZH2 и Lys4-специфичного SET7/9.	Например, G9a $IC_{50} = 2,5$ мкМ.	
DCG066 (например, ингибитор G9a типа IV)	См., например, Kondengaden et al., Eur J Med Chem. 2016 Oct 21;122:382-393.	Например, G9a EC_{50} 6,5 мкМ	

[00184] В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP представлен в концентрации по меньшей мере 500 нМ. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP представлен в концентрации по меньшей мере 1 нМ, по меньшей мере 2 нМ, по меньшей мере 3 нМ, по меньшей мере 4 нМ, по меньшей мере 5 нМ, по меньшей мере 6 нМ, по меньшей мере 7 нМ, по меньшей мере 8 нМ, по меньшей мере 9 нМ, по меньшей мере 10 нМ, по меньшей мере 20 нМ, по меньшей мере 30 нМ, по меньшей мере 40 нМ, по меньшей мере 50 нМ, по меньшей мере 60 нМ, по меньшей мере 70 нМ, по меньшей мере 80 нМ, по меньшей мере 90 нМ, по меньшей мере 100 нМ, по меньшей мере 150 нМ, по меньшей мере 200 нМ, по меньшей мере 300 нМ, по меньшей мере 400 нМ, по меньшей мере 500 нМ, по меньшей мере 600 нМ, по меньшей мере 700 нМ, по меньшей мере 800 нМ, по меньшей мере 900 нМ, по меньшей мере 1,0 мкМ, по меньшей мере 1,25 мкМ, по меньшей мере 1,5 мкМ, по меньшей мере 1,75 мкМ, по меньшей мере 2,0 мкМ, по меньшей мере 2,5 мкМ, по меньшей мере 3 мкМ, по меньшей мере 4 мкМ, по меньшей мере

мере 5 мкМ, по меньшей мере 6 мкМ, по меньшей мере 7 мкМ, по меньшей мере 8 мкМ, по меньшей мере 9 мкМ или по меньшей мере 10 мкМ. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP представлен в концентрации от 1 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 50 нМ, от 50 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 1 мкМ, от 1 мкМ до 5 мкМ или от 5 мкМ до 10 мкМ.

[00185] В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP (например, UNC0224; см., например, **Фиг. 8, 10B, 12B**) представлен в концентрации по меньшей мере 312 нМ, по меньшей мере 625 нМ, по меньшей мере 1,25 мкМ, по меньшей мере 2,5 мкМ, или по меньшей мере 5 мкМ. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP (например, UNC0638; см., например, **Фиг. 13B**) представлен в концентрации по меньшей мере 8 нМ. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP (например, BRD4770; см., например, **Фиг. 13D**) представлен в концентрации по меньшей мере 200 нМ. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP (например, BIX01294; см., например, **Фиг. 13E**) представлен в концентрации по меньшей мере 200 нМ. В некоторых вариантах выполнения ингибитор G9a/GLP (например, UNC0642; см., например, **Фиг. 13F**) представлен в концентрации по меньшей мере 40 нМ.

[00186] В некоторых вариантах выполнения клетки (например, CD34+ гемогенный эндотелий) культивируют, подвергая воздействию ингибитора G9a/GLP, до развития CD5+CD7+ ргоТ-клеток. В некоторых вариантах выполнения клетки (например, гемогенный эндотелий CD34+) культивируют при воздействии ингибитора G9a/GLP в течение приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах выполнения клетки (например, гемогенный эндотелий CD34+) культивируют при воздействии ингибитора G9a/GLP в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 17 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 19 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 21 дня, по меньшей мере 22 дней, по меньшей мере 23 дней, по меньшей мере 24 дней, по меньшей мере 25 дней, по меньшей мере 26 дней, по меньшей мере 27 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 29 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 31 дня, по меньшей мере 32 дней, по меньшей мере 33 дней, по меньшей мере 34 дней, по меньшей мере 35 дней, по меньшей мере 36 дней, по меньшей мере 37 дней, по меньшей мере 38 дней, по меньшей мере 39 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 41 дня, по меньшей мере 42 дней, по меньшей мере

мере 43 дней, по меньшей мере 44 дней, по меньшей мере 45 дней, по меньшей мере 46 дней, по меньшей мере 47 дней, по меньшей мере 48 дней, по меньшей мере 49 дней, по меньшей мере 50 дней и более.

[00187] В некоторых вариантах выполнения культивирование клеток (например, CD34+ гемогенного эндотелия) в присутствии ингибитора G9a/GLP увеличивает количество образующихся клеток (например, CD5+CD7+ Pro-T-клеток; CD3+ T-клеток; CD4+CD8+ T-клеток; CD4+ T-клеток; CD8+ T-клеток; альфа-бета T-клеток) по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900% или более, или по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000 или более раз по сравнению с клетками, которые не культивировали в присутствии ингибитора G9a/GLP; см., например, **Фиг. 8, Фиг. 10B, Фиг. 12B, Фиг. 13B-13F, Фиг. 14B, Фиг. 15A.**

[00188] В некоторых вариантах выполнения культивирование клеток (например, CD34+ гемогенного эндотелия) в присутствии ингибитора G9a/GLP снижает количество клеток эритроидного или миелоидного происхождения (например, эритроидных клеток, макрофагов, гранулоцитов, мегакариоцитов) по меньшей мере на 1% по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере

мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900% или более, или по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000 или более раз по сравнению с клетками, которые не культивировали в присутствии ингибитора G9a/GLP; см., например, **Фиг. 14C**.

[00189] В некоторых вариантах выполнения культивирование клеток (например, CD34+ гемогенного эндотелия) в присутствии ингибитора G9a/GLP снижает общее количество дифференцированных клеток по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900% или более, или по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000 или более раз, по сравнению с клетками, которые не культивировали в присутствии ингибитора G9a/GLP; см., например, **Фиг. 15B**.

[00190] В некоторых вариантах выполнения культивирование клеток (например, CD34+ гемогенного эндотелия) в присутствии ингибитора G9a/GLP увеличивает процентное содержание результирующих представляющих интерес клеток (например, CD5+CD7+ Pro-T-клеток; CD3+ Т-клеток; CD4+CD8+ Т-клеток; CD4+ Т-клеток; CD8+ Т-клеток; альфа-бета Т-клеток) среди общего числа дифференцированных клеток по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на

95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 700%, по меньшей мере на 800%, по меньшей мере на 900% или более, или по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000 или более раз, по сравнению с клетками, которые не культивировали в присутствии ингибитора G9a/GLP; см., например, **Фиг. 15С**.

[00191] В некоторых вариантах выполнения способ дифференциации Т-клеток, как описано здесь (например, ингибирование G9a/GLP и дифференциация Т-клеток без стромы), дает популяцию, которая содержит по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% представляющих интерес клеток (например, CD5+CD7+ Pro-T-клетки; CD3+ Т-клетки; CD4+CD8+ Т-клетки; CD4+ Т-клетки; CD8+ Т-клетки; альфа-бета-Т-клетки). В некоторых вариантах выполнения способ дифференциации Т-клеток, как описано здесь (например, с ингибированием G9a/GLP и дифференциацией Т-клеток без стромы), дает популяцию, которая включает по меньшей мере 15% CD5+CD7+ Pro Т-клеток.

[00192] См., например, Greiner et al. *Nature Chemical Biology* 1(3), 143-145 (2005); Liu et al. *Journal of Medicinal Chemistry* 54(17), 6139-6150 (2011); Liu et al. *J Med Chem.* 2010 Aug 12; 53(15): 5844–5857; Liu et al., *J Med Chem.* 2009 Dec 24; 52(24): 7950–7953; Kondengaden et al., *Eur J Med Chem.* 2016 Oct 21, 122:382-393; Yuan et al. *ACS Chem Biol.* 2012 Jul 20; 7(7): 1152–1157; Chang et al. *J Mol Biol.* 2010 Jul 2; 400(1): 1–7; Christman et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(16), 7347-7351 (1995); Cheng et al., *Signal Transduction and Targeted Therapy* volume 4, Article number: 62 (2019); содержание каждой публикации полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Ингибирование гистонметилтрансферазы

[00193] В некоторых вариантах выполнения способ дифференциации может предусматривать ингибирование гистонметилтрансферазы. Стадия ингибирования гистонметилтрансферазы (например, нокдаун EZH1) может повысить эффективность дифференциации (например, Т-клеток). Соответственно, в некоторых вариантах выполнения способ дифференциации предусматривает ингибирование

гистонметилтрансферазы, например, в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия. Способы ингибирования гистонметилтрансферазы известны в данной области; см., например, международную заявку № WO 2018/048828, заявку на выдачу патента США № 2019/0225940, публикации Doulatov et al., *Cell Stem Cell*. 2013 October 3, 13(4); Vo et al., *Nature* 2018, 553(7689): 506–510; при этом содержание каждого документа полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00194] Однако стадия ингибирования гистонметилтрансферазы (например, нокдаун EZH1) требуется не всегда. Таким образом, в некоторых вариантах выполнения способ дифференциации не предусматривает ингибирования гистонметилтрансферазы, например, в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия.

[00195] В ходе этих экспериментов авторы изобретения обнаружили, что ингибирование специфических модифицирующих гистон ферментов, нацеленных на H3K9 и H3K27, способствует лимфоидному потенциалу гемопоэтических клеток-предшественников, полученных из плюрипотентных стволовых клеток. Ферменты, модифицирующие гистоны, представляют собой гистон-лизинметилтрансферазы. Посттрансляционные модификации гистоновых белков регулируют уплотнение хроматина, опосредуют эпигенетическую регуляцию транскрипции и контролируют клеточную дифференциацию в норме и при патологии. Метилирование гистоновых хвостов является одним из фундаментальных событий эпигенетической передачи сигналов. Триметилирование лизина 9 гистона H3 (H3K9) опосредует рекрутирование хроматина HP1, конденсацию гетерохроматина и молчание генов. Точно так же метилирование H3K27 и H4K20 связано с репрессированным состоянием хроматина, тогда как экспрессированные гены метилированы в H3K4, H3K36 и H3K79. Метилирование H3K9 у людей в основном зависит от членов семейства Suv39, а именно EHMT1/GLP, EHMT2/G9a, SUV39H1, SUV39H2, SETDB1 и SETDB2, а также ферментов PRDM2 и ASH1L, не относящихся к Suv39 (см., например, публикацию Hong Wu et al., *Structural Biology of Human H3K9 Methyltransferases*, 2010, *PLoS ONE*, 5(2): e8570, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки). Напротив, метилирование H3K27 осуществляется поликомб-репрессивным комплексом 2 (PRC2).

[00196] Ди/триметилирование H3K9 в основном катализируется консервативными гистонметилтрансферазами SUV39H1/2, в то время как поликомб-репрессивный комплекс 2 (PRC2) обеспечивает ди/триметилирование H3K27 (см., например, Rea S, 2000. *Nature* 406:593-599; Margueron R and Reinberg D. 2011. *Nature* 469:343-349). PRC2 включает каталитическую субъединицу EZH1/2, SUZ12, EED и RBBP7/4 (см., например, Margueron R and Reinberg D, 2011).

[00197] В данном случае конкретно предполагается, что ингибирование гистон-лизин-метилтрансфераз, нацеленных на H3K9 и H3K27, ослабляет репрессию транскрипции, возникающую в результате метилирования гистона H3, способствуя тем самым экспрессии генов, которая облегчает дифференциацию клеток, в частности спецификацию Т-клеток.

[00198] В одном варианте выполнения гистонметилтрансфераза катализирует добавление метильной группы к остатку лизина 9 гистона H3 (H3K9) и/или к остатку лизина 27 гистона H3 (H3K27).

[00199] В одном варианте выполнения ингибитор гистонметилтрансферазы ингибирует гетеромерный комплекс G9a/GLP.

[00200] G9a (EC 2.1.1.43) (UniProtKB: Q96KQ7) также известен как EHMT2 (эухроматическая гистон-лизин-N-метилтрансфераза 2), гистон-метилтрансфераза G9A и белок G9a.

[00201] GLP (EC 2.1.1.43) (UniProtKB: Q9H9B1) также известен как EHMT1 (эухроматический гистон-лизин-N-метилтрансфераза 1), G9a-подобный белок 1 и GLP1.

[00202] В одном варианте выполнения ингибитор гистонметилтрансферазы ингибирует EZH1 (энхансер субъединицы Zeste 1 поликомб-репрессивного комплекса 2).

[00203] В одном варианте выполнения гистонметилтрансфераза H3K27 представляет собой EZH1 (EC:2.1.1.43) (UniprotKB Q92800-1).

[00204] В одном варианте выполнения гистонметилтрансфераза H3K27 не является EZH2 (EC:2.1.1.43) (Unipro Q15910-1).

[00205] В одном варианте выполнения ингибитор гистонметилтрансферазы ингибирует экспрессию гена или белковую каталитическую активность гистонметилтрансферазы.

[00206] В одном варианте выполнения гистонметилтрансферазу H3K9 и/или H3K27 ингибируют низкомолекулярным соединением или нуклеиновой кислотой или опосредованной CRISPR интерференцией генетической мишени.

[00207] В некоторых вариантах выполнения гистонметилтрансферазу H3K9 и/или H3K27 ингибируют низкомолекулярным ингибитором или ингибитором нуклеиновой кислоты. В одном из вариантов выполнения любого описанного здесь способа, клеток или композиции низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы представляет собой химическое средство, включающее, но не без ограничения, пептиды, пептидомиметики, аминокислоты, аналоги аминокислот, полинуклеотиды, аналоги полинуклеотидов, аптамеры, нуклеотиды, аналоги нуклеотидов, органические или неорганические соединения (т.е. включая гетероорганические и металлоорганические

соединения) с молекулярной массой менее чем приблизительно 10000 граммов на моль, органические или неорганические соединения с молекулярной массой менее чем приблизительно 5000 граммов на моль, органические или неорганические соединения с молекулярной массой менее чем приблизительно 1000 граммов на моль, органические или неорганические соединения, имеющие молекулярную массу менее чем приблизительно 500 граммов на моль, а также соли, сложные эфиры и другие фармацевтически приемлемые формы таких соединений. В некоторых вариантах выполнения низкомолекулярное соединение собой гетероорганическое соединение или металлоорганическое соединение.

[00208] В одном варианте выполнения низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы включает, но без ограничения, AMI-1, A-366, BIX-01294, BIX01338, BRD4770, хетоцин, E72, UNC0224, UNC0631, UNC0638, UNC0642, UNC0646, EPZ5676, EPZ005687, GSK343, EPZ-6438 (E7438), 3-деазанепланоцин А (DZNeP) HCl, UNC1999, MM-102, SGC 0946, энтакапон, EPZ015666, UNC0379, EI1, MI-2 (менин-ингибитор MLL), MI-3 (менин-ингибитор MLL), PFI-2, GSK126 или EPZ004777.

[00209] В одном варианте выполнения низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы выбран из группы, состоящей из UNC0631, BRD4770, UNC1999, CPI-360 и BIX 01294.

[00210] В одном варианте выполнения ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой нуклеиновую кислоту, нацеленную на экспрессию гистонметилтрансферазы. Например, нацеленная на иРНК или первичный транскрипт гистонметилтрансферазы, EZH1 ингибирует тем самым белковую экспрессию фермента. Гистон-лизин-N-метилтрансфераза, также известная как энхансер субъединицы Zeste 1 поликомб-репрессивного комплекса 2 (EZH1) или EC 2.1.1.43, является компонентом неканонического поликомб-репрессивного комплекса-2 (PRC2), который опосредует метилирование гистона H3 (см. MIM 602812) lys27 (H3K27) и поддерживает плюрипотентность и пластичность эмбриональных стволовых клеток. Внешняя идентификация гена EZH1 человека следующая: HGNC: 3526; Entrez Gene: 2145; Ensembl: ENSG00000108799; OMIM: 601674; UniProtKB: Q92800; EMBL: иРНК AB002386 и соответствующая трансляция иРНК: BAA20842.2; GENBANK: иРНК BT009782 и соответствующая трансляция иРНК: AAP88784.1.

[00211] В одном варианте выполнения ингибитор нуклеиновой кислоты нацелен на иРНК EZH1 человека.

[00212] В одном варианте выполнения ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой РНК-интерферирующий ингибитор или ингибитор опосредованной

CRISPR генетической интерференции. РНК-интерферирующий ингибитор может быть разработан с использованием программного обеспечения для прогнозирования РНКи, которое можно найти в Институте Уайтхеда, Массачусетском технологическом институте, на веб-сайте siRNA, на веб-сайте BLOCK-iT™ RNAi Designer at Invitrogen / ThermoFisher, а также в других онлайн-инструментах конструирования киРНК на веб-сайте RNAi, с использованием иРНК EZH1 в качестве мишени.

[00213] Аналогичным образом, направляющая РНК Crisper может быть сконструирована с использованием программного обеспечения CRISPR Broad Institute (MIT) (доступно во всемирной сети, например, на сайте portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgRNA-design), dna20, Clontech, AddGene, e-crisp и на Innovative Genomic, с использованием иРНК или геномного гена EZH1 в качестве мишени.

[00214] CRISPR (группированные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы) Cas9-опосредованное разрушение генов широко используется для создания мутаций с потерей функции у различных организмов, включая млекопитающих (Cong et al., 2013, Science, 339(6121):819-23; рассмотрено в Hsu et al., 2014, Cell, 157(6):1262-78)). Нокаутные скрининги на основе Cas9 применялись для идентификации основных генов и генов, участвующих в лекарственной устойчивости в различных клеточных линиях. В отношении общей информации о системах CRISPR-Cas, их компонентах и доставке таких компонентов, включая методы, материалы, средства доставки, векторы, частицы, AAV, а также их изготовление и применение, в том числе в отношении количеств и составов, полезных для целей настоящего изобретения, см. следующие документы: патенты США №№ 8,999,641, 8,993,233, 8,945,839, 8,932,814, 8,906,616, 8,895,308, 8,889,418, 8,889,356, 8,871,445, 8,865,406, 8,795,965, 8,771,945 и 8,697,359; публикации заявок на выдачу патента США: US 2014-0310830, US 2014-0287938, US 2014-0273234, US 2014-0273232, US 2014-0273231, US 2014-0256046, US 2014-0248702, US 2014-094-094-2704, US 2, US 2, 0242664, US 2014-0234972, US 2014-0227787, US 2014-0189896, US 2014-0186958, US 2014-0186919, US 2014-0186843, US 2014-0179770, US 2014-0179770 и US 2014-4,51790016; европейские патентные публикации EP 2784162 B1 и EP 2771468 B1; европейские заявки на выдачу патента EP 2771468 (EP13818570.7), EP 2764103 (EP13824232.6) и EP 2784162 (EP14170383.5); и международную заявку № WO 2014/093661, все из которых полностью включены в настоящее описание посредством ссылки.

[00215] Система CRISPR/Cas, предусмотренная для использования в контексте настоящего изобретения, может использовать любой подходящий фермент

CRISPR. В некоторых вариантах выполнения фермент CRISPR представляет собой системный фермент CRISPR типа II. В некоторых вариантах выполнения фермент CRISPR представляет собой фермент Cas9. В некоторых вариантах выполнения фермент Cas9 представляет собой Cas9 из *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* или *S. thermophilus*, и он может включать мутантный Cas9, полученный из этих организмов. Фермент может быть гомологом или ортологом Cas9. В некоторых вариантах выполнения фермент CRISPR оптимизирован по кодонам для экспрессии в эукариотической клетке.

[00216] Как описано здесь, система CRISPR/Cas используется для специфического нацеливания на множество последовательностей в интересующей непрерывной геномной области. Нацеливание обычно включает введение в каждую клетку популяции клеток векторной системы из одного или нескольких векторов, содержащих сконструированную не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, содержащую: по меньшей мере один белок Cas и одну или несколько направляющих РНК из библиотеки направляющих РНК, как описано здесь.

[00217] В этих способах белок Cas и одна или несколько направляющих РНК могут находиться на одном или разных векторах системы и интегрироваться в каждую клетку, при этом каждая направляющая последовательность нацелена на последовательность в пределах непрерывной геномной области в каждой клетке в популяция клеток. Белок Cas функционально связан с регуляторным элементом для обеспечения экспрессии в указанной клетке, более конкретно с промотором, подходящим для экспрессии в клетке клеточной популяции. В конкретных вариантах выполнения промотор представляет собой индуцируемый промотор, такой как промотор, индуцируемый доксициклином. При транскрипции в клетках клеточной популяции направляющая РНК, содержащая направляющую последовательность, специфично направляет связывание системы CRISPR-Cas с последовательностью-мишенью к последовательности в непрерывной геномной области. Обычно связывание системы CRISPR-Cas вызывает расщепление непрерывной геномной области белком Cas.

[00218] РНК-интерференция (РНКи), опосредованная короткими интерферирующими РНК (киРНК) или микроРНК (миРНК), представляет собой мощный метод посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. РНКи широко используется для изучения биологических процессов в клетках млекопитающих и может представлять собой терапевтический подход к заболеваниям человека, при которых желательна избирательная модуляция экспрессии генов. В зависимости от степени комплементарности между миРНК и последовательностями иРНК-мишеней потеря экспрессии гена происходит за счет индукции деградации родственной иРНК или за счет

трансляционной аттенуации. Эндогенные миРНК транскрибируются в виде первичных транскриптов и впоследствии процессируются ферментом RNase III Drosha для создания структуры стебель-петля. Ядерный экспорт и расщепление с помощью Dicer генерирует зрелую короткую двухцепочечную молекулу (киРНК), которая разделяется на направляющую и пассажирскую цепи. Направляющая цепь загружается в РНК-индуцированный комплекс молчания (RISC), эффекторный комплекс опосредует расщепление целевых иРНК, и при этом функциональная направляющая цепь связывается с белками RISC, в то время как пассажирская цепь разрушается. Загрузка направляющих и пассажирских цепей в RISC в значительной степени зависит от стабильности 5'-конца киРНК, при этом менее стабильная цепь предпочтительно включается в RISC, хотя точная регуляция в клетках млекопитающих изучена не полностью. 5'-конец направляющей цепи содержит "зародышевую область", которая имеет решающее значение для идентификации мишени. Точное расщепление с помощью Drosha и Dicer имеет решающее значение для генерации направляющих РНК с определенными начальными областями, которые обеспечивают эффективное связывание с соответствующими иРНК-мишенями. Неточный процессинг приводит к связыванию с нецелевыми молекулами, но сдвиг в сайтах расщепления также изменяет нуклеотидный состав концов дуплекса, что может иметь сильное влияние на загрузку цепи в RISC.

[00219] Ингибирование экспрессии выбранных полипептидов-мишеней осуществляется за счет использования РНК-интерферирующих агентов. РНК-интерференция (РНКи) использует дуплексы коротких интерферирующих РНК (киРНК), которые нацелены на информационную РНК, кодирующую полипептид-мишень, для селективной деградции. киРНК-зависимое посттранскрипционное подавление экспрессии генов включает расщепление целевой молекулы информационной РНК в сайте, управляемом киРНК. РНКи представляет собой эволюционно консервативный процесс, при котором экспрессия или введение РНК последовательности, идентичной или очень похожей на целевой ген, приводит к специфической деградции последовательности или специфическому посттранскрипционному сайленсингу генов (PTGS) информационной РНК (иРНК), транскрибируемой с этого целевого гена (см., например, Coburn, G. and Cullen, B. (2002) *J. Virology* 76(18):9225), тем самым ингибируя экспрессию целевого гена. В одном варианте выполнения РНК представляет собой двухцепочечную РНК (дцРНК). Этот процесс описан у растений, беспозвоночных и клеток млекопитающих. В природе РНКи инициируется дцРНК-специфичной эндонуклеазой Dicer, которая способствует процессивному расщеплению длинных дцРНК на двухцепочечные фрагменты, называемые киРНК. киРНК включены в белковый

комплекс (называемый «комплекс индуцированного РНК сайленсинга» или «RISC»), который распознает и расщепляет иРНК-мишени. РНКи также можно инициировать введением молекул нуклеиновых кислот, например, синтетических киРНК или РНК-интерферирующих агентов, для ингибирования или подавления экспрессии генов-мишеней. Используемый здесь термин «ингибирование экспрессии гена-мишени» включает любое снижение экспрессии или активности белка или уровня гена-мишени или белка, кодируемого геном-мишенью, по сравнению с ситуацией, когда РНК-интерференция не индуцируется. Снижение составляет по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или более, по сравнению с экспрессией гена-мишени или активностью или уровнем белка, кодируемого геном-мишенью, который не подвергся воздействию РНК-интерферирующего агента.

[00220] Термины «РНК-интерферирующий агент» и «РНК-интерференция» в том виде, как они используются в данном документе, предназначены для охвата форм подавления активности генов, опосредованного двухцепочечной РНК, независимо от того, содержит ли РНК-интерферирующий агент киРНК, миРНК, кшРНК или другие двойные молекулы. киРНК определяется как РНК-агент, функция которого заключается в ингибировании экспрессии гена-мишени, например, с помощью РНКи. киРНК может быть синтезирована химическим путем, может быть получена путем транскрипции *in vitro* или может быть получена в клетке-хозяине. В одном варианте выполнения киРНК представляет собой молекулу двухцепочечной РНК (дцРНК) длиной от приблизительно 15 до приблизительно 40 нуклеотидов, предпочтительно от приблизительно 15 до приблизительно 28 нуклеотидов, более предпочтительно от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов и более предпочтительно от приблизительно 19 до приблизительно 20 нуклеотидов в длину, и более предпочтительно иметь 21, 22 или 23 нуклеотида в длину, и может содержать 3'- и/или 5'-выступ на каждой цепи, имеющий длину приблизительно в 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов. Длины выступов не зависят друг от друга, т.е. длина выступа на одной цепи не зависит от длины выступа на второй цепи. Предпочтительно киРНК способна способствовать РНК-интерференции посредством деградации или специфического посттранскрипционного сайленсинга генов (PTGS) целевой информационной РНК (иРНК).

[00221] киРНК также включают короткие шпильки (также называемые стержневой петлей) РНК (кшРНК). В одном варианте выполнения эти кшРНК состоят из короткой (например, от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов)

антисмысловой цепи, за которой следует нуклеотидная петля длиной от приблизительно 5 до приблизительно 9 нуклеотидов и аналогичная смысловая цепь. Альтернативно, смысловая цепь может предшествовать структуре нуклеотидной петли, а антисмысловая цепь может следовать за ней. Эти кшРНК могут содержаться в плазидах, ретровирусах и лентивирусах, и экспрессироваться, например, с промотора *pol III U6* или другого промотора (см., например, публикацию Stewart, et al. (2003) *RNA April*; 9(4):493). -501, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки). Целевой ген или последовательность РНК-интерферирующего агента может быть клеточным геном или геномной последовательностью, например последовательностью *G9a/GLP* или *EZH1*. киРНК может быть по существу гомологична гену-мишени или геномной последовательности, или их фрагменту. Используемый в данном контексте термин «гомологичный» определяется как по существу идентичный, достаточно комплементарный или сходный с иРНК-мишенью или ее фрагментом для выполнения РНК-интерференции мишени. Помимо нативных молекул РНК, РНК, подходящие для ингибирования или вмешательства в экспрессию последовательности-мишени, включают производные и аналоги РНК. Предпочтительно, когда киРНК идентична своей мишени. Предпочтительно, когда киРНК нацелена только на одну последовательность. Каждый из РНК-интерферирующих агентов, таких как киРНК, можно подвергать скринингу на потенциальные нецелевые эффекты, например, с помощью профилирования экспрессии. Такие способы известны специалистам в данной области и описаны, например, в Jackson et al. *Nature Biotechnology* 6:635-637, 2003. В дополнение к профилированию экспрессии можно также провести скрининг потенциальных последовательностей-мишеней на наличие сходных последовательностей в базах данных последовательностей, чтобы идентифицировать потенциальные последовательности, которые могут иметь нецелевые эффекты. Например, идентичности 15 или, возможно, всего лишь 11 последовательных нуклеотидов последовательности достаточно для прямого молчания нецелевых транскриптов. Таким образом, можно первоначально провести скрининг предложенных киРНК, чтобы избежать потенциального нецелевого молчания, используя анализ идентичности последовательностей любыми известными способами сравнения последовательностей, такими как BLAST. Последовательности киРНК выбирают так, чтобы максимизировать поглощение антисмысловой (направляющей) цепи киРНК в RISC, и, таким образом, максимизировать способность RISC нацеливаться на иРНК *G9a/GLP* или *EZH1* для деградации. Это может быть достигнуто путем сканирования последовательностей с наименьшей свободной энергией связывания на 5'-конце антисмысловой цепи. Более низкая свободная энергия приводит к усилению

раскручивания 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса киРНК, тем самым гарантируя, что антисмысловая цепь будет поглощена RISC и направит специфичное к последовательности расщепление иРНК G9a/GLP или EZH1 человека. Молекулы киРНК не обязательно должны ограничиваться молекулами, содержащими только РНК, но, например, они дополнительно включают химически модифицированные нуклеотиды и ненуклеотиды, а также включают молекулы, в которых молекула сахара рибозы заменена на другую молекулу сахара или молекулу, которая выполняет аналогичные функции. Кроме того, можно использовать неприродную связь между нуклеотидными остатками, такую как фосфоротиоатную связь. Цепь РНК может быть дериватизирована реакционноспособной функциональной группой репортерной группы, такой как флуорофор. Особенно полезные производные модифицированы на конце или концах цепи РНК, обычно на 3'-конце смысловой цепи. Например, 2'-гидроксил на 3'-конце может быть легко и селективно дериватизирован различными группами. Другие полезные производные РНК включают нуклеотиды, имеющие модифицированные углеводные фрагменты, такие как 2'-О-алкилированные остатки или производные 2'-О-метилрибозила и производные 2'-О-фторрибозила. Основания РНК также могут быть модифицированы. Можно использовать любое модифицированное основание, подходящее для ингибирования или вмешательства в экспрессию последовательности-мишени. Например, могут быть включены галогенированные основания, такие как 5-бромурацил и 5-йодоурацил. Основания также могут быть алкилированы, например, вместо остатка гуанозина может быть введен 7-метилгуанозин. Также могут быть включены неприродные основания, которые обеспечивают успешное ингибирование. Предпочтительные модификации киРНК включают нуклеотиды 2'-дезоксидезокси-2'-фторуридина или закрытой нуклеиновой кислоты (LAN) и дуплексы РНК, содержащие либо фосфодиэфирные, либо различное количество тиофосфатных связей. Такие модификации известны специалистам в данной области и описаны, например, в Braasch et al., *Biochemistry*, 42: 7967-7975, 2003. Большинство полезных модификаций молекул киРНК можно ввести с помощью химических реакций, установленных для антисмысловых олигонуклеотидная технология. Предпочтительно, когда модификации включают минимальную модификацию 2'-О-метила, и также предпочтительно, когда такая модификация исключена. Модификации также предпочтительно исключают модификации свободных 5'-гидроксильных групп киРНК. В приведенных здесь примерах представлены конкретные примеры РНК-интерферирующих агентов, таких как молекулы кшРНК, которые эффективно нацелены на иРНК.

[00222] В одном варианте выполнения нуклеиновая кислота представляет собой G9a/GLP или EZH1-специфический РНК-интерферирующий агент или вектор, кодирующий РНК-интерферирующий агент. В одном варианте выполнения РНК-интерферирующий агент содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из STATCTGGCAGTGCGAGAATG (SEQ ID NO: 11), AGACGTGCAAGCAGGTCTTTC (SEQ ID NO: 12), TGGATGACTTATGCGTGATTT (SEQ ID NO: 13), CAACAGAACTTTATGGTAGAA (SEQ ID NO: 14), CCGCCGTGGTTTGTATTCATT (SEQ ID NO: 15), GCTTCCTCTTCAACCTCAATA (SEQ ID NO: 16), CCGCCGTGGTTTGTATTCATT (SEQ ID NO: 17), GCTCTTCTTTGATTACAGGTA (SEQ ID NO: 18) и GCTACTCGGAAAGGAAACAAA (SEQ ID NO: 19).

[00223] В некоторых вариантах выполнения ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой EZH1-специфическую нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из аптамера, который связывает EZH1, EZH1-специфического РНК-интерферирующего агента и вектора, кодирующего EZH1-специфический РНК-интерферирующий агент, где РНК-интерферирующий агент включает одну или несколько нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 11-19.

[00224] В одном варианте выполнения гемопоэтические клетки-предшественники мультилинии контактируют с вирусным вектором или вектором, несущим молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-19.

[00225] В одном варианте выполнения контактирование с ингибитором гистонметилтрансферазы происходит более одного раза. Например, после первоначального первого контакта многолинейной гемопоэтической клетки-предшественника с вирусом или вектором, несущим молекулу нуклеиновой кислоты, включающую последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-19, или контакта с низкомолекулярным ингибитором как описано здесь, контактирующую клетку промывают для удаления этого вируса или вектора, а затем промытую клетку повторно контактируют с тем же вирусом или вектором, который использовался при первом контакте.

[00226] В настоящем документе предполагается, что система редактирования генома Cas9/CRISPR может применяться со способами, клетками и композициями, описанными здесь. Сгруппированные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы (CRISPR)/CRISPR-ассоциированные (Cas) системы полезны для РНК-

программируемого редактирования генома (см., например, Jinek, M. et al. Science (2012) 337(6096):816-821).

[00227] Транс-активирующая крПНК (тра-крПНК) представляет собой небольшую транскодируемую ПНК. Впервые она была обнаружена у возбудителя *Streptococcus pyogenes* человека. (См. Deltcheva E, et al. (2011). Nature 471 (7340): 602-7). У бактерий и архей CRISPR/Cas (сгруппированные короткие палиндромные повторы с регулярными промежутками/CRISPR-ассоциированные белки) представляют собой ПНК-опосредованную защитную систему, которая защищает от вирусов и плазмид. Этот защитный путь состоит из трех стадий. Сначала копия вторгшейся нуклеиновой кислоты интегрируется в локус CRISPR. Затем с этого локуса CRISPR транскрибируются ПНК CRISPR (крПНК). Затем крПНК включаются в эффекторные комплексы, где крПНК направляет комплекс к вторгшейся нуклеиновой кислоте, а белки Cas разрушают эту нуклеиновую кислоту. (См., например, Terns MP, Terns RM (2011). Curr Opin Microbiol 14 (3): 321-7). Существует несколько путей активации CRISPR, один из которых требует наличия тра-крПНК, играющей роль в созревании крПНК. тра-крПНК комплементарна и образует пары оснований с пре-крПНК, образуя ПНК-дуплекс. Он расщепляется РНКазой III, ПНК-специфичной рибонуклеазой, с образованием гибрида крПНК/тра-крПНК. Этот гибрид действует как направляющий проводник для эндонуклеазы Cas9, которая расщепляет вторгшуюся нуклеиновую кислоту (см., например, Deltcheva E, et al. выше; Jinek M, et al. (2012), Science 337 (6096): 816-21; и Brouns SJ (2012), Science 337 (6096): 808-9).

[00228] В некоторых вариантах выполнения направляющие ПНК системы Cas9/CRISPR предназначены для нацеливания на экзон 3 гена EZH1, который присутствует во всех известных транскриптах EZH1. Последовательность экзона 3 представляет собой

ATTACAGCAAGATGGAAATACCAAATCCCCCTACCTCCAAATGTATCACTTA
CTGGAAAAGAAAAGTGAAATCTGAATACATGCGACTTCGACAACTTAAACGGCTTC
AGGCAAATATGGGTGCAAAG (SEQ ID NO: 20).

[00229] Неограничивающие примеры направляющей (гидовой) ПНК (гПНК), нацеленные на экзон 3, представляют собой

TCGACAACTTAAACGGCTTC (SEQ ID NO: 21), TGCGACTTCGACAACTTAAA
(SEQ ID NO: 22), CCTCCAAATGTATCACTTAC (SEQ ID NO: 23),
TAAACGGCTTCAGGCAAATA (SEQ ID NO: 24) AAACGGCTTCAGGCAAATAT (SEQ
ID NO: 25), CATTTGGAGGTAGGGGGATT (SEQ ID NO: 26),
CCAGTAAGTGATACATTTGG (SEQ ID NO: 27), GTGATACATTTGGAGGTAGG (SEQ

ID NO: 28), AAGTGATACATTTGGAGGTA (SEQ ID NO: 29), AGTGATACATTTGGAGGTAG (SEQ ID NO: 30), TTTCCAGTAAGTGATACATT (SEQ ID NO: 31) и TAAGTGATACATTTGGAGGT (SEQ ID NO: 32)

[00230] В других вариантах выполнения направляющие РНК системы Cas9/CRISPR предназначены для нацеливания на экзон 4 гена EZH1, который также присутствует во всех известных транскриптах EZH1. Последовательность экзона 4 представляет собой последовательность
GCTTTGTATGTGGCAAATTTTGCAAAGGTTCAAGAAAAACCCAGATCCTCAATGAA
GAATGGAAGAAGCTTCGTGTCCAACCTGTTTCAGTCAATGAAGCCTGTGAGTGGACA
CCCTTTTCTCAAAAAG (**SEQ ID NO: 33**).

[00231] Неограничивающие примеры направляющих РНК (гРНК), нацеленные на экзон 4, представляют собой GCTTCATTGACTGAACAGGT (**SEQ ID NO: 34**), ACAGGCTTCATTGACTGAAC (**SEQ ID NO: 35**), AGAAAAGGGTGTCCACTCAC (**SEQ ID NO: 36**), TCCATTCTTCATTGAGGATC (**SEQ ID NO: 37**), CCATTCTTCATTGAGGATCT (**SEQ ID NO: 38**), CCCAGATCCTCAATGAAGAA (**SEQ ID NO: 39**), GTATGTGGCAAATTTTGCAA (**SEQ ID NO: 40**) и CAGTCAATGAAGCCTGTGAG (**SEQ ID NO: 41**).

[00232] В одном варианте выполнения используется вектор в качестве транспортного средства для введения любого из описанных здесь ингибиторов нуклеиновых кислот гистонметилтрансферазы в клетки-мишени, выбранные из клеточных популяций, как описано здесь (например, ESC; PSC; iPSC; гемогенный эндотелий; HSC). В одном варианте выполнения вектор используется в качестве транспортного средства для введения любой из описанных здесь нуклеиновых кислот, содержащих описанные ингибиторы нуклеиновых кислот гистонметилтрансферазы, в клетки-мишени, выбранные из клеточных популяций, как описано здесь (например, ESC; PSC; iPSC; гемогенный эндотелий; HSC). Экспрессия ингибитора нуклеиновой кислоты *in vivo* предназначена для деградации иРНК целевой гистонметилтрансферазы, такой как G9a/GLP или EZH1, чтобы снизить и ингибировать экспрессию соответствующей гистонметилтрансферазы, с целью снижения метилирования гистона H3 в трансфицированных клетках и облегчения репрессии экспрессии генов в них.

[00233] В одном варианте выполнения клетка-хозяин представляет собой эмбриональную стволовую клетку, соматическую стволовую клетку, клетку-предшественника, клетку костного мозга, гемопоэтическую стволовую клетку, гемопоэтическую клетку-предшественник, иммунную клетку, такую как Т-клетка или В-клетка, эритроцит, фибробласт, кератиноцит или миелоидную клетку-предшественник. В

одном варианте выполнения клетка-хозяин выделена от субъекта. В одном варианте выполнения клетка-хозяин выделена от субъекта, у которого диагностировано гематологическое заболевание.

[00234] В одном варианте выполнения вектор дополнительно включает промотор вируса, образующего очаг в селезенке, промотор, индуцируемый тетрациклином, индуцируемый доксициклином (Dox), или контрольную область локуса β -глобина и промотор β -глобина. В одном варианте выполнения промотор обеспечивает направленную экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты в нем. Другие примеры промоторов включают, но без ограничения, промотор CMV и промоторы EF1-альфа для различных трансгенов, и промотор U6 для кшРНК, нацеленных на EZH1.

[00235] В одном варианте выполнения вектор представляет собой вирус или невирусный вектор. Неограничивающими примерами вирусных векторов для доставки генов и экспрессии в клетках являются ретровирус, аденовирус (типы 2 и 5), аденоассоциированный вирус (AAV), хелпер-зависимый аденовирусный вектор (HdAd), гибридные аденовирусные векторы, вирус герпеса, вирус оспы, спумавирус человека (HFV) и лентивирус. Типичные векторы, используемые в изобретении, описанном здесь, включают эписомальные векторы, интегрирующие векторы, неинтегрирующие векторы и эксцизируемые векторы.

Дифференцировка T-клеток без стромы

[00236] В некоторых вариантах выполнения способ дифференциации предусматривает дифференциацию полученной популяции CD34+ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3+-T-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3+ T-клеток. Описанный здесь способ представляет собой способ дифференциации T-клеток без стромы. По сравнению с дифференциацией со стромальными клетками, экспрессирующими лиганд Notch, дифференциация без стромы неожиданно приводит к увеличению числа дифференцированных T-клеток, при этом меньшая часть этих T-клеток является врожденно-подобными клетками (см., например, пример 1, Фиг. 1D). Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что описанный здесь протокол без стромы требует начинать с гемогенного эндотелия (HE), а не с iPSC или с предшественников, полученных из HE (например, лимфоидного предшественника).

[00237] В природе гемопоэтические стволовые клетки (HSC) в костном мозге дают мультипотентные клетки-предшественники (MPP) перед дифференциацией в общие миелоидные клетки-предшественники (CMP) и общие лимфоидные клетки-

предшественники (CLP). CLP мигрируют из костного мозга в тимус, где эпителиальные клетки тимуса, которые экспрессируют дельта-подобный лиганд 4 (DLL4), запускают каноническую передачу сигналов Notch 1 в ранних предшественниках тимуса (ETP). Этот сигнал Notch 1 необходим для детерминации линии Т-клеток и, кроме того, необходим на ранних фазах дифференциации тимоцитов до стадии двойного негатива 3 (DN3). Активная передача сигналов Notch на этих ранних стадиях развития Т-клеток ингибирует потенциал других клонов, таких как потенциал В-клеток и миелоидных клеток (включая дендритные клетки (DC)). Во время β -отбора передача сигналов Notch отключается вследствие передачи сигналов пре-Т-клеточного рецептора. Таким образом, последующие стадии развития Т-клеток демонстрируют очень низкие уровни передачи сигналов Notch. Также предполагалось, что Notch влияет на развитие регуляторных Т (T_{Reg}) клеток (в частности, T_{Reg} клеток тимуса). Передача сигналов Notch опосредуется рецептором Notch 2. Путь передачи сигналов Notch высококонсервативен как у позвоночных, так и у беспозвоночных, и он регулирует множество различных решений клеточных судеб. Он важен для формирования паттерна во время развития, такого как нейрогенез, ангиогенез или миогенез, и регулирует развитие Т-клеток и поддержание стволовых клеток. Передача сигналов Notch также участвует в клеточных процессах на протяжении всей взрослой жизни. Передача сигналов через Notch происходит между соседними клетками, и как рецептор, так и его лиганды являются трансмембранными белками. См., например, публикации Schmitt T.M., Zúñiga-Pflücker J.C. (2002) Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 *in vitro*. *Immunity* 17:749-756; Mohtashami M. (2010) Direct Comparison of Dll1- and Dll4-Mediated Notch Activation Levels Shows Differential Lymphomyeloid Lineage Commitment Outcomes. *J Immunol.* 185(2):867-76; Ohishi K et al, которые включены сюда посредством ссылки. Дельта-1 усиливает репопуляционную способность костного мозга и тимуса в отношении CD34⁽⁺⁾ CD38⁽⁻⁾ клеток пуповинной крови человека. *J Clin Invest.* 2002 Oct;110(8):1165-74; и Dallas MH et al. Плотность лиганда Notch Delta1 определяет образование предшественников В- и Т-клеток из гемопоэтических стволовых клеток. *J Exp Med.* 2005 г. 2 May; 201(9): 1361-1366, которые включены сюда посредством ссылки.

Лиганды Notch

[00238] Соответственно, для инициации дифференциации в лимфоидном клоне и детерминации клона Т-клеток гемогенный эндотелий подвергается воздействию лиганда Notch для активации в нем сигнального пути Notch. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что протокол без стромы, описанный здесь, который

предусматривает воздействие лиганда Notch, требуется начинать с гемогенного эндотелия (HE), а не с iPSC или с предшественников, полученных из HE (например, лимфоидного предшественника). Соответственно, в некоторых вариантах выполнения iPSC или предшественники, полученные из HE, не являются исходной популяцией, которая дифференцируется в Т-клетки в присутствии лиганда Notch.

[00239] Лиганды Notch представляют собой однопроводные трансмембранные белки с DSL (Delta, Serrate, LAG-2)-доменом и различным количеством EGF-подобных повторов. Существует два класса канонических лигандов Notch: Delta/Delta-подобные и класс Serrate/Jagged. Последний имеет дополнительный домен богатых цистеином повторов, близких к трансмембранному домену. У млекопитающих существует 5 канонических лигандов Notch: Jagged-1, Jagged-2, DLL1, DLL3 и DLL4. Они могут связываться с четырьмя Notch-рецепторами Notch 1-4. DLL1, также известный как лиганд Notch Delta, Delta-подобный 1, представляет собой белок, взаимодействующий с рецептором NOTCH2. См., например, Shimizu K, et al., 2001, J. Biol. Chem. 276 (28): 25753–8; Blaumueller CM, et al., 1997, Cell 90 (2): 281–91; Shimizu K, et al., 2000, Mol. Cell. Biol. 20 (18): 6913–22. DLL1 представляет собой белок, который у человека кодируется геном *DLL1*. DLL1 является человеческим гомологом лиганда Notch Delta.

[00240] В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch выбран из группы, состоящей из дельта-подобного-1 (Delta-like-1, DLL1, также называемого DL1), дельта-подобного-4 (Delta-like-4, DLL4, также называемого DL4), иммобилизованного Delta1ext-IgG и иммобилизованного Delta4ext-IgG. В некоторых вариантах выполнения иммобилизованный Delta1ext-IgG состоит из внеклеточного домена Delta-like-1 человека, слитого с доменом Fc IgG1 человека. «Иммобилизованный Delta1ext-IgG» относится к рекомбинантному лиганду Notch, полученному путем слияния внеклеточного домена Delta-like 1 с доменом Fc IgG1 человека (см., например, SEQ ID NO: 42). Это синтетический способ получения титруемой дозы лиганда NOTCH. См., например, публикацию Varnum-Finney et al., J Cell Sci. 2000 Dec; 113 Pt 23:4313-8, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Рекомбинантные лиганды Notch и гибриды Fc коммерчески доступны в AdipoGen™. «Иммобилизованный Delta4ext-IgG» относится к рекомбинантному лиганду Notch, полученному путем слияния внеклеточного домена Delta-like 4 с доменом Fc IgG1 человека (см., например, SEQ ID NO: 43).

[00241] В некоторых вариантах выполнения домен IgG Delta1ext-IgG или Delta4ext-IgG может содержать любой известный в данной области домен IgG. В некоторых вариантах выполнения Delta1ext-IgG или Delta4ext-IgG можно иммобилизовать

на твердой подложке (например, на планшете/чашке для тканевых культур) путем покрытия твердой подложки композицией, которая связывает Fc IgG, включающей, помимо прочего, антитело против IgG человека, белок G или белок A.

[00242] В некоторых вариантах выполнения последовательность нуклеиновой кислоты лиганда Notch (например, DLL1) включает SEQ ID NO: 1-3 или последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1-3, сохраняя те же функции, что и SEQ ID NO: 1-3 (например, связывание и/или активация рецептора Notch).

[00243] **SEQ ID NO: 1**, DLL1 дельта-подобный канонический лиганд Notch 1 [Homo sapiens (человек)], ID гена: 28514, ссылочная последовательность NCBI: NG_027940.1, 8873 п.н.

```
actgaccatttggcgatccattgagaggagggtttggaaaagtggctccttgtgacagctctcgccagattggggggctgctgat
ttgcatctcattagccatgcggggcgccggctgaatataaggcgccagggcgccggcgagagccagatcctctgcgcgacccgcgga
gacccgacccggccgagggcagagcgcaggggaacccgggcagccgcggcgagagcctctccacggcccgccctccggctc
ctgcgcgtgtgtactggatggcattggctggattcatcgaaagacgcggatcttctgtgacaccggagatcggagcccgagtgctcc
cggaacgaccgcccgcggcagtgacaccgggcccgcgatccgcagggggcgccgcgcacacccgcccgcggccgaccgtccctca
gcgcgcggcgtggccccgattatcgcttggcgtgggatttccagaccgcggttttctaatcggtcgggaggaagctctgcagctct
cttgggaattaagctcaatctctggactctctcttcttcttccccctccctctctgcgaagaagctcaagacaaaaccaggaagccggc
gacctcacctcctcgggggctgggaggaaggaggaacgaaagtcgccgcccgcgctgtccccgagagctgccttctcggg
catccctggggctgccgcgggacctcgagggcggaataaagaaccgcgccctgggaagaggcgagaccggcttttaagaaaga
agtctgggtcctgcggtctggggcgaggcaaggcgcttttctgccacgctccccgtggcccatcgatccccgcgctccgcccgtg
ttctaaggagagaagtgggggccccccaggctcgcgcgtggagcgaagcagcatgggcagtcggtgcgcgctggccctggcggtgct
ctcggccttgcgtgtcaggtaggcgggcaggtggggcgcccgccggccccgcggggtctcacgggtagccggggcgccggggcagga
gcgcgcgggggagggcgagacagcgccacgggcccgcagccacggccccgaagatgaatccggggggcgacgacccagcgc
cggccgtgcagcgagcgcgctcgccctgagcccttcaggctctccgcacacccccaccaggcctcacgcccctagctcgggc
gggacccgcgtcctcacgccccccgctccccctgcaggtctggagctctggggtgttcgaactgaagctgcaggagttcgtcaacaag
aaggggctgctggggaaccgcaactgctgccgcggggcgccggggccaccgccgtgcgcctgccggaccttctccgctgtgcctca
agcactaccaggccagcgtgtccccgagccgcccgtcacctacggcagcgccgtcacccccgtgctgggcgtcactccttcagtctgc
ccgacggcgggggcccgcgactccgcgttcagcaacccatccgcttcccccttcggcttcacctggccggtagtgccgcacctgcgcgc
gccggggccggccctgaagctggggcgggctgcaggacgcgctgggatccgccttgggcgctcggtggcgggacctcggggaccccg
cgaggcgaggtgggcgctgcgatctgcctagcggcgggccccaggactccagcccagcagcgcgagacacctgccccggggccccg
cggcctgcaggaggggaccgcgctggggcgaggaggagaggccgagcgcgcccgggagatttccgtatccggcctctgtgccaggtc
```


agtttaaaaagagttggcacaggaaatgatagtatatgttcaatggttctcaaatgttgccatcatcctagaatcactcaggagtgattttgagat
 gctgacactggtgctgccctaacaccaagaagccagaacctctggtggggcccaggcccaggctgcagctccaaggtgaccagtg
 tctgctaactctggagaaccagaggctcactggtgctgcgggaagatggtttctagggtgagaatgtccactgcaaagccagcaacagtcaa
 cgtccatctgagtccttctgcttttctccaaggtgcagagtgggctggcaggggcgggtactgtgacgagtgatccgctatccaggctgtctcc
 atggcacctgccagcagccctggcagtgcaactgccagggaaggctgggggggcttttctgcaaccagggtaaagccttctctccctgagg
 cagcctgctccctccagagcagccctggacttccctggctgtttgatcactggaaaaataaagtcttctgcatittgatgtcagcttctatct
 cctacttttctgtccccacccttcacagacctgaactactgcacacaccataagccctgcaagaatggagccacctgcaccaacacggggc
 aggggagctacactgtcttctccggcctgggtacacagggtgccacctgcgagctggggattgacgagtgtagcccccagccctgtaaga
 acggaggagctgcacggtgagtcggaggctccatggcatctcaccggaaagctgggggtgccctggtgtgaatggagtggtgggctc
 ctggagcaactttgaaagcctttctgacctctccatcgtgtaggatctcgagaacagctactcctgtacctgcccacccggcttctacggc
 aaaatctgtgaattgagtgccatgacctgtgcggacggcccttctttaacgggggtcggtgctcagacagccccgatggagggtacagct
 gccgtgccccgtgggctactccggcttcaactgtgagaagaaaattgactactgcagctcttcacctgttctaattgtaagggggcagct
 ggtgattgctcagagactcgggcgagcggtaatactgaggtggcattaaaaacaagcatttgtgagtgacctcagtttatgaatcacttta
 tccagaccgccagggaattctcgtatggaaactctatctttgagcttgaaaggcctgggggaatgagagaggccagggcatttgttatgaagt
 ctctgtggaaacctagaccaagcagtgaatgacttgcaggggccacaagggtgcttcgggcacctgcggccgctgagggtcagtaagtga
 tggccacaggtgccggccactccagcttgggaggatggcccagctgtgtggccaccagcacagtagttgggggtgtccctgagtgagg
 acagagagcctcctgctagcagcgggggctggctgccccaaaggagacacagcaaggagagctgggccccagatgtgccggagc
 attccggaatggtcatcttccccctccctccctccctgttgcagtgcctgctcctctcacttgcgtgtgtaactgtgggcaaggacacctcgt
 aagcctcagtttccccatctgaaacctgggtcgagtgccacatgcttgcgggctgtgtggcgactaatgcagccaccagagtggttctgc
 acagcgctgtccagatgttgccgtgtggtttctgactttagagcttagacctggacacctctcgtatttgaggtcctaaacctgtcacctt
 gcgctgtggactcattcaggccacagactgtctttggtttgtctggtttctacagtgtcagacagatagatgcttcagagtgaacttttgggaac
 aaacctacgaggagacacgtgatgttcatgtccctgtgttcagggtgccaagtgtgtggacctcgggtgatgcctacctgtgccgtgccagg
 ccggcttctcggggaggcactgtgacgacaacgtggacgactgcgcctcctccccgtgcgccaacggggggcacctgccgggatggcgt
 gaacgacttctcctgcacctgcccgcctggctacacgggcaggaaactgcagtgccccgtcagcaggtgcgagcacgcacctgccaca
 atggggccacctgccacgagagggggccaccgctatgtgtgcgagtggtgcccagggtacgggggtcccaactgccagttcctgtcccc
 gagctgccccggggccagcgggtggtagacctactgagaagctagagggccaggcggggccattccctgggtggccgtgtgcgcc
 ggggtcatccttgcctcatgctgctgctgggtgtgccgtgtggtggtctgcgtccggctgaggctgcagaagcaccggccccagccg
 acccctgccggggggagacggagacctgaacaacctggccaactgccagcgtgagaaggacatctcagtcagcatcatcggggccac
 gcagatcaagaacaccaacaagaaggcggactccacggggaccacagcgccgacaagaatggcttcaaggccccgtaccagcgggt
 ggactataacctcgtgcaggacctcaagggtgacgacaccgccgtcaggggacgcgcacagcaagcgtgacaccaagtgccagcccca
 gggctcctcaggggaggagaaggggaccccgaccacactcaggggggtcgtgctgcggggccgggcatcaggaggggggtacctggg
 ggggtgttcttctggaacctgtctccgtttcttcccaaatgttctcatgattcattgtggattttcttatttcttttagtggagaagcatctga
 aagaaaaaggccggactcgggctgttcaacttcaaaagacaccaagtaccagtcgggtgtacgtcatatccaggagaaggatgagtgctg
 catagcaactgaggtcagtgacggcagcagccgctcctcctcctcggcatgggagcacctgaagctggagcacgggaatcggtctcag
 gctaacttccatttgtctgtggccccccagggtgtaaaatggaaagtgagatggcaagactcccgttctttaaataagtaaaattccaagga

tatatgccccaacgaatgctgctgaagaggaggaggcctcgtggactgctgctgagaaaccgagttcagaccgagcaggttctcctcctg
 aggtcctcgacgcctgccgacagcctgtcgcgcccgccgctgcggcactgccttccgtgacgtcgccgttgactatggacagtgtct
 cttgaagagaatatatttaaattgggtgaactgaattacgcataagaagcatgcactgcctgagtgatattttggattcttatgagccagctttt
 ctgaattagaaacacaaacactgcctttattgtcctttttgatacgaagatgtgcttttctagatggaaaagatgtgtgtattttttggatttgtaa
 aaatattttcatgatatctgtaaagcttgagtattttgtgatgttcgtttttataatttaaattttggtaaatatgtacaaaggcacttcgggtctatgt
 gactataattttttgtatataaatgtatttatggaatattgtgcaaatgttatttgagtttttactgtttgttaatgaagaaattccttttaaaatattttc
 caaaataaattttatgaatgacaa

SEQ ID NO: 2 Homo sapiens дельта-подобный канонический лиганд Notch 1 (DLL1), иРНК, ссылочная последовательность NCBI: NM_005618.4, 3779 п.н.

actgaccatttggcgatccattgagaggagggttggaaaagtggctccttgtgacagctctcgccagattggggggctgctgat
 ttgcatctcattagccatgcggggcgccgctgaatataaggcgccgagcgccggcgagagccagatcctctgcgcgaccccgcca
 gaccgacccggccgaggcgagcgcgaggggaacccggcgagccgcggcgagagcctcctccacggcccgccctccggtc
 ctgcgcgtgtgtactggatggcattggctggattcatcggaagacgcggatctttgctgtgacaccggagatcgagcccgagtgctcc
 cggaacgaccgcccgcgagtgacaccggcgccgatccgagggggcgccgcgacacccgcccgcgaccgtccctca
 gcgcgcgcccgtggcccggtattatgccttgcctgtgggatttccagaccgcggttctaatacggtcgggaggaagctctgcagctct
 ctgggaattaagctcaatctctggactctctcttctcttctccccctcctctcctgcgaagaagctcaagacaaaaccaggaagccggc
 gacctcacctcctcgggggctgggaggaaggaggaaaacgaaagtcgcccgcgcccgcgtgtccccgagagctgccttctcggg
 catcctggggctgccgcccgcagggcggaataaagaaccgcccgttgggaagaggcgagaccggcttttaagaaaga
 agtctgggtcctgcggtctggggcgaggaaggcgcttttctgccacgctccccgtggcccatcgatccccgcgcgtccgcgctg
 tttaaggagagaagtgggggccccaggctcgcgcgtggagcgaagcagcatgggcagtcggtgcgcgtggccctggcggtgct
 ctcgcccttgcgtgtgtaggtctggagctctgggggtgttcgaactgaagctgcaggagttcgtcaacaagaaggggctgctggggaaccg
 caactgctgccgccccgcgccccccaccgcccgtgcgcctgccggaccttcttccgcgtgtgcctcaagcactaccagccagcgtgt
 cccccgagccgcccgcacctacggcagcgcggtcacccccgtgctggcgctgactccttcagtctgcccagcggcgggggcgccga
 ctccgcgttcagcaaccccatccgcttccccctcggttcacctggccgggcaccttctctgattattgaagctctccacagattctctg
 atgacctcgcaacagaaaaccagaaagactcatcagccgctggccaccagaggcacctgacggtggcgaggagtggtcccagg
 acctgcacagcagcgccgcacggacctcaagtactcctaccgcttctgtgtgacgaacactactacggagaggggctgctccgtttctg
 ccgtccccgggacgatgccttcggccacttcacctgtggggagcgtggggagaaaagtgtgcaacctggctggaaagggccctactgca
 cagagccgatctgcctgcctggatgtgatgagcagcatggattttgtgacaaaccaggggaatgcaagtgcagagtgggctggcagggc
 cggtagctgacgagtgatccgctatccaggctgtctccatggcacctgccagcagccctggcagtgcaactgccaggaaggctggggg
 ggccttttctgcaaccaggacctgaactactgcacacaccataagccctgcaagaatggagccacctgcaccaacacggggccaggggag
 ctacattgctcttgcggcctgggtacacaggtgccacctgcgagctggggattgacgagtgtagccccagcccttgaagaacggagg
 gagctgcacggatctcgagaacagctactcctgtacctgcccacccggcttctacggcaaaatctgtgaattgagtgccatgacctgtgcgg
 acggcccttgctttaacgggggtcggtgctcagacagccccgatggagggtacagctgccgctgccccgtgggctactccggcttcaact
 gtgagaagaaaattgactactgcagctcttcacctgttctaattggtgccaagtgtgtggacctcggtgatgcctacctgtccgctgccagg
 ccggcttctcggggaggcactgtgacgacaacgtggacgactgcgcctcctccccgtgcgcaacggggggcacctgccgggatggcgt

gaacgacttctcctgcacctgccccgctggctacacgggcaggaactgcagtgccccgcgtcagcaggtgcgagacgcacacctgccaca
atggggccacctgccacgagagggggccaccgctatgtgtgcgagtgtgcccaggctacgggggtcccaactgccagttcctgtcccc
gagctgccccggggccagcgggtggtggacctactgagaagctagagggccaggggccattccccctgggtggccgtgtgcgcc
gggggtcatccttctcctcatgctgctgctgggctgtgccgctgtggtggtctgcgtccggctgaggctgcagaagcaccggccccagccg
accctgccggggggagacggagaccatgaacaacctggccaactgccagcgtgagaaggacatctcagtcagcatcatcggggccac
gcagatcaagaacaccaacaagaaggcggacttccacggggaccacagcggcgacaagaatggcttcaaggcccgctaccagcgggt
ggactataacctcgtgcaggacctcaaggggtgacgacaccggcgtcagggacgcgcacagcaagcgtgacaccaagtgccagcccca
gggctcctcaggggaggagaaggggaccccgaccacactcaggggtggagaagcatctgaaagaaaaaggccggactcgggctgttc
aactcaaaagacaccaagtaccagtcgggtgtacgtcatatccgaggagaaggatgagtgcgtcatagcaactgaggtgtaaaatggaagt
gagatggcaagactcccgtttctcttaaataagtaaaattccaaggatatatgccccaacgaatgctgctgaaaggaggaggcctcgtg
gactgctgctgagaaaccgagttcagaccgagcaggttctcctcctgaggtcctcgacgcctgccgacgcctgtcgcggcccgccgcc
tgcggcactgccttccgtgacgtcgccgttgactatggacagttgctcttaagagaatatattttaaatgggtgaactgaattacgcataaga
agcatgcactgcctgagtgtatatttggattcttatgagccagtcctttctgaattagaaacacaaactgcctttattgtccttttgatacga
gatgtgcttttctagatggaaaagatgtgtgtatttttggatttgaataatattttcatgatatctgtaaagcttgagtattttgtgatgttcgtttt
tataatttaaatttggtaaatatgtacaaaggcacttcgggtctatgtgactatatttttgtatataaatgtatttatggaatattgtgcaaatgttat
ttgagtttttactgttttgtaataagaaattcccttttaaaatattttccaaaataaattttatgaatgacaa

[00244] SEQ ID NO: 3 Homo sapiens Дельта-подобный канонический лиганд Notch 1 (DLL1) Homo sapiens, CDS иПНК, ссылочная последовательность NCBI: NM 005618.4, 2172 п.н.

atgggcagtcggtgcgcgtggccctggcgggtgctctcggccttgctgtgcaggtctggagctctgggggtgttcgaactgaag
ctgcaggagttcgtcaacaagaaggggctgctggggaaccgcaactgctgccgcgggggcgcgggggccaccgccgtgcgcctgccg
gaccttctccgcgtgtgcctcaagcactaccaggccagcgtgtccccgagccgccctgcacctacggcagcgcgcgtcacccccgtgct
gggcgtcgactcctcagctgtcccgcacggcgggggcccgcactccgcgttcagcaaccccatccgcttcccccttcggcttcacctggcc
gggcaccttctctctgattattgaagctctccacacagattctcctgatgacctcgcaacagaaaaccagaaaagactcatcagccgcctggc
caccagaggcacctgacgggtggcgaggagtggtcccaggacctgcacagcagcggccgcacggacctcaagtactcctaccgcttc
gtgtgtgacgaactactacggagagggctgctccgtttctgccgtccccgggacgatgccttcggccacttcacctgtggggagcgtg
gggagaaaagtgtgcaacctggctggaaagggccctactgcacagagccgatctgcctgcctggatgtgatgagcagcatggattttgtg
acaaaccaggggaatgcaagtgcagagtgggctggcagggccggtactgtgacgagtgatccgctatccaggctgtctccatggcacct
gccagcagccctggcagtgcaactgccaggaaggctgggggggcccctttctgcaaccaggacctgaactactgcacacaccataagccc
tgcaagaatggagccacctgcaccaacacggggccaggggagctacacttgctcttgccggcctgggtacacagggtgccacctgcgagct
ggggattgacgagtgtagccccagcccttgaagaacggaggggagctgcacggatctcgagaacagctactcctgtacctgcccacccg
gtcttctacggcaaaatctgtgaattgagtcccatgacctgtgcggacggcccttgctttaacggggggtcggtgctcagacagccccgatgg
agggtagagctgccgctgccccgtgggctactccggcttcaactgtgagaagaaaattgactactgcagctcttcaccctgttctaattgtg
caagtgtgtggacctcgggtgatgcctacctgtgccgctgccaggccggcttctcggggaggcactgtgacgacaacgtggacgactgcgc
ctctccccgtgcgccaacggggggcacctgccgggatggcgtaacgacttctcctgcacctgcccgcctggctacacgggcagggaact

gcagtgcacccctcagcaggtgcgagcacgcacccctgccacaatggggccacctgccacgagagggggccaccgctatgtgtgcgagtgtgcccagggtacgggggtcccaactgccagttctgtctcccgagctgccccggggccagcggtggtggacctcactgagaagctagaggggcagggcgggccattcccctgggtggccgtgtgcgccgggggtcatcctgtctcatgtctgtctgtgggctgtgccgctgtggtggtctgcgtccggctgaggctgcagaagcaccggccccccagccgacccctgccggggggagacggagaccatgaacaacctggccaactgccagcgtgagaaggacatctcagtcagcatcatcgggggccacgcagatcaagaacaccaacaagaaggcggtactccacggggaccacagcgccgacaagaatggcttcaaggcccgctaccagcggtggactataacctcgtgcaggacctcaagggtgacgacaccgccgtcaggacgcgcacagcaagcgtgacaccaagtgccagccccagggctcctcaggggaggagaaggggaccccgaccacactcaggggtggagaagcatctgaaagaaaaaggccggactcgggctgttcaactcaaaagacaccaagtaccagtcggtgtacgtcatatccgaggagaaggatgagtgcgctcatagcaactgaggtgtaa

[00245] В некоторых вариантах выполнения аминокислотная последовательность лиганда Notch (например, DLL1) включает SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, сохраняя те же функции, что и SEQ ID NO: 4 (например, связывание и/или активация рецептора Notch).

[00246] SEQ ID NO: 4 предшественник дельта-подобного белка 1 [Homo sapiens], ссылочная последовательность NCBI: NP_005609.3, 723 аминокислот

MGSRCALALAVLSALLCQVWSSGVFELKLQEFVNKKGLLGNRNCCRGGAGPPP
CACRTFFRVCLKHYQASVSPEPPCTYGSVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFSNPIRFPFG
FTWPGTFSLIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGEEWSQDLHSSGRTDLKYS
YRFVCDEHYYGEGCSVFCRPRDDAFGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPICLPGCDE
QHGFCDKPGECKCRVGWQGRYCDECIRYPGCLHGTCQQPWQCNCQEGWGGLFCNQD
LNYCTHHKPKNGATCTNTGQGSYTCSRPGYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSCDTLE
NSYSCTCPPGFYGKICELSAMTCADGPCFNNGGRCSDSPDGGYSCRCPVGYSGFNCEKKI
DYCSSSPCSNGAKCVDLGDAYLCRCQAGFSGRHCDDNVDDCASSPCANGGTCRDGVN
DFSCTCPPGYTGRNCSAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQFLLP
ELPPGPAVVDLTEKLEGQGGPFPPWVAVCAGVILVLMLLGCAAVVVCVRLRLQKHRPP
ADPCRGETETMNNLANCQREKDISVSIIGATQIKNTNKKADFHGDHSADKNGFKARYPA
VDYNLVQDLKGDDTAVRDAHSKRDTKCQPQGGSSGEEKGTPPTTLRGGEASERKRPDSGC
STSKDTKYQSVYVISEEKDECVIATEV

[00247] В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch (например, Delta1ext-IgG) содержит внеклеточный домен DLL1 человека, который приблизительно соответствует аминокислотам 1-536, или аминокислотам 22-544, или аминокислотам 22-

537 DLL1 (см. например, SEQ ID NO: 4 для полноразмерной последовательности DLL1). В некоторых вариантах выполнения внеклеточный домен DLL1 человека включает SEQ ID NO: 5 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны последовательности SEQ ID NO: 5, сохраняя ту же функционирует как SEQ ID NO: 5 (например, связывание и/или активация рецептора Notch).

[00248] SEQ ID NO: 5, внеклеточный домен DLL1 человека, 536 аминокислот

MGSRCALALAVLSALLCQVWSSGVFELKLQEFVNKKGLLGNRNCCRGGAGPPP
CACRTFFRVCLKHYQASVSPEPPCTYGSVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFSNPIRFPFG
FTWPGTFSLIIEALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGEEWSQDLHSSGRTDLKYS
YRFVCDEHYHYYGEGCSVFCRPRDDAFGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPICLPGCDE
QHGFCDKPGECKCRVGWQGRYCDECIRYPGCLHGTCQQPWQCNCQEGWGGFLFCNQD
LNYCTHHKPCCKNGATCTNTGQGSYTCSRPGYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSCTDLE
NSYSCTCPPGFYGGKICELSAMTCADGPCFNNGGRCSDSPDGGYSCRCVPYSGFNCEKKI
DYCSSSPCSNGAKCVDLGDAYLCRCQAGFSGRHCDDNVDDCASSPCANGGTCTRDGVN
DFSCTCPPGYTGRNCSAPVSRCEHAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQFLLP
ELPPGPAVVDLTEKL

[00249] В некоторых вариантах выполнения последовательность нуклеиновой кислоты лиганда Notch (например, DLL4) включает SEQ ID NO: 6-9 или последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 6-9, сохраняя те же функции, что и SEQ ID NO: 6-9 (например, связывание и/или активация рецептора Notch).

[00250] SEQ ID NO: 6, DLL4-дельта-подобный канонический лиганд Notch 4 [Homo sapiens (человек)], ID гена: 54567, ссылочная последовательность NCBI: NG_046974.1, 9734 п.н.

agtagcggcgctgcgcgaggccgggaacacgaggccaagagccgcagccccagccgccttggtgcagcgtagcaccggc
actagcccgcttgagccccaggattagacagaagacgcgtcctcggcgcggtcgccgcccagccgtagtcacctggattacctacgc
ggcagctgcagcggagccagcgagaaggccaaaggggagcagcgtcccagaggagcgcctcttttcagggacccccggcgctggc

[00251] SEQ ID NO: 7, дельта-подобный канонический лиганд Notch 4 (DLL4) Homo sapiens, иPHK, ссылочная последовательность NCBI: NM_019074.4, 3426 п.н.

agtagcggcgctgcgcgcaggccgggaacacgaggccaagagccgcagccccagccgccttggtgcagcgtaacacggc
actagcccgttgagccccaggattagacagaagacgcgtcctcggcgcggtcgccgccagccgtagtcacctggattacctacagc
ggcagctgcagcggagccagcgagaaggccaaaggggagcagcgtcccagaggagcgcctctttcagggaacccgcccggctggc
ggacgcgcgggaaagcggcgctgcgaacagagccagattgagggcccgcgggtggagagagcgacgcccaggggatggcggca
gcgtcccgagcgcctctggctggcgctactgctgctggtggcactttggcagcagcgcgcggccggctccggcgcttccagctgca
gctgcaggagttcatcaacgagcgcggcgctactggccagtggcgggccttgcgagcccggctgccggactttctccgcgtctgccttaa
gcacttcaggcggctgctcgcgggaccctgcacctcgggaccgtctccacgccggtattgggaccaactccttcgctgtccgggac
gacagtagcggcgggggcgcaacctctccaactgcccttcaatttcacctggccgggtacctctcgtcatcatcgaagcttggcacg
cgccaggagacgacctgcggccagaggccttgccaccagatgcactcatcagcaagatcgccatccagggtccctagctgtgggtcag
aactggttattggatgagcaaaccagcacctcacaaggctgcgctactctaccgggtcatctgcagtgacaactactatggagacaactg
ctcccgctgtgcaagaagcgcaatgaccacttcggccactatgtgtgccagccagatggcaactgtcctgcctgcccgggttgactggg
gaattattgcaacagcctatctgtcttcgggctgtcatgaacagaatggctactgcagcaagccagcagagtgctctgccgccaggctg
gcagggccggctgtgtaacgaatgcacccccacaatggctgtgccacggcacctgcagcactccctggcaatgtacttgtatgaggg
ctggggaggcctgtttgtgaccaagatctcaactactgcacccaccactccccatgcaagaatggggcaacgtgctccaacagtgggcag
cgaagctacacctgcacctgtcgccaggtacactggtgtggactgtgagctggagctcagcgagtgtgacagcaacctgtcgcaat
ggaggcagctgtaaggaccaggaggatggctaccactgcctgtgtcctccgggtactatggcctgcattgtgaacagcaccttgagct
gcgcgactccccctgcttcaatgggggctcctgccgggagcgcaaccagggggccaactatgcttgtaatgtcccccaacttcaccg
gctccaactgcgagaagaaagtggacaggtgcaccagcaacctgtgccaacgggggacagtgcctgaaccgaggtccaagccgcat
gtgccgtgccgtcctggattcacgggcacctactgtgaactccacgtcagcgactgtgccgtaaccttgcgccacgggtggcacttgc
catgacctggagaatgggctcatgtgcacctgccctgccggcttctctggccgacgctgtgaggtgcggacatccatgatgcctgtgctc
gagtcctgtctcaacagggccacctgtacaccgacctctccacagacacctttgtgtgcaactgcccttatggctttgtgggcagccgtg
cgagttccccgtgggcttgcgccagcttccccctgggtggcgctcgtcgtgggtgtggggctggcagtgctgctggtactgtgggcatg
gtggcagtggtgtgcggcagctgcggcttcgacggccggacgacggcagcaggggaagccatgaacaactgtcggacttccagaagg
acaacctgattcctgccgccagcttaaaaacacaaaccagaagaaggagctggaagtggactgtggcctggacaagtccaactgtggca
aacagcaaaaccacacattggactataatctggccccagggcccctggggcgggggaccatgccaggaaagtccccacagtgacaag
agcttaggagagaaggcgccactgcggttacacagtgaagagccagagtgtcggatatcagcgatatgctccccagggactccatgtac
cagttctgtgtgttgatatcagaggagaggaatgaatgtgtcattgccacggaggtataaggcaggagcctacctggacatccctgctcagc
cccgcggtggaccttcttctgattgtttacattgcatcctggatgggacgttttcatatgcaacgtgctgctctcaggaggaggaggaa
tggcaggaaccggacagactgtgaacttgccaagagatgcaataccctccacacctttgggtgtctgtctggcatcagattggcagctgca
ccaaccagaggaacagaagagaagagagatgccactgggactgccctgccagtagtgcccttcagggggctccttcggggctccgg
cctgtttccagagagagtggcagtagccccatggggcccgagctgctgtggcctccactggcatccgtgtttccaaaagtgcctttggcc
caggctccacggcgacagttggggcccaatcagaaaggagagagggggccaatgagggcagggcctcctgtgggctggaaaaccact

gggtgcgtctcttgctgggggtttgccctggaggtgaggtgagtgctcagaggaggggagtgtttctgccccatgcctccaactactgtatg
caggcctggctctctggcttaggccctttgggaagaatgtcgtctacccggcttccaccacctctggccctgggcttctgtaagcagaca
ggcagagggcctgccccctccaccagccaaggggtgccaggcctaactggggcactcagggcagtggtgttgaaattccactgaggggg
aaatcaggtgctgcggccgctgggccctttcctccctcaagcccatctccacaacctcagacctgggctctggtccactactgccccagac
caccctcaaagctggctcttcagaaatcaataatatgagttttattttgtttttttttttttgtagttattttggagtctagtattcaataatttaaga
atcagaagcactgacctttctacattttataacattttgtatataatgtgtatttataatatgaacagatgtgtacagga

[00252] SEQ ID NO: 8, дельта-подобный канонический лиганд Notch 4 (DLL4) Homo sapiens, CDS иРНК, ссылочная последовательность NCBI: NM_019074.4, 2058 п.н.

atggcggcagcgtccggagcgctctggtctgggcgctactgctgctggtggcactttggcagcagcgcgcgccggctccg
gcgtcttccagctgcagctgcaggagttcatcaacgagcgcgccgctactggccagtgggcggccttgcgagcccggctgccggactttct
tccgcgtctgccttaagcacttccaggcggtcgtctcgccggaccctgcaccttggggaccgtctccacgccgggtattgggcaccaactcc
ttcgctgtccgggacgacagtagcggcgggggggcgcaacctctccaactgcccttcaatttcacctggccgggtaccttctcgtcatcat
cgaagcttggcacgcgccaggagacgacctgcggccagaggccttggcaccagatgcactcatcagcaagatcgccatccagggtcc
ctagctgtgggtcagaactggtattggatgagcaaaccagcacctcacaaggctgcgctactcttaccgggtcatctgcagtacaacta
ctatggagacaactgctcccgctgtgcaagaagcgcaatgaccacttcggccactatgtgtgccagccagatggcaacttgtcctgctgc
ccggttggactggggaatattgccaacagcctatctgtcttccgggctgtcatgaacagaatggctactgcagcaagccagcagagtgcctc
tgccgccagggctggcagggccggctgtgtaacgaatgcacccccacaatggctgtgccacggcacctgcagcactccctggcaatgt
acttgtgatgagggctggggaggcctgtttgtgaccaagatctcaactactgcaccaccactccccatgcaagaatggggcaacgtgctc
caacagtgggcagcgaagctacacctgcacctgtcgccaggctacactggtgtggactgtgagctggagctcagcgagtgtgacagca
acccctgtcgcaatggaggcagctgtaaggaccaggaggatggctaccactgcctgtgtcctccgggctactatggcctgcattgtgaaca
cagcaccttgagctgcgccgactccccctgcttcaatgggggctcctgccgggagcgcaaccagggggccaactatgcttgtgaatgtcc
ccccaacttcaccggctccaactgcgagaagaaagtggacaggtgcaccagcaacccctgtgccaacggggggacagtgcctgaaccga
ggtccaagccgcatgtgccgctgccgtcctggattcacgggcacctactgtgaactccacgtcagcgactgtgcccgtaaccccttgcgccc
acggtggcacttgccatgacctggagaatgggctcatgtgcacctgccctgccggcttctctggccgacgctgtgaggtgcggacatccat
cgatgcctgtgcctcgagtccctgcttcaacagggccacctgctacaccgacctctccacagacaccttgtgtgcaactgcccttatggctt
gtgggcagccgctgcgagttccccgtgggcttgcgcccagcttcccctgggtggccgtctcgtctgggtgtggggctggcagtgctgctg
gtactgtctgggcatggtggcagtggtgtgcggcagctgcggcttcgacggccggacgacggcagcaggggaagccatgaacaacttgt
cggacttcagaaggacaacctgattcctgccgcccagcttaaaaacacaaaccagaagaaggagctggaagtggactgtggcctggac
aagtccaactgtggcaaacagcaaaaccacacattggactataatctggccccagggcccttggggcggggggaccatgccaggaaaagt
tccccacagtgacaagagcttaggagagaaggcgccactgcggttacacagtgaaaagccagagtgtcggatatcagcgatatgtcccc
cagggactccatgtaccagtctgtgtgtttgatatcagaggagagggaatgaatgtgtcattgccacggaggtataa

[00253] В некоторых вариантах выполнения аминокислотная последовательность лиганда Notch (например, DLL4) включает SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере

на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, сохраняя те же функции, что и SEQ ID NO: 4 (например, связывание и/или активация рецептора Notch).

[00254] SEQ ID NO: 9, предшественник дельта-подобного белка 4 [Homo sapiens], ссылочная последовательность NCBI: NP_061947.1, 685 аминокислот

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPG
 CRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWP
 GTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRV
 ICSDNYYGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNG
 YCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYC
 THHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCELELSECDNPCRNGGSCKDQEDGY
 HCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDR
 CTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHHGGTCHDLENGL
 MCTCPAGFSGRRCEVRTSIDACASSPCFN RATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFEPVG
 LPPSFPWVAVSLGVGLAVLLVLLGMVAVAVRQLRLRPDDGSREAMNNLSDFQKDNLI
 PAAQLKNTNQKKELEVDCGLDKSNCGKQQNHTLDYNLAPGPLGRGTMPGKFPHSDKS
 LGKAPLRLHSEKPECRISAICSPRDSMYQSVCLISEERNECVIATEV

[00255] В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch содержит внеклеточный домен DLL4 человека, который соответствует аминокислотам 1-526 DLL4, или аминокислотам 1-524 DLL4, или аминокислотам 27-524 DLL4 (см., например, SEQ ID NO: 9 для полной последовательности DLL4). В некоторых вариантах выполнения внеклеточный домен DLL4 человека включает SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 5, сохраняет те же функции как SEQ ID NO: 10 (например, связывание и/или активация рецептора Notch).

[00256] SEQ ID NO: 10, внеклеточный домен DLL4 человека, 526 аминокислот

MAAASRSASGWALLLLVALWQQRAAGSGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCEPG
 CRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTPVLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWP
 GTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPDALISKIAIQGSLAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRV

ICSDNYYGDNCSRLCKKRNDHFGHYVCQPDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNG
YCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCRHGTCTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYC
THHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYTGVDCLELSECDNSPCRNGGSCKDQEDGY
HCLCPPGYGLHCEHSTLSCADSPCFNGGSCRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDR
CTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTGTYCELHVSDCARNPCAHHGGTCHDLNGL
MCTCPAGFSGRRCVVRTSIDACASSPCFNATCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFPVG
LPPS

[00257] В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch (например, Delta_{ext}-IgG) включает SEQ ID NO: 42 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны последовательности SEQ ID NO: 42, сохраняя те же функции, что и SEQ ID NO: 42 (например, связывание и/или активация рецептора Notch).

[00258] **SEQ ID NO: 42**, Рекомбинантный химерный белок Fc DLL1 человека, R&D SYSTEMS 10184-DL: DLL1 человека (Ser22-Glu537) № доступа O00548 + IEGRMDP + Fc IgG1 человека (Pro100-Lys330)

SGVFELKLQEFVNKKGLGNRNCCRGAGPPPCACRTFFRVCLKHYQASVSPEP
PCTYGSAVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFSNPIRFPFGFTWPGTFSLIIEALHTDSPDDLA
TENPERLISRLATQRHLTVGEEWSQDLHSSGRTDLKYSYRFVCDEHYGEGCSVFCRPR
DDAFGHFTCGERGEKVCNPGWKGPYCTEPICLPGCDEQHGFCDKPGECKCRVGWQGR
YCDECIRYPGCLHGTCQQPWQCNCQEGWGGLFCNQDLNYCTHHKPCCKNGATCTNTGQ
GSYTCSCRPGYTGATCELGIDECDPSPCKNGGSCDLENSYSCTCPPGFYGGKICELSAMT
CADGPCFNNGRCSDSPDGGYSCRCVGYSGFNCEKKIDYCSSSPCSNGAKCVDLGDAYL
CRCQAGFSGRHCDDNVDDCASSPCANGGTCRDGVNDFSCTCPGTYTGRNCSAPVSRCE
HAPCHNGATCHERGHRYVCECARGYGGPNCQFLLPELPPGPAVVDLTEKLEIEGRMDPP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00259] В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch (например, Delta_{4ext}-IgG) включает SEQ ID NO: 43 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей

мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 43, сохраняя те же функции, что и SEQ ID NO: 43 (например, связывание и/или активация рецептора Notch).

[00260] SEQ ID NO: 43, Fc Tag белка DLL4 человека, ACRO BIOSYSTEMS DL4-H5259: DLL4 человека (Ser27-Pro524) + Fc IgG1 человека (Pro100-Lys330)

SGVFQLQLQEFINERGVLASGRPCPEGCRTFFRVCLKHFQAVVSPGPCTFGTVSTP
VLGTNSFAVRDDSSGGGRNPLQLPFNFTWPGTFSLIIEAWHAPGDDLRLPEALPPDALISKI
AIQGS LAVGQNWLLDEQTSTLTRLRYSYRVICSDNY YGDNC SRLCKKRNDHFGHYVCQ
PDGNLSCLPGWTGEYCQQPICLSGCHEQNGYCSKPAECLCRPGWQGRLCNECIPHNGCR
HGTCSTPWQCTCDEGWGGLFCDQDLNYCTHHSPCKNGATCSNSGQRSYTCTCRPGYT
GVDCELELSECDSNPCRNGGSCKDQEDGYHCLCPPGY YGLHCEHSTLSCADSPCFNGGS
CRERNQGANYACECPPNFTGSNCEKKVDRCTSNPCANGGQCLNRGPSRMCRCRPGFTG
TYCELHVSDCARNPCA HGGTCHDLENGLMCTCPAGFSGRRC EVRTSIDACASSPCFNRA
TCYTDLSTDTFVCNCPYGFVGSRCFVGLPPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[00261] В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch содержит внеклеточный домен лиганда Notch, как описано здесь, связанный (например, посредством необязательной линкерной последовательности) с доменом Fc IgG1 человека. В некоторых вариантах выполнения Fc-домен IgG1 человека включает SEQ ID NO: 44 или аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 44, сохраняя те же функции, что и SEQ ID NO: 44.

[00262] SEQ ID NO: 44, Pro100-Lys330 из P01857 (IGHG1_HUMAN)

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

[00263] Существует несколько способов получения лиганда Notch, например, путем предоставления очищенной рекомбинантной формы лиганда Notch или фрагмента, связывающегося с рецептором Notch, при этом фрагмента, связывающего рецептор, достаточно для того, чтобы вызывать события клеточной сигнализации *in vivo* при контакте и связывании с внеклеточными рецепторами Notch на этих клетках. В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch присоединен к твердому субстрату, например, с помощью ковалентной или нековалентной связи или соединения. В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch присоединен к чашке для культивирования клеток.

[00264] В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch дополнительно содержит домен для иммобилизации лиганда Notch на твердом субстрате. В качестве неограничивающего примера лиганд Notch содержит первый член аффинной пары, а твердая подложка содержит второй член аффинной пары. В некоторых вариантах выполнения первый и второй члены аффинной пары выбраны из группы, состоящей из: гаптенового или антигенного соединения в комбинации с соответствующим антителом или его связывающей частью или фрагментом (например, моноклональным антителом FLAG и анти-FLAG, последовательность которых известна в данной области техники); дигоксигенина и антидигоксигенина; мышинового иммуноглобулина и козьего антимышиного иммуноглобулина; пары неиммунологического связывания; биотина и авидина; биотина и стрептавидина; гормона и гормонсвязывающего белка; тироксина и кортизол-гормон связывающего белка; рецептора и агониста рецептора; рецептора и антагониста рецептора; ацетилхолинового рецептора и ацетилхолина или его аналога; IgG и белка A; лектина и углевода; фермента и кофактора фермента; фермента и ингибитора фермента; комплементарные пары олигонуклеотидов, способные образовывать дуплексы нуклеиновых кислот; и первой молекулы, которая заряжена отрицательно, и второй молекулы, которая заряжена положительно.

[00265] В некоторых вариантах выполнения популяция гомогенного эндотелия дифференцируется в популяцию CD3⁺ Т-клеток путем культивирования в культуральном сосуде, не обработанном тканевой культурой; Другими словами, культуральный сосуд не подвергается воздействию газа, модифицирующего гидрофобную пластиковую поверхность, чтобы сделать ее более гидрофильной. Используемый здесь термин «культуральный сосуд» включает чашки, колбы, планшеты, многолуночные планшеты и аналогичные сосуды. В некоторых вариантах выполнения культуральный сосуд покрыт рекомбинантным человеческим белком DL1-Fc (например, коммерчески доступным через R&D SYSTEMS, артикул 10184-DL), рекомбинантным человеческим белком DL4-Fc (например, коммерчески доступным через ACRO BIOSYSTEMS, артикул

DL4-H5259), или смесью обоих лигандов Notch, или любого лиганда Notch, как описано здесь. В некоторых вариантах выполнения культуральный сосуд покрывают лигандом Notch в течение по меньшей мере 0,5 часа, по меньшей мере 1,0 часа, по меньшей мере 1,5 часа, по меньшей мере 2,0 часа, по меньшей мере 2,5 часа, по меньшей мере 3,0 часа, по меньшей мере 3,5 часа, по меньшей мере 4,0 часа, по меньшей мере 4,5 часов или по меньшей мере 5,0 часов. В некоторых вариантах выполнения сосуда для культивирования покрывают лигандом Notch при комнатной температуре.

[00266] В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch нестромального происхождения (например, лиганд Notch, иммобилизованный на планшете для тканевых культур) представлен в концентрации от 1 мкг /мл до 100 мкг /мл или в концентрации от 5 мкг/мл до 15 мкг/мл. В некоторых вариантах выполнения лиганд Notch нестромального происхождения представлен в концентрации по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 2 мкг/мл, по меньшей мере 3 мкг/мл, по меньшей мере 4 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 6 мкг/мл, по меньшей мере 7 мкг/мл, по меньшей мере 8 мкг/мл, по меньшей мере 9 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 11 мкг/мл, по меньшей мере 12 мкг/мл, по меньшей мере 13 мкг/мл, по меньшей мере 14 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 16 мкг/мл, по меньшей мере 17 мкг/мл, по меньшей мере 18 мкг/мл, по меньшей мере 19 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 25 мкг/мл, по меньшей мере 30 мкг/мл, по меньшей мере 35 мкг /мл, по меньшей мере 40 мкг/мл, по меньшей мере 45 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 55 мкг/мл, по меньшей мере 60 мкг/мл, по меньшей мере 65 мкг/мл, по меньшей мере 70 мкг /мл, по меньшей мере 75 мкг /мл, по меньшей мере 80 мкг /мл, по меньшей мере 85 мкг /мл, по меньшей мере 90 мкг /мл, по меньшей мере 95 мкг /мл или по меньшей мере 100 мкг/мл. В предпочтительном варианте лиганд Notch нестромального происхождения представлен в концентрации 10 мкг/мл.

[00267] В некоторых вариантах выполнения клетки культивируют под воздействием лиганда Notch нестромального происхождения (например, лиганда Notch, иммобилизованного на планшете/чашке для тканевых культур) в течение по меньшей мере 1 дня, по меньшей мере 2 дней, по меньшей мере 3 дней, по меньшей мере 4 дней, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 15 дней, по меньшей мере 16 дней, по меньшей мере 17 дней, по меньшей мере 18 дней, по меньшей мере 19 дней, по меньшей мере 20 дней, по меньшей мере 21 дня, по меньшей мере 22 дней, по меньшей мере 23 дней, по меньшей мере 24 дней, по меньшей мере

мере 25 дней, по меньшей мере 26 дней, по меньшей мере 27 дней, по меньшей мере 28 дней, по меньшей мере 29 дней, по меньшей мере 30 дней, по меньшей мере 31 дней, по меньшей мере 32 дней, по меньшей мере 33 дней, по меньшей мере 34 дней, по меньшей мере 35 дней, по меньшей мере 36 дней, по меньшей мере 37 дней, по меньшей мере 38 дней, по меньшей мере 39 дней, по меньшей мере 40 дней, по меньшей мере 41 дня, по меньшей мере 42 дней, по меньшей мере 43 дней, по меньшей мере 44 дней, по меньшей мере 45 дней, по меньшей мере 46 дней, по меньшей мере 47 дней, по меньшей мере 48 дней, по меньшей мере 49 дней, по меньшей мере 50 дней и более.

Дифференциация без стромы

[00268] Описанный здесь способ представляет собой способ дифференциации Т-клеток без стромы, т.е. способ, который не предусматривает совместное культивирование со стромальными клетками или поддерживающими клетками любого другого типа. Совместное культивирование со стромальными клетками, такими как стромальные клетки мыши, ограничивает трансляционный потенциал Т-клеток, полученных из iPSC; например, могут возникать опасения отторжения трансплантата из-за наличия стромальных клеток. Более того, Т-клетки, дифференцированные с использованием стромальных клеток, проявляют врожденный фенотип (например, по данным экспрессии TCRgd, который является маркером для гамма-дельта Т-клеток). Предпочтительно, чтобы Т-клетки проявляли адаптивный фенотип, например, характеризующийся экспрессией TCR α и β . Кроме того, как описано здесь, способы дифференциации Т-клеток без стромы приводят к увеличению числа CD3⁺ Т-клеток (например, CD4⁺CD8⁺ клеток) по сравнению со способами дифференциации, предусматривающими совместное культивирование со стромой.

[00269] Соответственно, Т-клетки, дифференцированные способами без использования стромы, в одном варианте выполнения в сочетании с ингибированием эпигенетического регулятора (например, HMT; например, EZH1, G9a/GLP) проявляют по меньшей мере следующие неожиданные преимущества по сравнению со способами совместного культивирования со стромой: (1) повышенный потенциал для трансплантации у людей; (2) уменьшенное количество врожденно-подобных Т-клеток; (3) повышенное количество и/или процентное содержание образующихся Т-клеток (например, CD5⁺CD7⁺ Pro-T-клеток; CD3⁺ Т-клеток; CD4⁺CD8⁺ Т-клеток; CD4⁺ Т-клеток; CD8⁺ Т-клеток; альфа-бета Т-клеток); (4) профили экспрессии генов наиболее сходны с альфа-бета-Т-клетками; (5) более разнообразный репертуар TCR; и/или (6)

увеличение длины CDR TCR (см., например, пример 1, Фиг. 1C-1D, Фиг. 3A-3B, Фиг. 4, Фиг. 5A-5D, Фиг. 6-16).

[00270] Используемый здесь термин «поддерживающая клетка или стромальная клетка» при использовании в контексте клеточной дифференциации относится к любым клеткам, которые способны создавать, стимулировать или поддерживать микроокружение для роста, пролиферации, дифференциации или экспансии мультипотентных гемопоэтических клеток, клеток-предшественников, или Т-клеток, или В-клеток. Неограничивающие примеры поддерживающих клеток, которые не включены в описанные здесь способы дифференциации, включают, но без ограничения, стромальные клетки и фибробластные клетки.

[00271] Поддерживающие клетки, используемые ранее в совместных культурах для целей дифференциации клеток, обычно представляют собой стромальные клетки. Однако способы, описанные здесь, не включают сокультуры, содержащие стромальные клетки. Примеры стромальных клеточных линий, которые не охвачены способами дифференциации, описанными здесь, включают, но без ограничения, мышиную стромальную клеточную линию MS5; линии стромальных клеток мышинного костного мозга, такие как S10, S17, OP9 (например, клетки OP9-DL1 или клетки OP9-DL4) и клеточные линии BMS2; линии стромальных клеток костного мозга человека, такие как описанные в патенте США № 5879940, который полностью включен в настоящее описание посредством ссылки; или любые другие подобные клетки, которые экспрессируют и экспонируют внеклеточно или секретируют лиганд Notch. Клетки OP9-DL1 представляют собой линию стромальных клеток костного мозга, которая эктопически экспрессирует лиганд Notch, Delta-like 1 (DLL1). Способ дифференциации плюрипотентных стволовых клеток в Т-клетки с использованием клеток, экспрессирующих лиганд OP9-Notch, известен в данной области. См., например, патенты США №№: 7575925, 8772028, 8871510 и 9206394, публикации патентов США №№: 20090217403, 20110123502, 20110052554, 20110027881, 20110236363, 20120149100, 20130281304, 20140322808, 20140248248 и 20140037599. Эти документы включены в настоящее описание во всей своей полноте посредством ссылки.

[00272] В настоящем документе описаны способы дифференциации Т-клеток от плюрипотентных стволовых клеток, где способы не предусматривают стадию совместного культивирования клеток с поддерживающими клетками или стромальными клетками. В некоторых вариантах выполнения используемый здесь лиганд Notch не происходит из стромальной клетки. В некоторых вариантах выполнения дифференциация гомогенного эндотелия в присутствии лиганда Notch не предусматривает совместного

культивирования со стромальной клеткой, экспрессирующей лиганд Notch. В некоторых вариантах выполнения дифференциация гемогенного эндотелия в присутствии лиганда Notch не предусматривает совместного культивирования с клетками OP9-DL1 или клетками OP9-DL4.

Среды для дифференциации Т-клеток

[00273] В некоторых вариантах выполнения способ дифференциации предусматривает дифференциацию полученной популяции CD34+ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах выполнения время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD3+ Т-клеток составляет по меньшей мере 3 недели, по меньшей мере 3,5 недели, по меньшей мере 4 недели, по меньшей мере 4,5 недели, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 5,5 недели, по меньшей мере 6 недель и более. В некоторых вариантах выполнения время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD3+ Т-клеток составляет по меньшей мере 6 недель.

[00274] В некоторых вариантах выполнения полипептид (например, факторы роста или дифференциации), который может экспрессироваться поддерживающей клеткой или стромальной клеткой, может быть обеспечен в среде для культивирования клеток. Неограничивающие примеры полипептидов, поддерживающих дифференциацию Т-клеток, которые могут быть включены в среду для культивирования клеток, включают IL-7, SCF, Flt3 и TPO. Интерлейкин-7 (IL-7) представляет собой гемопоэтический фактор роста, секретируемый стромальными клетками костного мозга и тимуса, и участвующий в развитии В- и Т-клеток. Фактор стволовых клеток (также известный как SCF, KIT-лиганд, KL или стальной фактор) представляет собой цитокин, который связывается с рецептором с-KIT (CD117) и участвует в дифференциации Т-клеток. FLT3 (также называемый Flit3 или Fms-подобная тирозинкиназа 3) представляет собой рецепторную тирозинкиназу класса III, которая регулирует гемопоэз. Тромбопоэтин (TPO или THPO) представляет собой цитокин, который в основном отвечает за продукцию мегакариоцитов, но также играет роль в поддержании гемопоэтических стволовых клеток (HSC). См., например, Wang et al., Distinct roles of IL-7 and stem cell factor in the OP9-DL1 T cell differentiation culture system. Exp Hematol. 2006 Dec;34(12):1730-40.

[00275] В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток не содержит сыворотки. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток содержит по меньшей мере один из SCF, FLT3 и/или

IL7. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток содержит SCF, FLT3 и IL7. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток содержит 30 нг/мл SCF, 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток содержит 100 нг/мл SCF, 100 нг/мл FLT3 и 50 нг/мл IL7. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток содержит FLT3 и IL7. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток содержит 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток содержит 100 нг/мл FLT3 и 50 нг/мл IL7.

[00276] Концентрации SCF, FLT3 и/или IL7 следует использовать таким образом, чтобы они способствовали дифференциации гомогенного эндотелия в популяцию CD3+ Т-клеток. Концентрация SCF может варьироваться от 1 нг/мл до 200 нг/мл. В некоторых вариантах выполнения концентрация SCF (например, в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток) составляет 30 нг/мл. В некоторых вариантах выполнения концентрация SCF (например, в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток) 100 нг/мл. Концентрация FLT3 может варьироваться от 1 нг/мл до 200 нг/мл. В некоторых вариантах выполнения концентрация FLT3 (например, в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток) составляет 15 нг/мл. В некоторых вариантах выполнения концентрация FLT3 (например, в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток) составляет 100 нг/мл. Концентрация IL7 может варьироваться от 1 нг/мл до 200 нг/мл. В некоторых вариантах выполнения концентрация IL7 (например, в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток) составляет 25 нг/мл. В некоторых вариантах выполнения концентрация IL7 (например, в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток) составляет 50 нг/мл.

[00277] В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток дополнительно содержит тромбopoэтин (TPO) в течение по меньшей мере первых 2 недель дифференциации в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток. В качестве неограничивающего примера среда для дифференциации CD3+-Т-клеток дополнительно содержит тромбopoэтин (TPO) в течение по меньшей мере первых 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней или 21 дня дифференциации в CD3+-Т-клетки в среде дифференциации. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток, содержащая TPO, способствует дифференциации в популяцию CD5+ CD7+ Pro Т-клеток. Такие CD5+ CD7+ Pro Т-клетки можно обнаружить по меньшей мере через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней дифференциации в

среде для дифференциации CD3+-Т-клеток. В некоторых вариантах выполнения CD5+ CD7+ Pro Т-клетки можно обнаружить по меньшей мере через 2 недели дифференциации в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток.

[00278] В некоторых вариантах выполнения следует использовать такую концентрацию ТРО, которая способствует дифференциации гемогенного эндотелия в популяцию CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах выполнения концентрация ТРО может находиться в диапазоне от 1 нг/мл до 200 нг/мл. В некоторых вариантах выполнения концентрация ТРО (например, в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток) составляет 5 нг/мл. В некоторых вариантах выполнения концентрация ТРО (например, в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток) составляет 50 нг/мл.

[00279] В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток (например, содержащая IL-7 и/или FLT3) дополнительно содержит SCF по меньшей мере в течение первых 2 недель дифференциации в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток. В качестве неограничивающего примера, среда для дифференциации CD3+-Т-клеток дополнительно содержит SCF по меньшей мере в течение первых 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней или 21 дня дифференциации в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток. В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации CD3+-Т-клеток, содержащая SCF, способствует дифференциации в популяцию CD5+ CD7+ Pro Т-клеток.

[00280] В некоторых вариантах выполнения SCF, FLT3, IL7 и/или ТРО содержатся в среде для дифференциации CD3+-Т-клеток в концентрации по меньшей мере 1 нг/мл, по меньшей мере 2 нг/мл, по меньшей мере 3 нг/мл, по меньшей мере 4 нг/мл, по меньшей мере 5 нг/мл, по меньшей мере 6 нг/мл, по меньшей мере 7 нг/мл, по меньшей мере 8 нг/мл, по меньшей мере 9 нг/мл, по меньшей мере 10 нг/мл, по меньшей мере 11 нг/мл, по меньшей мере 12 нг/мл, по меньшей мере 13 нг/мл, по меньшей мере 14 нг/мл, по меньшей мере 15 нг/мл, по меньшей мере 16 нг/мл, по меньшей мере 17 нг/мл, по меньшей мере 18 нг/мл, по меньшей мере 19 нг/мл, по меньшей мере 20 нг/мл, по меньшей мере 25 нг/мл, по меньшей мере 30 нг/мл, по меньшей мере 35 нг/мл, по меньшей мере 40 нг/мл, по меньшей мере 45 нг/мл, по меньшей мере 50 нг/мл, по меньшей мере 55 нг/мл, по меньшей мере 60 нг/мл, по меньшей мере 65 нг/мл, по меньшей мере 70 нг/мл, по меньшей мере 75 нг/мл, по меньшей мере 80 нг/мл, по меньшей мере 85 нг/мл, по меньшей мере 90 нг/мл, по меньшей мере 95 нг/мл, по меньшей мере 100 нг/мл, по меньшей мере 105 нг/мл, по меньшей мере 110 нг/мл, по меньшей мере 115 нг /мл, по меньшей мере 120 нг/мл, по меньшей мере 125 нг/мл, по

меньшей мере 130 нг/мл, по меньшей мере 135 нг/мл, по меньшей мере 140 нг/мл, по меньшей мере 145 нг/мл, по меньшей мере 150 нг/мл, по меньшей мере 155 нг/мл, по меньшей мере 160 нг/мл, по меньшей мере 165 нг/мл, по меньшей мере 170 нг/мл, по меньшей мере 175 нг/мл, по меньшей мере 180 нг/мл, по меньшей мере 185 нг/мл, по меньшей мере 190 нг/мл, по меньшей мере 195 нг/мл или по меньшей мере 200 нг/мл. Концентрации SCF, FLT3, IL7 и/или TPO могут быть одинаковыми или разными.

[00281] В некоторых вариантах выполнения CD3⁺ Т-клетки можно обнаружить по меньшей мере через 5,0 недель дифференциации в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток. В некоторых вариантах выполнения CD3⁺ Т-клетки можно обнаружить по меньшей мере через 1,5 недели, 2 недели, 2,5 недели, 3,0 недели, 3,5 недели, 4,0 недели, 4,5 недели или 5,0 недель дифференциации в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток. В некоторых вариантах выполнения популяция CD3⁺ Т-клеток содержит популяцию CD4⁺CD8⁺ Т-клеток, также называемых в настоящем документе двойными положительными или DP Т-клетками. Такие CD4⁺CD8⁺ CD3⁺ Т-клетки можно обнаружить по меньшей мере через 1,5 недели, 2 недели, 2,5 недели, 3,0 недели, 3,5 недели, 4,0 недели, 4,5 недели или 5,0 недель дифференциации в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток.

[00282] В некоторых вариантах выполнения способ дополнительно предусматривает дифференциацию популяции CD4⁺CD8⁺ Т-клеток в среде для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD4⁺ клеток и в популяцию CD8⁺ клеток. В некоторых вариантах выполнения время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD4⁺CD8⁺ Т-клеток в популяцию CD4⁺ Т-клеток и популяцию CD8⁺ клеток составляет по меньшей мере 1 день, по меньшей мере 2 дня, по меньшей мере 3 дня, по меньшей мере 4 дня, по меньшей мере 5 дней, по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней или по меньшей мере 10 дней. В некоторых вариантах выполнения время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в популяцию CD4⁺ Т-клеток и популяцию CD8⁺ клеток составляет по меньшей мере 4,0 недели, 4,5 недели, 5,0 недели, 5,5 недель или 6,0 недель.

[00283] В некоторых вариантах выполнения среда для дифференциации а одиночно-положительные Т-клетки содержит 10 нг/мл IL-15 и активатор Т-клеток. Интерлейкин-15 (IL-15), как и IL-7, является членом суперсемейства интерлейкинов 2 (IL-2) и имеет много общего с IL-2, включая способность стимулировать лимфоциты. В некоторых вариантах выполнения можно использовать различные концентрации IL-15,

пока они все еще способствуют дифференциации CD4+CD8+ Т-клеток в одиночно-положительные клетки CD4+ и клетки CD8+. В некоторых вариантах выполнения концентрация IL-15 может находиться в диапазоне от 1 нг/мл до 200 нг/мл, и предпочтительная концентрация составляет 10 нг/мл.

[00284] В некоторых вариантах выполнения Т-клеточный активатор содержит компоненты (например, растворимые тетрамерные комплексы антител), которые связывают CD3 и CD28 (и необязательно CD2) лиганды клеточной поверхности. Связывание активатора Т-клеток приводит к перекрестному связыванию CD3 и CD28 (и необязательно CD2) лигандов клеточной поверхности, тем самым обеспечивая необходимые первичные и костимулирующие сигналы для активации Т-клеток.

[00285] В некоторых вариантах выполнения активатор Т-клеток включает активатор CD3/CD28 Т-клеток (например, в концентрации 10 мкл/мл). Такой активатор CD3/CD28 Т-клеток коммерчески доступен (например, от StemCell Technology™, артикул №10970). В некоторых вариантах выполнения концентрация активатора CD3/CD28 Т-клеток должна использоваться так, чтобы она способствовала дифференциации CD4+CD8+ Т-клеток в одиночно-положительные CD4+ клетки и CD8+ клетки. В некоторых вариантах выполнения концентрация может находиться в диапазоне от 1 мкл/мл до 200 мкл/мл, и предпочтительная концентрация составляет 10 мкл/мл.

[00286] В некоторых вариантах выполнения активатор Т-клеток содержит активаторы CD3/CD28 Т-клеток Dynabeads (например, используемые из расчета одна гранула на клетку). Такие CD3/CD28 Т-клеточные активаторы Dynabeads коммерчески доступны (например, от ThermoFisher™ #11132D). В некоторых вариантах выполнения активаторы CD3/CD28 Т-клеток Dynabeads следует использовать в таких концентрациях, чтобы они способствовали дифференциации CD4+CD8+ Т-клеток в одиночно-положительные клетки CD4+ и клетки CD8+. В некоторых вариантах выполнения концентрация может находиться в диапазоне от 1 гранула/клетка до 20 гранул/клетка, при этом предпочтительна концентрация 1 гранула/клетка.

[00287] В некоторых вариантах выполнения способ дополнительно предусматривает по меньшей мере через 1 неделю (например, в среде для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки) выполнение стадии обогащения клеток CD4+ и/или клеток CD8+. В некоторых вариантах выполнения стадию обогащения клеток CD4+ и/или обогащения клеток CD8+ можно проводить по меньшей мере через 1 день, по меньшей мере через 2 дня, по меньшей мере через 3 дня, по меньшей мере через 4 дня, по меньшей мере через 5 дней, по меньшей мере через 6 дней, по меньшей мере через 7 дней, по меньшей мере через 8 дней, по меньшей мере через 9 дней, по меньшей мере

через 10 дней, по меньшей мере через 11 дней, по меньшей мере через 12 дней, по меньшей мере через 13 дней или по меньшей мере через 14 дней культивирования в средах дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки.

[00288] Способы обогащения клеток CD4⁺ или CD8⁺ известны в данной области. В качестве неограничивающих примеров, клетки CD4⁺ или CD8⁺ могут быть обогащены с использованием магнитно-активируемой клеточной сортировки (MACS) и флуоресцентно-активируемой сортировки клеток (FACS) антителами против CD4 или против CD8 соответственно.

[00289] В некоторых вариантах выполнения весь протокол дифференциации Т-клеток, описанный здесь, происходит в бесстромальной среде, например, клетки культивируют, подвергая воздействию лиганда Notch нестромального происхождения (например, лиганда Notch, иммобилизованного на чашке для тканевых культур). В некоторых вариантах по меньшей мере часть протокола дифференциации Т-клеток (например, включающая культивирование в CD3⁺-Т-клеточной дифференциации средах и в средах для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки) происходит в бесстромальной среде, например, клетки культивируются под воздействием лиганда Notch нестромального происхождения (например, лиганд Notch, иммобилизованный на чашке для тканевых культур).

Полученная популяция Т-клеток

[00290] Как описано в настоящем документе, популяция Т-клеток, полученных способами без использования стромы, описанных здесь, и в одном варианте выполнения в сочетании с ингибированием эпигенетического регулятора (например, HMT; например, EZH1, G9a/GLP), проявляет по меньшей мере следующие неожиданные преимущества по сравнению со способами с совместным культивированием с использованием стромы: (1) повышенный потенциал для трансплантации у людей; (2) уменьшенное количество врожденно-подобных Т-клеток; (3) повышенное количество и/или процентное содержание образующихся Т-клеток (например, CD5⁺CD7⁺ Pro-T-клетки; CD3⁺ Т-клетки; CD4⁺CD8⁺ Т-клетки; CD4⁺ Т-клетки; CD8⁺ Т-клетки; альфа-бета-Т-клетки); (4) профили экспрессии генов наиболее сходны с альфа-бета-Т-клетками; (5) более разнообразный репертуар TCR; и/или (6) увеличение длины CDR TCR (см., например, пример 1, Фиг. 1C-1D, Фиг. 3A-3B, Фиг. 4, Фиг. 5A-5D, Фиг. 6-16).

[00291] В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток (например, CD3⁺ Т-клетки; CD4⁺CD8⁺ Т-клетки; CD4⁺ Т-клетки; CD8⁺ Т-клетки), полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического

регулятора (например, HMT; например, EZH1, G9a/GLP), как описано здесь, демонстрирует по меньшей мере на 10% более высокую скорость трансплантации или приживления, чем популяция Т-клеток, полученных способом с использованием стромы. В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, проявляет более высокую скорость трансплантации или приживления, которая по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450% или по меньшей мере на 500% или более, или по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000 или более раз выше, чем у популяции Т-клеток, полученной способом с использованием стромы или без ингибирования эпигенетического регулятора.

[00292] В некоторых вариантах выполнения небольшая часть популяции Т-клеток (например, CD3⁺ Т-клетки; CD4⁺CD8⁺ Т-клетки; CD4⁺ Т-клетки; CD8⁺ Т-клетки), полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, представляют собой TCRgd⁺ (т.е. врожденно-подобные гамма-дельта Т-клетки). Гамма-дельта Т-клетки (γδ Т-клетки) представляют собой Т-клетки, которые имеют характерный Т-клеточный рецептор (TCR) на своей поверхности. Большинство Т-клеток представляют собой αβ (альфа-бета) Т-клетки с TCR, состоящим из двух цепей гликопротеина, называемых α (альфа) и β (бета) цепями TCR. Напротив, гамма-дельта (γδ) Т-клетки имеют TCR, который состоит из одной цепи γ (гамма) и одной цепи δ (дельта). Как и другие «нетрадиционные» подмножества Т-клеток, несущие инвариантные TCR, такие как CD1d-рестриктированные Т-клетки естественных киллеров, гамма-дельта-Т-клетки обладают рядом характеристик, которые помещают их на границу между более примитивной в эволюционном отношении системой врожденного иммунитета, которая обеспечивает быструю благоприятную реакцию на различные чужеродные агенты и адаптивную иммунную систему, где В- и Т-

клетки координируют более медленный, но очень антиген-специфический иммунный ответ, что приводит к долговременной памяти против последующих воздействий того же антигена. Гамма-дельта-Т-клетки можно рассматривать как компонент адаптивного иммунитета, поскольку они перестраивают гены TCR, создавая разнообразие соединений, и они могут развивать фенотип памяти. Однако различные подмножества также можно рассматривать как часть врожденного иммунитета, в котором специфический TCR может функционировать как рецептор распознавания образов. См., например, Born WK, Reardon CL, O'Brien RL (February 2006). "The function of gammadelta T cells in innate immunity". *Current Opinion in Immunology*. 18 (1): 31–8.

[00293] В некоторых вариантах выполнения по меньшей мере 10% популяции Т-клеток (например, CD3⁺ Т-клетки; CD4⁺CD8⁺ Т-клетки; CD4⁺ Т-клетки; CD8⁺ Т-клетки), полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, представляют собой TCRgd⁺. В некоторых вариантах выполнения по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19%, по меньшей мере по меньшей мере 20%, по меньшей мере 21%, по меньшей мере 22%, по меньшей мере 23%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 26%, по меньшей мере 27%, по меньшей мере 28%, по меньшей мере 29%, по меньшей мере по меньшей мере 30%, по меньшей мере 31%, по меньшей мере 32%, по меньшей мере 33%, по меньшей мере 34%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 36%, по меньшей мере 37%, по меньшей мере 38%, по меньшей мере 39%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 41%, по меньшей мере 42%, по меньшей мере 43%, по меньшей мере 44%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 46%, по меньшей мере 47%, по меньшей мере 48% или по меньшей мере 49% популяции Т-клеток (например, CD3⁺ Т-клеток; CD4⁺CD8⁺ Т-клеток; CD4⁺ Т-клеток; CD8⁺ Т-клеток) представляют собой TCRgd⁺.

[00294] В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток (например, CD3⁺ Т-клетки; CD4⁺CD8⁺ Т-клетки; CD4⁺ Т-клетки; CD8⁺ Т-клетки), полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, включает по меньшей мере на 10% больше Т-клеток, чем популяция Т-клеток, полученных способом с использованием стромы или без ингибирования эпигенетического регулятора. В некоторых вариантах выполнения

популяция Т-клеток, полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, составляет по меньшей мере на 1%, по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 3%, по меньшей мере на 4%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 6%, по меньшей мере на 7%, по меньшей мере на 8%, по меньшей мере на 9%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450%, или по меньшей мере на 500% или более, или по меньшей мере в 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000 или более раз, чем популяция Т-клеток, полученная способом с использованием стромы или без ингибирования эпигенетического регулятора.

[00295] В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток (например, CD3⁺ Т-клетки; CD4⁺CD8⁺ Т-клетки; CD4⁺ Т-клетки; CD8⁺ Т-клетки), полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, проявляет профиль экспрессии генов, который больше похож на $\alpha\beta$ Т-клетки, чем на другие клетки (например, $\gamma\delta$ Т-клетки; NK-клетки; Т-клетки, полученные из iPSC с использованием системы совместного культивирования OP9-DL4; Т-клетки, дифференцированные из CD34⁺ HSPC пуповинной крови), например, профиль генов полученных Т-клеток по меньшей мере на 0,5% больше похож $\alpha\beta$ на Т-клетки по сравнению с другим типом клеток. В одном варианте выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет профиль экспрессии сигнатурных генов Т-клеток и/или сигнатурных генов $\alpha\beta$ Т-клеток, который по меньшей мере чем на 10% отличается от профиля экспрессии генов $\alpha\beta$ Т-клеток. В одном варианте выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет профиль экспрессии генов сигнатурных Т-клеточных генов и/или сигнатурных генов $\alpha\beta$ Т-клеток, который по меньшей мере чем на 20%. (например, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере

мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19% или более) отличается от профиля экспрессии генов $\alpha\beta$ Т-клеток. В одном варианте выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет профиль экспрессии сигнатурных генов Т-клеток и/или сигнатурных генов $\alpha\beta$ Т-клеток, который на 1%-5%, 2%-6%, 3%-7%, 4%-8%, 5%-9%, 5%-10%, 5%-15%, 10%-15% или 15%-20% отличается от профиля экспрессии генов $\alpha\beta$ Т-клеток.

[00296] В одном варианте выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более сходен с профилем экспрессии генов $\alpha\beta$ Т-клеток по сравнению с популяцией Т-клеток полученной способом с использованием стромы или без ингибирования эпигенетического регулятора. В одном варианте выполнения полученная Т-клетка имеет больший процент сходства с профилем экспрессии гена $\alpha\beta$ Т-клетки, чем с профилем гена другого типа клеток. Специалист в данной области может определить сходство экспрессии генов в Т-клетке, полученной с помощью способов без стромы, описанных здесь, и в $\alpha\beta$ -Т-клетке с использованием стандартных способов, например секвенирования транскриптома конкретных типов клеток (клетки, отсортированные по FACS).

[00297] В одном варианте выполнения популяция Т-клеток, полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета-Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,75, 0,755, 0,76, 0,765, 0,77, 0,775, 0,78, 0,785, 0,79, 0,795, 0,8, 0,805, 0,81, 0,815, 0,82, 0,825, 0,83, 0,835, 0,84, 0,845, 0,85, 0,855, 0,86, 0,865, 0,87, 0,875, 0,88, 0,885, 0,89, 0,895, 0,9, 0,905, 0,91, 0,915, 0,92, 0,925, 0,93, 0,935, 0,94, 0,945, 0,95, 0,955, 0,96, 0,965, 0,97, 0,975, 0,98, 0,985, 0,99, 0,995 или 1,0.

[00298] В некоторых вариантах выполнения популяция CD3⁺ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, наиболее сходный с альфа-бета-Т-клетками. В некоторых вариантах выполнения популяция CD3⁺ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, аналогичный или по существу аналогичный альфа-бета-Т-клеткам. В некоторых вариантах выполнения популяция CD3⁺ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или более похож на альфа-бета-Т-клетки. В некоторых вариантах выполнения популяция CD3⁺ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета-Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,85.

[00299] В некоторых вариантах выполнения иммунная клетка, например, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет профиль экспрессии генов, наиболее сходный с альфа-бета Т-клетками. В некоторых вариантах выполнения иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, аналогичный или по существу сходный с альфа-бета Т-клетками. В некоторых вариантах выполнения иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или более подобен альфа-бета Т-клеткам. В некоторых вариантах выполнения иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета-Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,85.

[00300] В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, экспрессирует по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере

51, по меньшей мере 52, по меньшей мере 53, по меньшей мере 54, по меньшей мере 55, по меньшей мере 56, по меньшей мере 57, по меньшей мере 58, по меньшей мере 59, по меньшей мере 60, по меньшей мере 61, по меньшей мере 62, по меньшей мере 63, по меньшей мере 64, по меньшей мере 65, по меньшей мере 66, по меньшей мере 67, по меньшей мере 68, по меньшей мере 69, по меньшей мере 70, по меньшей мере 71, по меньшей мере 72, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по меньшей мере 75, по меньшей мере 76, по меньшей мере 77, по меньшей мере 78, по меньшей мере 79, по меньшей мере 80, по меньшей мере 81, по меньшей мере 82, по меньшей мере 83, по меньшей мере 84, по меньшей мере 85, по меньшей мере 86, по меньшей мере 87, по меньшей мере 88, по меньшей мере 89, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150 или более сигнатурных генов из $\alpha\beta$ Т-клетки. В одном варианте выполнения полученная Т-клетка экспрессирует большее количество сигнатурных генов из $\alpha\beta$ Т-клетки, чем сигнатурных генов из другого типа клеток. Используемый здесь термин «сигнатурный ген» относится к гену, который проявляет характерный паттерн экспрессии для конкретного типа клеток (например, Т-клетка, $\alpha\beta$ Т-клетка); сигнатурный ген может потребоваться для функции определенного типа клеток. Неограничивающие примеры сигнатурных генов Т-клеток и сигнатурных генов $\alpha\beta$ Т-клеток описаны далее в настоящем документе. Конкретный тип клеток (например, Т-клетка, $\alpha\beta$ Т-клетка) демонстрирует сигнатуру генов или сигнатуру экспрессии гена, которая включает одну или комбинированную группу генов для клетки с уникальным характерным паттерном генной экспрессии (т.е. сигнатурные гены).

[00301] В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, экспрессирует по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20, по меньшей мере 21, по меньшей мере 22, по меньшей мере 23, по меньшей мере 24, по меньшей мере 25, по меньшей мере 26, по меньшей мере 27, по меньшей мере 28, по меньшей мере 29, по меньшей мере 30, по меньшей мере 31, по меньшей мере 32, по меньшей мере 33, по меньшей мере 34, по меньшей мере 35, по меньшей мере 36, по меньшей мере 37, по меньшей мере 38, по меньшей мере 39, по

меньшей мере 40, по меньшей мере 41, по меньшей мере 42, по меньшей мере 43, по меньшей мере 44, по меньшей мере 45, по меньшей мере 46, по меньшей мере 47, по меньшей мере 48, по меньшей мере 49, по меньшей мере 50, по меньшей мере 51, по меньшей мере 52, по меньшей мере 53, по меньшей мере 54, по меньшей мере 55, по меньшей мере 56, по меньшей мере 57, по меньшей мере 58, по меньшей мере 59, по меньшей мере 60, по меньшей мере 61, по меньшей мере 62, по меньшей мере 63, по меньшей мере 64, по меньшей мере 65, по меньшей мере 66, по меньшей мере 67, по меньшей мере 68, по меньшей мере 69, по меньшей мере 70, по меньшей мере 71, по меньшей мере 72, по меньшей мере 73, по меньшей мере 74, по меньшей мере 75, по меньшей мере 76, по меньшей мере 77, по меньшей мере 78, по меньшей мере 79, по меньшей мере 80, по меньшей мере 81, по меньшей мере 82, по меньшей мере 83, по меньшей мере 84, по меньшей мере 85, по меньшей мере 86, по меньшей мере 87, по меньшей мере 88, по меньшей мере 89, по меньшей мере 90, по меньшей мере 91, по меньшей мере 92, по меньшей мере 93, по меньшей мере 94, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98, по меньшей мере 99, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150 и более генов из $\alpha\beta$ Т-клетки. В одном варианте выполнения полученная Т-клетка экспрессирует большее количество генов из $\alpha\beta$ Т-клеток, чем сигнатурных генов из другого типа клеток.

[00302] Неограничивающие примеры сигнатурных генов Т-клеток включают GRB2 (белок 2, связанный с рецептором фактора роста); NFATC3 (ядерный фактор активированных Т-клеток 3); ZAP70 (протеинкиназа 70, ассоциированная с дзета-цепью Т-клеточного рецептора); RAF1 (протоонкоген Raf-1, серин/треонинкиназа); PIK3CG (каталитическая гамма-субъединица фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы); PIK3R1 (регуляторная субъединица 1 фосфоинозитид-3-киназы); CALM3 (кальмодулин 3); PTPN7 (протеинтирозинфосфатаза, не являющаяся рецептором типа 7); LAT (линкер для активации Т-клеток); NFKBIA (альфа-ингибитор NFKB); VAV1 (фактор 1 обмена гуаниновых нуклеотидов Vav); SHC1 (SHC (Src Homology 2 Domain Containing) адаптерный белок 1); PRKCB (протеинкиназа С-бета); MAP2K4 (митоген-активируемая протеинкиназа-киназа 4); MAP2K1 (митоген-активируемая протеинкиназа-киназа 1); RAC1 (малая GTPаза 1 семейства Rac); FYN (Fyn Proto-Oncogene, тирозинкиназа семейства Src); RELA (RELA Proto-Oncogene, субъединица NF-KB, гомолог А вирусного онкогена v-rel птичьего ретикулоэндотелиоза); LCK (протоонкоген Lck, тирозинкиназа семейства Src); CALM2 (кальмодулин 2); CD3D (антиген CD3, дельта-субъединица); CALM1 (кальмодулин 1); CD247 (дзета-цепь гликопротеина CD3 поверхности Т-клеток); CD3E (эпсилон-цепь гликопротеина CD3 поверхности Т-клеток); CD3G (гамма-цепь

поверхностного гликопротеина CD3Т-клеток); FOS (Fos Proto-Oncogene, субъединица фактора транскрипции AP-1); PIK3CA (каталитическая альфа-субъединица фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат-3-киназы); PLCG1 (фосфолипаза С-гамма 1); SOS1 (Son Of Sevenless Homolog 1, SOS Ras/Rac гуаниновый нуклеотидный обменный фактор 1); ELK1 (фактор транскрипции ETS ELK1); PPP3CC (каталитическая гамма-субъединица протеинфосфатазы 3); MAP3K1 (митоген-активированная протеинкиназа-киназа-киназа 1); PPP3CA (каталитическая субъединица альфа протеинфосфатазы 3); NFKB1 (субъединица 1 каппа-В ядерного фактора); NFATC2 (ядерный фактор активированных Т-клеток 2); NFATC1 (ядерный фактор активированных Т-клеток 1, субъединица транскрипционного фактора AP-1); JUN (Jun Proto-Oncogene; MAPK8 (митоген-активируемая протеинкиназа 8); RASA1 (RAS P21 Protein Activator 1); PPP3CB (бета-каталитическая субъединица протеинфосфатазы 3); PRKCA (протеинкиназа С-альфа); MAPK3 (митоген-активированная протеинкиназа 3) и NFATC4 (ядерный фактор активированных Т-клеток 4) (см., например, **Фиг. 3А**).

[00303] Неограничивающие примеры сигнатурных генов $\alpha\beta$ Т-клеток включают ATP11B (АТФазу, транспортирующую фосфолипиды 11В); PPP4R3A (регуляторная субъединица 3А протеинфосфатазы 4); CAB39 (кальцийсвязывающий белок 39); GLS (глутаминаза); UBE2Z (фермент, конъюгирующий убиквитин E2 Z); INPP4A (инозитолполифосфат-4-фосфатаза типа IА); RAB22A (Ras-родственный белок Rab-22А, член семейства Ras Oncogene); SMARCD2 (SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable), связанный с матриксом, актин-зависимый регулятор хроматина, подсемейство D, член 2); VPS26B (VPS26, компонент В ретромерного комплекса, белок 26В, ассоциированный с сортировкой вакуолярных белков); CERK (керамидкиназа); ESYT2 (расширенный синаптотегмин 2); RAC1 (малая GTPаза 1 семейства Rac); EIF3B (субъединица В эукариотического фактора инициации трансляции 3); NEK7 (NIMA (Never In Mitosis Gene A)-родственная киназа 7); MDFIC (MyoD (белок 1 детерминации миобластов), содержащий домен семейства ингибиторов); YWHAN (белок активации тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы Eta); MCMBP (белок, связывающий комплекс поддержания минихромосомы); GOLPH3 (фосфопротеин Гольджи 3); PTGER4 (рецептор простагландина Е 4); B3GNT2 (UDP-GlcNAc: BetaGal бета-1,3-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза 2, галактозилтрансфераза 7); PITPNC1 (белок, переносящий фосфатидилинозитол, цитоплазматический 1); ARAP2 (ArfGAP с доменом RhoGAP, анкириновым повтором и доменом PH 2; адаптерный белок 2 Arf и Rho GAP); ZFP36L2 (белок цинковых пальцев 36, типоподобный C3H1 2); EFHD2 (член семейства доменов EF-Hand D2, Swiprosin-1); CPD (карбоксипептидаза D); KLRB1

(рецептор B1, подобный лектину клеток-киллеров); DUSP1 (фосфатаза двойной специфичности 1); CMPK1 (цитидин/уридинмонофосфаткиназа 1); RASGRP1 (Ras-гуанил-высвобождающий белок 1); TM9SF3 (член 3 трансмембранного суперсемейства 9); MAPK1 (митоген-активируемая протеинкиназа 1); GSPT1 (фазовый переход G1 в S 1); PNRC1 (коактиватор 1 богатого пролином ядерного рецептора); TMEM248 (трансмембранный белок 248); STT3B (STT3 (STaurosporine and Temperature sensitive)) олигосахарилтрансферазный комплекс, каталитическая субъединица B); KHDRBS1 (содержащий РНК-связывающий домен КН (K Homology), связанный с трансдукцией сигнала 1); GNPTAB (субъединицы альфа и бета N-ацетилглюкозамин-1-фосфаттрансферазы); GRSF1 (фактор связывания последовательности G-РНК 1); TARP (белок TCR Gamma с альтернативной рамкой считывания, гамма-цепь Т-клеточного рецептора); ZBTB16 (содержащий домен цинкового пальца 16 и ВТВ (для BR-C, ttk и bab), белок цинкового пальца 145 (подобный Круппелю, экспрессируемый при промиелоцитарном лейкозе)); TGFBR1 (бета-рецептор 1 трансформирующего фактора роста); LGALS3BP (белок, связывающий галектин-3); CD5(поверхностный гликопротеин Т-клеток CD5); CD4 (поверхностный гликопротеин Т-клеток CD4); LRRN3 (нейрональный нейрон 3 с богатыми лейцином повторами); SLC40A1 (член 1 семейства 40 носителей растворенного вещества); CYSLTR1 (цистеиниллейкотриеновый рецептор 1); H4C3 (кластеризованный гистон 3 H4); CISH (цитокин-индуцируемый белок SH2 (Src Homology 2), содержащий белок); CD8B (бета-цепь поверхностного гликопротеина CD8Т-клеток); MAL (Mal, белок дифференциации Т-клеток, белок миелина и лимфоцитов); SUN2 (домен Sad1 и Unc84, содержащий 2 белка, взаимодействующий с Rab5); CCR7 (рецептор 7 хемокина мотива CC); GNLV (гранулизин); ANKLE2 (анкириновый повтор и домен LEM (LAP2, emerin, MAN1), содержащий 2); PSIP1 (PC4 (положительный кофактор 4) и SFRS1 (богатый серином и аргинином фактор сплайсинга 1), взаимодействующий белок 1, фактор роста, полученный из эпителия хрусталика); PITPNA (альфа-белок, переносящий фосфатидилинозитол); RBM15B (белок 15B мотива связывания РНК); PTPRA (протеинтирозинфосфатазный рецептор типа A); MARK2 (киназа 2, регулирующая аффинность микротрубочек); BLOC1S4 (субъединица 4 комплекса 1 лизосомальных органелл биогенеза); SIAH2 (убиквитинпротеинлигаза 2 Siah E3); MXD4 (белок максимальной димеризации 4); SRM (спермидинсинтаза); SESN1 (сестрин 1); SSBP4 (белок 4, связывающий одноцепочечную ДНК); TAF10 (фактор 10, ассоциированный с белком связывания TATA-Box); DUSP2 (фосфатаза двойной специфичности 2); LPCAT1 (лизофосфатидилхолин-ацилтрансфераза 1); RASAL3 (активатор белка Ras, подобный 3); TRIM65 (трехчастный мотив, содержащий 65);

FAM50A (член А семейства со сходством последовательностей 50); PIM3 (протоонкоген Pim-3, серин/треонинкиназа); SIPA1 (сигнал-индуцированная ассоциированная пролиферация 1); FAM89B (член В семейства 89 со сходством последовательностей); ZBTB7A (цинковый палец и домен ZBTB (для BR-C, ttk и bab), содержащий 7A, фактор, который связывается с индуктором белка 1 коротких транскриптов); NIN (найнин); NR1D2 (член 2 группы D подсемейства ядерных рецепторов 1); SIK3 (соль-индуцируемая киназа 3); ARHGAP26 (белок 26, активирующий Rho GTPase); IL18RAP (дополнительный белок рецептора интерлейкина 18); CNR2 (каннабиноидный рецептор 2); EOMES (эомезодермин); KLRC1 (рецептор C1, подобный лектину клеток-киллеров); SEL1L3 (супрессор Lin-12-подобного белка 3); IL12RB2 (субъединица рецептора интерлейкина 12 бета 2); COTL1 (коактозин-подобный F-актин-связывающий белок 1); PIK3AP1 (белок-адаптер фосфоинозитид-3-киназы 1); TBX21 (транскрипционный фактор T-Box 21); FAM43A (семейство со сходством последовательностей 43, член А); KLRD1 (рецептор D1, подобный лектину клеток-киллеров); SLAMF7 (представитель 7 семейства сигнальной молекулы активации лимфоцитов (SLAM)); S1PR5 (рецептор 5 сфингозин-1-фосфата); LAG3 (активирующий лимфоциты 3); ABCG1 (представитель 1 подсемейства G ATP-связывающей кассеты); S100B (кальций-связывающий белок S100, бета); CCL22 (CC-мотив, хемокиновый лиганд 22); CEBPD (CCAAT box Enhancer Binding Protein Delta); IL17F (интерлейкин 17F); и CEACAM1 (молекула клеточной адгезии CEA 1); (см., например, **Фиг. 3В**).

[00304] В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, демонстрирует более разнообразный репертуар TCR по сравнению с Т-клетками, полученными без использования таких способов. В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет значение продуктивной клональности Симпсона равное приблизительно 0,000-0,025. Значение ближе к 0 представляет более высокий уровень разнообразия по сравнению с клональностью. Значение ближе к 1 представляет более высокий уровень клональности по сравнению с разнообразием. В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет значение продуктивной клональности Симпсона по меньшей мере 0,01, по меньшей мере 0,015, по меньшей мере 0,02, по меньшей мере 0,025, по меньшей мере 0,03, по меньшей мере 0,035, по меньшей мере 0,04, по меньшей мере 0,045, по меньшей мере 0,05, по меньшей мере 0,055, по

меньшей мере 0,06, по меньшей мере 0,065, по меньшей мере 0,07, по меньшей мере 0,075, по меньшей мере 0,08, по меньшей мере 0,085, по меньшей мере 0,09, по меньшей мере 0,095 или по меньшей мере 0,1. В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет значение продуктивной клональности по Симпсону, равное приблизительно 0,025; (см., например, **Фиг. 4**).

[00305] Каждый вариабельный домен α -цепи Т-клеточного рецептора (TCR) и β -цепи имеет три гипервариабельных или определяющих комплементарность участка (CDR; например, CDR1, CDR2, CDR3). В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученных способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, демонстрирует увеличенную длину CDR (например, CDR1, CDR2, CDR3) по сравнению с Т-клетками, полученными с использованием стромальных способов или без ингибирования эпигенетического регулятора. В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет длину CDR (например, CDR1, CDR2, CDR3), которая в среднем составляет приблизительно 3 нуклеотидов (нт), 6 нуклеотидов, 9 нуклеотидов или 12 нуклеотидов или более длинное, чем CDR Т-клеток, полученных способом с использованием стромы или без ингибирования эпигенетического регулятора. В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет длину CDR (например, CDR1, CDR2, CDR3), которая составляет в среднем приблизительно 27 нуклеотидов, 30 нуклеотидов, 33 нуклеотида, 36 нуклеотидов, 39 нуклеотидов, 42 нуклеотидов, 45 нуклеотидов, 48 нуклеотидов, 51 нуклеотидов, 54 нуклеотидов, 57 нуклеотидов или 60 нуклеотидов или более (см., например, **Фиг. 5A-5D**). В некоторых вариантах выполнения популяция Т-клеток, полученная способами без использования стромы и/или с ингибированием эпигенетического регулятора, как описано здесь, имеет длину CDR3, которая в среднем составляет приблизительно 42 нуклеотидов, по сравнению со средним значением 39 нуклеотидов для контрольных Т-клеток, происходящих из iPSC, или со средним значением 45 для Т-клеток, происходящих из моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) (см., например, **Фиг. 5C**).

Генетические модификации Т-клеток

[00306] В некоторых вариантах выполнения полученная популяция CD34+ гемогенного эндотелия или другая популяция, как описано здесь (например, ESCs; iPSC;

HSCs; CD5+CD7+ Pro T-клетки; CD3+ T-клетки; CD4+CD8+ T-клетки; CD4+ T-клетки; CD8+ T-клетки) являются генетически модифицированными. В некоторых вариантах выполнения locus нативного T-клеточного рецептора может быть удален и/или заменен для повышения целевой специфичности. В некоторых вариантах выполнения можно отредактировать или удалить эндогенный HLA (например, главные комплексы гистосовместимости класса I и/или класса II). В некоторых вариантах выполнения генетическая модификация может включать введение и экспрессию неканонических HLA-G и HLA-E для предотвращения лизиса, опосредованного NK-клетками (см., например, Riobobos L et al. 2013), что может обеспечить источник универсальных T-клеток для иммунотерапии, например, иммунотерапии рака.

[00307] В некоторых вариантах выполнения генетическая модификация предусматривает экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR). Химерные антигенные рецепторы (CAR, также известные как химерные иммунорецепторы, химерные рецепторы T-клеток или искусственные рецепторы T-клеток) представляют собой рецепторные белки, которые были сконструированы для придания T-клеткам новой способности нацеливаться на определенный белок. Рецепторы являются химерными, поскольку они объединяют в одном рецепторе как антигенсвязывающую, так и активирующую функцию T-клетки. Способы конструирования T-клеток с химерным антигенным рецептором (также известных как T-клетки CAR) известны в данной области. См., например, патенты США US7446190, US8399645, US8822647, US9212229, US9273283, US9447194, US9587020, US9932405, US10125193, US10221245, US10273300, US10287354; публикацию патента США US20160152723; публикации заявок PCT WO2009091826, WO2012079000, WO2014165707, WO2015164740, WO2016168595A1, WO2017040945, WO2017100428, WO2017117112, WO2017149515, WO2018067992, WO2018102787, WO2018102786, WO2018165228, WO2019084288; содержание каждого из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00308] В некоторых вариантах выполнения способы генетической модификации клетки для экспрессии CAR могут предусматривать, но без ограничения: трансфекцию или электропорацию клетки вектором, кодирующим CAR; трансдукцию вирусным вектором (например, ретровирусом, лентивирусом), кодирующим CAR; редактирование генов с использованием нуклеаз цинковых пальцев (ZFN), эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (TALEN), мегануклеаз-TALEN или CRISPR-Cas; или любые другие известные в данной области способы генетической модификации клеток для экспрессии CAR.

[00309] Предпочтительно, когда популяция клеток на ранней стадии дифференциации (например, ESC, PSC, iPSC, гемогенный эндотелий, HSC) генетически модифицирована с помощью CAR.

[00310] В некоторых вариантах выполнения антигенсвязывающая область CAR направлена против антигена, вовлеченного в заболевание или расстройство, такое как, но без ограничения, рак, аутоиммунное заболевание или заболевание сердца (например, сердечный фиброз). Используемый здесь термин «рак» обычно относится к классу заболеваний или состояний, при которых аномальные клетки бесконтрольно делятся и могут проникать в близлежащие ткани. Раковые клетки также могут распространяться в другие части тела через кровеносную и лимфатическую системы. Существует несколько основных видов рака. Карцинома - это рак, который начинается в коже или в тканях, выстилающих или покрывающих внутренние органы. Саркома - это рак, который начинается в костях, хрящах, жире, мышцах, кровеносных сосудах или другой соединительной или поддерживающей ткани. Лейкемия - это рак, который начинается в кроветворной ткани, такой как костный мозг, и вызывает образование большого количества аномальных клеток крови, которые попадают в кровь. Лимфома и множественная миелома - это виды рака, которые начинаются в клетках иммунной системы. Рак центральной нервной системы - это рак, который начинается в тканях головного и спинного мозга.

[00311] В некоторых вариантах выполнения рак представляет собой первичный рак. В некоторых вариантах выполнения рак представляет собой злокачественный рак. Используемый здесь термин «злокачественный» относится к раку, при котором группа опухолевых клеток демонстрирует одно или несколько из неконтролируемого роста (т.е. деления за пределами нормы), инвазии (т.е. интрузии и разрушения соседних тканей) и метастазирование (т.е. распространение в другие места тела через лимфу или кровь). Используемый здесь термин «метастазировать» относится к распространению рака из одной части тела в другую. Опухоль, образованная распространившимися клетками, называется «метастатической опухолью» или «метастазом». Метастатическая опухоль содержит клетки, подобные клеткам исходной (первичной) опухоли. Используемый здесь термин «доброкачественный» или «незлокачественный» относится к опухолям, которые могут увеличиваться в размерах, но не распространяются на другие части тела. Доброкачественные опухоли самокупируются и, как правило, не инвазируют и не метастазируют.

[00312] «Раковая клетка» или «опухолевая клетка» относится к отдельной клетке ракового образования или ткани. Опухоль обычно относится к отеку или

повреждению, образованному аномальным ростом клеток, которое может быть доброкачественным, предраковым или злокачественным. Большинство раковых клеток образуют опухоли, но некоторые, например, лейкемические, не обязательно образуют опухоли. Для тех раковых клеток, которые образуют опухоли, термины рак (клетка) и опухоль (клетка) используются взаимозаменяемо.

[00313] Используемый здесь термин «новообразование» относится к любому новому и аномальному росту ткани, например, аномальной массе ткани, рост которой превышает рост нормальных тканей и не скоординирован с ним. Таким образом, новообразование может быть доброкачественным новообразованием, предраковым новообразованием или злокачественным новообразованием.

[00314] Субъект, у которого имеется рак или опухоль, представляет собой субъекта, имеющего в теле объективно поддающиеся измерению раковые клетки. В это определение включены злокачественные, активно пролиферативные виды рака, а также потенциально латентные опухоли или микрометастазы. Рак, который мигрирует из своего первоначального местоположения и заражает другие жизненно важные органы, может в конечном итоге привести к смерти субъекта из-за функционального ухудшения пораженных органов.

[00315] Примеры рака включают, но без ограничения, карциному, лимфому, бластому, саркому, лейкемию, базально-клеточную карциному, рак желчных путей; Рак мочевого пузыря; рак кости; рак головного мозга и ЦНС; рак молочной железы; рак брюшины; рак шейки матки; хориокарцинома; рак толстой и прямой кишки; рак соединительной ткани; рак пищеварительной системы; рак эндометрия; рак пищевода; рак глаз; рак головы и шеи; рак желудка (включая рак желудочно-кишечного тракта); глиобластому (GBM); карциному печени; гепатому; интраэпителиальное новообразование; рак почки или почечный рак; рак гортани; лейкемию; рак печени; рак легкого (*например*, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого); лимфому, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому; меланому; миелому; нейробластому; рак ротовой полости (*например*, рак губы, языка, рта и глотки); рак яичников; панкреатический рак; рак простаты; ретинобластому; рабдомиосаркому; рак прямой кишки; рак дыхательной системы; рак слюнной железы; саркому; рак кожи; плоскоклеточный рак; рак желудка; рак яичек; рак щитовидной железы; рак матки или эндометрия; рак мочевыделительной системы; рак вульвы; а также другие карциномы и саркомы; а также В-клеточную лимфому (включая низкодифференцированную/фолликулярную неходжкинскую лимфому (NHL); малую лимфоцитарную (SL) NHL; промежуточную/фолликулярную NHL;

промежуточную диффузную NHL; иммунобластную NHL высокой степени злокачественности; лимфобластную NHL высокой степени злокачественности; мелкоклеточную NHL с нерасщепленными клетками, крупноклеточную NHL, мантийноклеточную лимфому, лимфому, связанную со СПИДом, и макроглобулинемию Вальденстрема); хронический лимфолейкоз (CLL); острый лимфобластный лейкоз (ALL); волосатоклеточный лейкоз; хронический миелобластный лейкоз; и посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание (PTLD), а также аномальную пролиферацию сосудов, связанную с факоматозами, отеками (например, связанными с опухолями головного мозга) и синдромом Мейгса. Предпочтительно, в случае CAR T-терапии, рак представляет собой рак крови, такой как лейкоemia или лимфома.

[00316] Иммунотерапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR) предлагает многообещающий способ для повышения показателей излечения и снижения заболеваемости у пациентов с раком. В этом отношении терапия CD19-специфическими CAR Т-клетками достигла резкого объективного ответа у большого процента пациентов с CD19-положительным лейкозом или лимфомой. Соответственно, в некоторых вариантах выполнения антигенсвязывающая область CAR направлена против CD19; см., например, патенты США US10221245, US10357514; публикацию патента США US20160152723; публикацию заявки PCT WO 2016033570; содержание каждого из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00317] Опухолевые антигены представляют собой белки, продуцируемые опухолевыми клетками, которые вызывают иммунный ответ, особенно иммунный ответ, опосредованный Т-клетками. Выбор антигенсвязывающего домена по изобретению будет зависеть от конкретного типа рака, подлежащего лечению. Опухолевые антигены хорошо известны в данной области и включают, например, антиген, ассоциированный с глиомой, карциноэмбриональный антиген (CEA), EGFRvIII, IL-11Ra, IL-13Ra, EGFR, B7H3, Kit, CA-IX, CS-1, MUC1, BCMA, bcr-abl, HER2, β -хорионический гонадотропин человека, альфафетопроtein (АФП), ALK, CD19, CD123, циклин В 1, лектин-реактивный АФП, Fos-родственный антиген 1, ADRB3, тиреоглобулин, EphA2, RAGE- 1, RU1, RU2, SSX2, AKAP-4, LCK, OY-TES1, PAX5, SART3, CLL-1, фукозил GM1, GloboH, MN-CA IX, EPCAM, EVT6-AML, TGS5, теломеразную обратную транскриптазу человека, пилисальную кислоту, PLAC1, RU1, RU2 (AS), карбоксилэстеразу кишечника, lewisY, sLe, LY6K, mut hsp70-2, M-CSF, MYCN, RhoC, TRP-2, CYP1B1, BORIS, простагу, простатспецифический антиген (PSA), PAX3, PAP, NY-ESO-1, LAGE-1a, LMP2, NCAM, p53, мутант p53, мутант Ras, gp100, простаин, OR51E2, PANX3, PSMA, PSCA, Her2/neu,

hTERT, HMWMAA, HAVCR1, VEGFR2, PDGFR-бета, легумаин, HPV E6, E7, сурвивин и теломеразу, белок спермы 17, SSEA-4, тирозиназу, TARP, WT1, раковый антиген карциномы простаты-1 (PCTA-1), ML-IAP, MAGE, MAGE-A1, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MelanA/MART1, XAGE1, ELF2M, ERG (слитый ген TMPRSS2 ETS), NA17, нейтрофильная эластаза, точки останова транслокации саркомы, NY-BR-1, эфрин B2, CD20, CD22, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44v6, CD97, CD171, CD179a, рецептор андрогена, фактор роста инсулина (IGF)-I, IGF-II, рецептор IGF-I, GD2, о-ацетил-GD2, GD3, GM3, GPRC5D, GPR20, CXORF61, рецептор фолиевой кислоты (FRa), бета-рецептор фолиевой кислоты, ROR1, Flt3, TAG72, TN Ag, Tie 2, TEM1, TEM7R, CLDN6, TSHR, UPK2 и мезотелин. В предпочтительном варианте выполнения опухолевый антиген выбран из группы, состоящей из рецептора фолиевой кислоты (FRa), мезотелина, EGFRvIII, IL-13Ra, CD123, CD19, CD33, BCMA, GD2, CLL-1, CA-IX, MUC1, HER2 и любой их комбинации; см., например, публикации патентов США 20170209492 и 20180022795, содержание каждой из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

Клеточная заместительная терапия

[00318] В одном варианте выполнения предоставлена популяция сконструированных иммунных клеток, полученная описанным здесь способом, где популяция Т-клеток получена с использованием способа дифференциации без стромы, описанного здесь. В некоторых вариантах выполнения популяция сконструированных иммунных клеток включает иммунную клетку, дифференцированную с использованием способов, описанных здесь, включая, но без ограничения: PSC; iPSC; гемогенный эндотелий; HSC; CD5+CD7+ Pro Т-клетки; CD3+ Т-клетки; CD4+CD8+ Т-клетки; CD4+ Т-клетки; CD8+ Т-клетки. В некоторых вариантах выполнения иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, наиболее сходный с альфа-бета Т-клетками.

[00319] В одном варианте выполнения популяция клеток дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Эти сконструированные иммунные клетки можно размножить в культуре, чтобы увеличить количество используемых клеток.

[00320] Описанные здесь сконструированные иммунные клетки можно использовать в лаборатории для биологических исследований. Например, эти клетки могут быть получены от человека, страдающего генетическим заболеванием или дефектом, и использоваться в лаборатории для изучения биологических аспектов заболевания или дефекта, а также для скрининга и тестирования потенциального лекарства от этого заболевания или дефекта.

[00321] Альтернативно, сконструированные иммунные клетки, описанные здесь, можно использовать в клеточной заместительной терапии и в другом медицинском лечении субъектов, нуждающихся в этом. Например, у пациентов, перенесших химиотерапию или облучение, или и то, и другое, и проявляющих недостаточность иммунной функции и/или восстановления лимфоцитов, или для иммунотерапии рака.

[00322] В различных вариантах выполнения сконструированные иммунные клетки, описанные здесь, вводят (т.е. имплантируют или трансплантируют) субъекту, нуждающемуся в клеточной заместительной терапии.

[00323] В одном варианте выполнения в настоящем документе предложен способ клеточной заместительной терапии или лечения рака, аутоиммунных заболеваний, гематологических заболеваний или других генетических заболеваний и нарушений у субъекта, предусматривающий: (a) получение соматических клеток от субъекта-донора, (b) получение многолинейных гемопоэтических клеток-предшественников (например, гемогенного эндотелия, HSPC) из плюрипотентных стволовых клеток, полученных из соматической клетки, как описано в любом из предыдущих параграфов; (c) необязательное ингибирование гистонметилтрансферазы в полученной популяции многолинейных гемопоэтических клеток-предшественников, как описано в любом из предыдущих параграфов; (d) дифференциацию полученной популяции гемопоэтических клеток-предшественников с несколькими линиями в присутствии лиганда Notch для стимуляции дифференциации в лимфоидную линию (например, Т-клетки), как описано в любом из предыдущих параграфов, и (e) имплантацию или введение полученной дифференцированных лимфоидных клеток в субъект-реципиент.

[00324] В одном варианте выполнения субъект-хозяин и субъект-реципиент являются одним и тем же лицом. В качестве альтернативы субъект-хозяин и субъект-реципиент не являются одним и тем же человеком, но по меньшей мере они совместимы по HLA.

[00325] Гематологические заболевания - это нарушения, которые в первую очередь поражают кровь. Неограничивающие такие заболевания или расстройства включают миелоидные нарушения, такие как гемоглобинопатии (врожденная аномалия молекулы гемоглобина или скорости синтеза гемоглобина), например, серповидно-клеточная анемия, талассемия и метгемоглобинемия; анемии (недостаток эритроцитов или гемоглобина), пернициозная анемия; нарушения, приводящие к уменьшению количества клеток, такие как миелодиспластический синдром, нейтропения (уменьшение количества нейтрофилов) и тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТП), тромбоцитоз, гематологические злокачественные новообразования, такие как лимфомы, миеломы и

лейкемия, лимфомы, такие как болезнь Ходжкина, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта, анапластическая крупноклеточная лимфома, лимфома маргинальной зоны селезенки, гепатолиенальная Т-клеточная лимфома и ангиоиммуобластная Т-клеточная лимфома (AITL); миеломы, такие как множественная миелома, макроглобулинемия Вальденстрема, плазмоцитома; лейкозы, которые увеличивают дефект WBC, такие как острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хронический лимфолейкоз (CLL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический идиопатический миелофиброз (MF), хронический миелогенный лейкоз (CML), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (B-PLL), хронический нейтрофильный лейкоз (CNL), волосатоклеточный лейкоз (HCL), Т-клеточный крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз (T-LGL) и агрессивный NK-клеточный лейкоз.

[00326] В настоящем документе предложен способ лечения аутоиммунного заболевания, который предусматривает введение эффективного количества иммунных клеток или их популяции, или композиции, или фармацевтической композиции, как описано здесь, нуждающемуся в этом пациенту. «Аутоиммунное заболевание» относится к классу заболеваний, при которых собственные антитела субъекта реагируют с тканью хозяина или при которых иммунные эффекторные Т-клетки являются аутореактивными по отношению к эндогенным собственным пептидам и вызывают разрушение ткани. Таким образом, иммунный ответ устанавливается против собственных антигенов субъекта, называемых аутоантигенами. Используемый здесь термин «аутоантиген» относится к антигену нормальной ткани хозяина. Нормальная ткань хозяина не включает опухолевые клетки.

[00327] Неограничивающие примеры аутоиммунных заболеваний, которые можно лечить, включают пузырчатку (вульгарную пузырчатку, листовидную пузырчатку или паранеопластическую пузырчатку), болезнь Крона, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), гепарин-индуцированную тромбоцитопению (НИТ), тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП), тяжелую миастению (MG) и хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIPD). Дополнительные неограничивающие аутоиммунные заболевания включают аутоиммунную тромбоцитопению, иммунную нейтропению, антигемофильный ингибитор FVIII, антифосфолипидный синдром, синдром Кавасаки, ANCA-ассоциированное заболевание, полимиозит, буллезный пемфигоид, рассеянный склероз (MS), синдром Гийена-Барре, хроническую полинейропатию, язвенный колит, сахарный диабет, аутоиммунный тиреоидит, офтальмопатию Грейвса, ревматоидный артрит, язвенный колит, первичный склерозирующий холангит, системную красную волчанку (SLE),

аутоиммунный энцефаломиелит, тиреоидит Хашимото, синдром Гудпасчера, аутоиммунную гемолитическую анемию, склеродермию с антиколлагеновыми антителами, смешанное заболевание соединительной ткани, пернициозную анемию, идиопатическую болезнь Аддисона, аутоиммунное бесплодие, гломерулонефрит (например, серповидный гломерулонефрит, пролиферативный гломерулонефрит), резистентность к инсулину и аутоиммунный сахарный диабет (сахарный диабет 1 типа; инсулинозависимый сахарный диабет). Было признано, что аутоиммунное заболевание включает также атеросклероз и болезнь Альцгеймера. В другом варианте выполнения аутоиммунные заболевания включают гепатит, аутоиммунную гемофилию, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунный увеоретинит, гломерулонефрит, агаммаглобулинемию, очаговую алопецию, амилоидоз, анкилозирующий спондилит, аутоиммунный ангионевротический отек, аутоиммунную апластическую анемию, аутоиммунную дисавтономию, аутоиммунную гиперлипидемию, аутоиммунный иммунодефицит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный миокардит, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунную ретинопатию, аутоиммунную крапивницу, аутоиммунную уртикарную невропатию, аутоиммунную аксональную невропатию, болезнь Бало, болезнь Бехчета, болезнь Кастлемана, глютенную болезнь, болезнь Шагаса, хронический рецидивирующий многоочаговый остеомиелит (CRMO), синдром Чарга-Стросса, рубцовый пемфигоид, доброкачественный пемфигоид слизистых оболочек, синдром Когана, болезнь холодowych агглютининов, миокардит Коксаки, CREST-болезнь, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, болезнь Девика (оптикомиелит), дилатационную кардиомиопатию, дискоидную волчанку, синдром Дресслера, эндометриоз, эозинофильный ангиоцентрический фиброз, эозинофильный фасциит, узловатую эритему, синдром Эванса, фиброзирующий альвеолит, гигантоклеточный артериит (височный артериит), энцефалит Хашимото, пурпuru Шенлейна-Геноха, герпес беременных, идиопатический гипокomплементемический тубулоинтестит, множественную миелому, мультифокальную моторную невропатию, энцефалит с антителами к NMDA-рецептору, IgG4-ассоциированное заболевание, IgG4-ассоциированное склерозирующее заболевание, воспалительную аневризму аорты, воспалительную псевдоопухоль, миозит с включениями, интерстициальный цистит, ювенильный артрит, опухоль Каттнера, синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, красный плоский лишай, склерозирующий лишай, деревянистый конъюнктивит, линейную IgA-болезнь (LAD), болезнь Лайма, хронический медиастинальный фиброз, болезнь Меньера, микроскопический полиангиит, синдром Микулича, язву Мурена, болезнь Мухи-

Габермана, многоочаговый фибросклероз, нарколепсию, неврит зрительного нерва, болезнь Ормонда (забрюшинный фиброз), палиндромный ревматизм, PANDAS (детские аутоиммунные нервно-психические расстройства, ассоциированные со стрептококками), паранеопластическую дегенерацию мозжечка, парапротеинемические полиневропатии, пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), синдром Парри-Ромберга, синдром Парсоннеджа-Тернера, периаортит, периаартериит, периферическую невропатию, перивенозный энцефаломиелит, синдром ROEMS, узелковый полиартериит, аутоиммунные полигландулярные синдромы I, II и III типа, ревматическую полимиалгию, постперикардотомный синдром, прогестероновый дерматит, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, идиопатический легочный фиброз, гангренозную пиодермию, истинную эритроцитарную аплазию, болезнь Рейно феномен, рефлекторную симпатическую дистрофию, синдром Рейтера, рецидивирующий полихондрит, синдром беспокойных ног, ревматическую лихорадку, тиреоидит Риде, саркоидоз, синдром Шмидта, склерит, синдром Шегрена, аутоиммунитет сперматозоидов и яичек, синдром ригидности, подострый бактериальный эндокардит (SBE), синдром Сусака, симпатическую офтальмию, артериит Такаясу, синдром Толоса-Ханта, поперечный миелит, недифференцированное заболевание соединительной ткани (UCTD), везикулобуллезный дерматоз, витилиго, энцефалит Расмуссена, макроглобулинемию Вальденстрема.

[00328] Используемые здесь термины «введение» и «трансплантация» используются взаимозаменяемо в контексте размещения описанных клеток, например гемопоэтических клеток-предшественников, в организме субъекта с помощью способа или пути, который приводит по меньшей мере к частичной локализации введенных клеток в желаемом месте, таком как место повреждения или репарации, таким образом, чтобы получить желаемый(ые) эффект(ы). Клетки, например гемопоэтические клетки-предшественники, или их дифференцированное потомство (например, Т-клетки), можно вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в желаемое место у субъекта, где остается по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов жизнеспособных клеток.

[00329] В различных вариантах выполнения сконструированные иммунные клетки, описанные здесь, необязательно размножаются *ex vivo* перед введением субъекту. В других вариантах выполнения сконструированные иммунные клетки необязательно подвергают криоконсервации в течение определенного периода времени, а затем размораживают перед введением субъекту.

[00330] Сконструированные иммунные клетки, используемые для клеточной заместительной терапии, могут быть аутологичными/аутогенными («своими») или неаутологичными («не своими», например, аллогенными, сингенными или ксеногенными) по отношению к реципиенту клеток. Термин «аутологичный» в контексте настоящего описания относится к клеткам одного и того же субъекта. Термин «аллогенный», как используется в настоящем документе, относится к клеткам одного и того же вида, которые генетически отличаются от клеток по сравнению с ними. Термин «сингенный», используемый в настоящем документе, относится к клеткам другого субъекта, которые генетически идентичны клеткам по сравнению с ними. Термин «ксеногенный», используемый здесь, относится к клеткам другого вида по сравнению с клеткой. В предпочтительных вариантах выполнения клетки по изобретению являются аллогенными.

[00331] В различных вариантах выполнения сконструированная иммунная клетка, описанная здесь, которая должна быть имплантирована нуждающемуся в этом субъекту, является аутологичной или аллогенной по отношению к субъекту.

[00332] В различных вариантах выполнения сконструированная иммунная клетка, описанная здесь, может быть получена от одного или нескольких доноров или может быть получена из аутологичного источника. В некоторых вариантах выполнения сконструированные иммунные клетки размножают в культуре перед введением нуждающемуся в этом субъекту.

[00333] В различных вариантах выполнения сконструированная иммунная клетка, описанная здесь, может быть получена от одного или нескольких доноров или может быть получена из аутологичного источника.

[00334] В различных вариантах выполнения перед имплантацией субъект-реципиент подвергается химиотерапии и/или облучению.

[00335] В одном варианте выполнения химиотерапия и/или облучение направлены на уменьшение количества эндогенных стволовых клеток для облегчения приживания имплантированных клеток.

[00336] В различных вариантах выполнения перед имплантацией сконструированные иммунные клетки или ингибированные гистонметилтрансферазой, многолинейные гемопоэтические клетки-предшественники или Т-клетки, дифференцированные способом без использования стромы, как описано здесь, обрабатывают *ex vivo* простагландином E2 и/или антиоксидантом N-ацетил-L-цистеин (NAC) для стимуляции последующего приживания трансплантата у субъекта-реципиента.

[00337] В различных вариантах выполнения субъект-реципиент представляет собой человека.

[00338] В различных вариантах выполнения у субъекта ранее был диагностирован ВИЧ или другое вирусное заболевание, гематологическое заболевание или он проходил лечение от рака.

[00339] В одном варианте выполнения субъект выбирается для донорства соматической клетки, которая будет использоваться для получения iPSC и сконструированной иммунной клетки, описанной здесь. В одном варианте выполнения выбранный субъект имеет генетическое заболевание или дефект.

[00340] В различных вариантах выполнения донором является человек, животное, отличное от человека, грызун или не грызун. Например, субъектом может быть любое млекопитающее, например, человек, другой примат, свинья, грызун, такой как мышь или крыса, кролик, морская свинка, хомяк, корова, лошадь, кошка, собака, овца или коза, или не-млекопитающее, такое как птица.

[00341] В различных вариантах выполнения у донора ранее был диагностирован ВИЧ, гематологическое заболевание или рак.

[00342] В одном варианте выполнения от субъекта-донора получают биологический образец, популяцию эмбриональных стволовых клеток, соматических стволовых клеток, клеток-предшественников, клеток костного мозга, гемопоэтических стволовых клеток или гемопоэтических стволовых клеток.

[00343] В различных вариантах выполнения биологический образец, популяция эмбриональных стволовых клеток, соматических стволовых клеток, клеток-предшественников, клеток костного мозга, гемопоэтических стволовых клеток или гемопоэтических клеток-предшественников, описанные здесь, могут быть получены от одного или нескольких доноров или могут быть получены от аутологичного источника.

[00344] В одном варианте выполнения эмбриональные стволовые клетки, соматические стволовые клетки, клетки-предшественники, клетки костного мозга, гемопоэтические стволовые клетки, гемопоэтические клетки-предшественники выделяют от субъекта-донора, трансфицируют, культивируют (необязательно) и трансплантируют обратно тому же субъекту, т.е. выполняют трансплантацию аутологичных клеток. Здесь донор и реципиент - один и тот же человек. В другом варианте выполнения эмбриональные стволовые клетки, соматические стволовые клетки, клетки-предшественники, клетки костного мозга, гемопоэтические стволовые клетки или гемопоэтические клетки-предшественники выделяют от донора, который соответствует типу HLA у субъекта (реципиента). Совпадение типов антигенов донор-реципиент

хорошо известно в данной области. Типы HLA включают HLA-A, HLA-B, HLA-C и HLA-D. Они представляют собой минимальное количество совпадений антигенов клеточной поверхности, необходимое для трансплантации. То есть трансфицированные клетки трансплантируют другому субъекту, аллогенно реципиентному субъекту-хозяину. Эмбриональные стволовые клетки донора или субъекта, соматические стволовые клетки, клетки-предшественники, клетки костного мозга, гемопоэтические стволовые клетки или гемопоэтические клетки-предшественники могут быть трансфицированы вектором или нуклеиновой кислотой, содержащей молекулу(ы) нуклеиновой кислоты, как описано здесь, трансфицированные клетки культивируют, ингибируют и дифференцируют, как описано здесь, необязательно размножают и затем трансплантируют субъекту-реципиенту. В одном варианте выполнения трансплантированные сконструированные иммунные клетки приживаются у субъекта-реципиента. В одном варианте выполнения трансплантированные сконструированные иммунные клетки восстанавливают иммунную систему субъекта-реципиента. Трансфицированные клетки также могут быть подвергнуты криоконсервации после трансфекции и хранения или криоконсервации после размножения клеток и их хранения.

[00345] Сконструированные иммунные клетки или ингибированные гистонметилтрансферазой многолинейные гемопоэтические клетки-предшественники или Т-клетки, дифференцированные способом без использования стромы, как описано здесь, можно вводить как часть трансплантации костного мозга или пуповинной крови индивидууму, у которого была или не была операция по удалению костного мозга. В одном варианте выполнения рассматриваемые здесь генетически модифицированные клетки вводят при трансплантации костного мозга индивидууму, прошедшему химиоаблативную или радиоаблативную терапию костного мозга.

[00346] В одном варианте выполнения дозу клеток вводят субъекту внутривенно. В одном варианте выполнения клетки вводят субъекту внутривенно.

[00347] В конкретных вариантах выполнения пациенты получают дозу модифицированных клеток, описанных здесь, например, сконструированных иммунных клеток или ингибированных гистонметилтрансферазой, многолинейных гемопоэтических клеток-предшественников или Т-клеток, дифференцированных способом без использования стромы, как описано здесь, составляющую приблизительно 1×10^5 клеток/кг, приблизительно 5×10^5 клеток/кг, приблизительно 1×10^6 клеток/кг, приблизительно 2×10^6 клеток/кг, приблизительно 3×10^6 клеток/кг, приблизительно 4×10^6 клеток/кг, приблизительно 5×10^6 клеток/кг, приблизительно 6×10^6 клеток/кг, приблизительно 7×10^6 клеток/кг, приблизительно 8×10^6 клеток/кг, приблизительно $9 \times$

10^6 клеток/кг, приблизительно 1×10^7 клеток /кг, приблизительно 5×10^7 клеток/кг, приблизительно 1×10^8 клеток/кг или более, в одной разовой внутривенной дозе.

[00348] В некоторых вариантах выполнения пациенты получают дозу модифицированных клеток, описанных здесь, например, сконструированных иммунных клеток или ингибированных гистонметилтрансферазой, многолинейных гемопоэтических клеток-предшественников или Т-клеток, дифференцированных способом без использования стромы, как описано здесь, составляющую по меньшей мере 1×10^5 клеток/кг, по меньшей мере 5×10^5 клеток/кг, по меньшей мере 1×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 2×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 3×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 4×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 5×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 6×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 7×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 8×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 9×10^6 клеток/кг, по меньшей мере 1×10^7 клеток/кг, по меньшей мере 5×10^7 клеток/кг, по меньшей мере 1×10^8 клеток/кг или более, в одной разовой внутривенной дозе.

[00349] В дополнительном варианте выполнения пациенты получают дозу модифицированных клеток, описанных здесь, например, сконструированных иммунных клеток или ингибированных гистонметилтрансферазой, многолинейных гемопоэтических клеток-предшественников или Т-клеток, дифференцированных способом без использования стромы, как описано здесь, составляющую от приблизительно 1×10^5 клеток/кг до приблизительно 1×10^8 клеток/кг, от приблизительно 1×10^6 клеток/кг до приблизительно 1×10^8 клеток/кг, от приблизительно 1×10^6 клеток/кг до приблизительно 9×10^6 клеток/кг, от приблизительно 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, от приблизительно 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 8×10^6 клеток/кг, от приблизительно 2×10^6 клеток/кг до приблизительно 5×10^6 клеток/кг, от приблизительно 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 5×10^6 клеток/кг, от приблизительно 3×10^6 клеток/кг до приблизительно 4×10^8 клеток/кг или любую промежуточную дозу клеток/кг.

[00350] Как правило, сконструированные иммунные клетки или ингибированные гистонметилтрансферазой многолинейные гемопоэтические клетки-предшественники, описанные здесь, или Т-клетки, дифференцированных способом без использования стромы, как описано здесь, вводят в виде суспензии с фармацевтически приемлемым носителем. Например, в качестве лечебных композиций. Терапевтические композиции содержат физиологически переносимый носитель вместе с клеточной композицией и, необязательно по меньшей мере один дополнительный биоактивный агент, как описано здесь, растворенный или диспергированный в ней в качестве активного ингредиента. В предпочтительном варианте выполнения терапевтическая композиция не является по существу иммуногенной при введении млекопитающему или человеку в

терапевтических целях, если только это не является желательным. Специалисту в данной области понятно, что фармацевтически приемлемый носитель, используемый в клеточной композиции, не должен включать буферы, соединения, агенты криоконсервации, консерванты или другие агенты в количествах, которые существенно влияют на жизнеспособность клеток, подлежащих доставке. Композиция, содержащая клетки, может включать, например, осмотические буферы, которые позволяют поддерживать целостность клеточной мембраны, и, необязательно, питательные вещества для поддержания жизнеспособности клеток или улучшения приживания трансплантата при введении. Такие составы и суспензии известны специалистам в данной области и/или могут быть адаптированы для применения с описанными здесь клетками с использованием стандартных экспериментов.

[00351] Используемые здесь термины «фармацевтически приемлемый», «физиологически переносимый» и их грамматические вариации, когда они относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, используются взаимозаменяемо, и это означает, что материалы можно вводить млекопитающему или на него без возникновения нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, головокружение, расстройство желудка и тому подобное. Фармацевтически приемлемый носитель не будет способствовать возникновению иммунного ответа на агент, с которым он смешан, если только это не является желательным. Приготовление фармакологической композиции, которая содержит растворенные или диспергированные в ней активные ингредиенты, хорошо изучено в данной области техники и не должно ограничиваться конкретным составом. Обычно такие композиции готовят для инъекций либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, однако также можно приготовить твердые формы, подходящие для растворения или суспензирования в жидкости перед применением. Препарат также может быть эмульгирован или представлен в виде липосомальной композиции. Активный ингредиент можно смешивать с эксципиентами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом, в количествах, подходящих для использования в описанных здесь терапевтических способах. Подходящие эксципиенты включают, например, воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Кроме того, если желательно, композиция может содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, рН-буферные агенты и т.п., которые усиливают эффективность активного ингредиента. Терапевтическая композиция по настоящему изобретению может включать фармацевтически приемлемые соли ее компонентов. Фармацевтически приемлемые соли

включают кислотно-аддитивные соли (образованные из свободных аминогрупп полипептида), которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и другие. Физиологически переносимые носители хорошо известны в данной области. Примеры жидких носителей представляют собой стерильные водные растворы, которые не содержат материалов в дополнение к активным ингредиентам и воде, или содержат буфер, такой как фосфат натрия при физиологическом значении pH, физиологический раствор или и то и другое, например, фосфатно-солевой буфер. Кроме того, водные носители могут содержать более одной буферной соли, а также соли, такие как хлориды натрия и калия, декстроза, полиэтиленгликоль и другие растворенные вещества. Жидкие композиции могут также содержать жидкие фазы в дополнение к воде в композиции или без нее. Примерами таких дополнительных жидких фаз являются глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, и водно-масляные эмульсии. Количество активного агента, используемого в описанных здесь способах, которое будет эффективным при лечении конкретного расстройства или состояния, будет зависеть от характера расстройства или состояния и может быть определено стандартными клиническими методами. Подходящие фармацевтические носители описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, стандартном справочнике в этой области техники. Например, парентеральную композицию, пригодную для введения путем инъекции, готовят путем растворения 1,5% по массе активного ингредиента в 0,9% растворе хлорида натрия.

[00352] В одном варианте выполнения «фармацевтически приемлемый» носитель не включает среды для культивирования клеток *in vitro*.

[00353] В некоторых вариантах выполнения описанная композиция сконструированных иммунных клеток дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[00354] В различных вариантах выполнения субъекту-реципиенту вводят по меньшей мере вторую или последующую дозу клеток. Например, второе введение может быть проведено приблизительно в промежутке от одного дня до 30 недель после предыдущего введения. Два, три, четыре или более полных последовательных введения индивидууму могут быть осуществлены по мере необходимости, например, по решению квалифицированного клинициста.

[00355] Клеточная композиция может быть введена любым подходящим путем, который приводит к эффективной заместительной клеточной терапии субъекта, т.е. введение приводит к доставке в желаемое место у субъекта, куда доставляется по меньшей мере часть композиции, т.е. по меньшей мере 1×10^4 клеток доставляются в нужное место в течение определенного периода времени. Способы введения включают инъекцию, инфузию или инстилляцию, при этом «инъекция» включает, без ограничения, внутривенную, внутриартериальную, внутрижелудочковую, внутрисердечную инъекцию и инфузию. Для доставки клеток обычно предпочтительным является введение путем инъекции или инфузии.

[00356] Тестирование эффективности можно проводить во время курса лечения с использованием описанных здесь способов. Измерения степени тяжести ряда симптомов, связанных с конкретным заболеванием, отмечают до начала лечения, а затем в более поздний определенный период времени после начала лечения. В некоторых вариантах выполнения фармацевтическую композицию, содержащую иммунную клетку, описанную здесь, или ее популяцию, можно использовать для заместительной клеточной терапии у субъекта.

[00357] Соответственно, целью настоящего изобретения также является предоставление композиций модифицированных (также называемых сконструированных) клеток для применения в клеточной заместительной терапии *in vivo*, медицинской терапии, такой как иммунная терапия рака, и для исследований заболеваний *in vitro*, моделирования, лекарственного скрининга, а также в случае гематологических заболеваний.

[00358] Преимущество описанных здесь протоколов заключается в том, что способы обеспечивают почти постоянное массовое производство желаемых иммунных клеток или других типов гемопоэтических клеток (т.е. клеток, дифференцированных из мультипотентных HSC) из различных типов клеточных источников, из стволовых клеток, гемопоэтических клеток-предшественников, а также зрелых и дифференцированных соматических клеток, все из которых можно легко получить из тела пациента.

[00359] Полученные сконструированные иммунные клетки или сконструированные с ингибированием гистонметилтрансферазой, $CD34^+/CD38^{lo/-}$ гемопоэтические клетки-предшественники (например, гемогенный эндотелий) или Т-клетки, дифференцированных способом без использования стромы, как описано здесь, могут быть трансплантированы пациенту для различных медицинских процедур, таких как восстановительная терапия иммунной системы (например, после абляции костного мозга) или иммунотерапия (например, при лечении рака или аутоиммунных заболеваний).

Дополнительным преимуществом является то, что если донором исходных клеток и реципиентом сконструированных иммунных клеток является одно и то же лицо, то полученные сконструированные иммунные клетки имеют HLA, идентичный реципиенту, и это позволяет избежать иммунного отторжения трансплантата хозяина после трансплантации. Для пациентов-реципиентов, которые являются HLA-аллогенными по отношению к донору исходных клеток, иммунное отторжение трансплантата-хозяина значительно снижается.

[00360] Полученные сконструированные иммунные клетки или сконструированные с ингибированием гистонметилтрансферазой CD34+/CD38-гемопозитические клетки-предшественники или Т-клетки, дифференцированные с использованием способа без стромы, как описано здесь, также могут быть криоконсервированы до тех пор, пока они не понадобятся в будущем.

[00361] В настоящее время трансплантация костного мозга является наиболее признанной клеточной заместительной терапией при различных гематологических заболеваниях. Функциональной единицей трансплантата костного мозга являются гемопозитические стволовые клетки (HSC), которые находятся на вершине сложной клеточной иерархии и восполняют развитие крови на протяжении всей жизни. Нехватка HLA-совместимых HSC серьезно ограничивает возможности проведения трансплантации, моделирования заболеваний и скрининга лекарств. Таким образом, многие исследования были направлены на получение HSC из альтернативных источников. Достижения в перепрограммировании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) предоставили доступ к широкому спектру плюрипотентных клеток, специфичных для пациента, многообещающему источнику для моделирования заболеваний, лекарственного скрининга и клеточной терапии. Однако невозможность получения приживляемых гемопозитических стволовых клеток и клеток-предшественников из плюрипотентных стволовых клеток человека (hPSC) ограничила характеристику гематологических заболеваний анализами *in vitro*. Генерация HSC путем направленной дифференциации остается труднодостижимой, и существует потребность в новых подходах к этой проблеме.

[00362] Соответственно, в одном аспекте, как описано здесь, предложен способ клеточной заместительной терапии, где способ предусматривает введение иммунной клетки, описанной здесь, или ее популяции, или композиции, содержащей указанную иммунную клетку или ее популяцию, или фармацевтической композиции, содержащей указанную иммунную клетку или ее популяцию субъекту-реципиенту, нуждающемуся в этом.

[00363] В некоторых вариантах выполнения субъект-реципиент уже прошел химиотерапию и/или облучение. В некоторых вариантах выполнения субъект-реципиент имеет недостаточность иммунной функции и/или недостаточность восстановления лимфоцитов. В некоторых вариантах выполнения перед трансплантацией иммунную клетку или ее популяцию обрабатывают *ex vivo* простагландином E2 и/или антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином (NAC) для стимуляции последующего приживления трансплантата у субъекта-реципиента.

Наборы

[00364] Другой аспект, описанный здесь, относится к наборам для дифференциации Т-клеток с использованием способа без использования стромы, как описано здесь, среди прочего. В настоящем документе описаны компоненты набора, которые могут быть включены в один или несколько описанных здесь наборов.

[00365] В некоторых вариантах выполнения набор содержит эффективное количество факторов дифференциации CD3+ Т-клеток (например, IL-7, SCF, FLT3 и/или TPO); или эффективное количество факторов дифференциации iPSC (например, OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, nanog и/или LIN28); или эффективное количество факторов дифференциации гемогенного эндотелия (например, BMP4, SB-431542, CHIR99021, bFGF, VEGF, IL-6, IL-11, IGF-1, SCF и EPO); или эффективное количество факторов дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки (например, IL-15 и/или активатор Т-клеток, такой как активатор CD3/CD28 Т-клеток); или эффективное количество ингибитора эпигенетического регулятора (например, MC1568, CAI10591, UNC0224, UNC0638, A366, BRD4770, BIX01294, UNC0642, UNC0631, UNC0646, UNC0321, E72, BIX-01338, BRD9539, хетоцин или DCG066; например, РНК-интерферирующий агент EZH1). Как понятно специалисту в данной области, такие факторы клеточной дифференциации может поставляться в лиофилизированной форме или в концентрированной форме, которую можно разбавлять перед использованием с культивируемыми клетками. Предпочтительные составы включают те, которые нетоксичны для клеток и/или не влияют на скорость роста или жизнеспособность и т.п. Факторы дифференциации Т-клеток могут поставляться в аликвотах или в единичных дозах.

[00366] В некоторых вариантах выполнения набор включает сосуд для культивирования клеток, содержащий иммобилизованный лиганд Notch. В некоторых вариантах выполнения набор включает сосуд для культивирования клеток и лиганд Notch, который можно иммобилизовать в сосуде для культивирования клеток с помощью

реагентов и/или инструкций, представленных в нем. В некоторых вариантах выполнения набор не содержит стромальных клеток, как описано здесь.

[00367] В некоторых вариантах выполнения набор дополнительно содержит вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR.

[00368] В некоторых вариантах выполнения компоненты, описанные здесь, могут быть предоставлены по отдельности или в любой комбинации в виде набора. Набор включает компоненты, описанные здесь, например, композицию, содержащую лиганд Notch, который не содержит стромальные клетки, композицию(и), содержащую фактор(ы) дифференциации, композицию(и), которая(ые) включает вектор, содержащий, например, CAR, как описано далее. спецификация. Такие наборы могут необязательно включать один или несколько агентов, позволяющих обнаруживать маркеры созревания Т-клеток (например, CD5, CD7, CD3, CD4, CD8, TCRgd, альфа или бета TCR и т.д.), или их комбинацию. Такие наборы могут необязательно включать один или несколько агентов, позволяющих обнаруживать маркеры активации Т-клеток (например, CD107a, CD69, CD25, HLA-DR, IFNg, TNFa и т.п.), или их комбинацию. Такие наборы могут необязательно включать один или несколько агентов, позволяющих обнаруживать маркеры гемогенного эндотелия (например, CD34, CD38, CD45, KDR, CD235, CD43 и т.д.). Кроме того, набор дополнительно содержит информационный материал. Набор также может содержать субстрат для покрытия чашек для культивирования, такой как ламинин, фибронектин, поли-L-лизин или метилцеллюлоза.

[00369] В некоторых вариантах выполнения композиции в наборе могут поставляться в водонепроницаемом или газонепроницаемом контейнере, который в некоторых вариантах выполнения практически не содержит других компонентов набора. Например, реагент для дифференциации клеток может поставляться более чем в одном контейнере, например, он может поставляться в контейнере, содержащем достаточное количество реагента для заранее определенного количества анализов дифференциации, например, 1, 2, 3 или более. Один или несколько компонентов, как описано здесь, могут быть представлены в любой форме, например, в жидкой, сухой или лиофилизированной форме. Предпочтительно, чтобы описанные здесь компоненты были по существу чистыми и/или стерильными. Когда описанные здесь компоненты представлены в виде жидкого раствора, и жидкий раствор предпочтительно представляет собой водный раствор, при этом предпочтительным является стерильный водный раствор.

[00370] Информационный материал может быть описательным, учебным, маркетинговым или другим материалом, относящимся к способам, описанным здесь. Информационный материал для наборов не ограничен по форме. В одном варианте

выполнения информационный материал может включать информацию, касающуюся подготовки сосуда для культивирования клеток, содержащего иммобилизованный лиганд Notch; или о продуцировании Т-клеток, дифференцированных способом без использования стромы, как описано здесь; или информацию о концентрации, дате истечения срока годности, информации о партии или производственном участке и т.п., в отношении используемых здесь реагентов, таких как факторы клеточной дифференциации. В одном варианте выполнения информационный материал относится к способам применения или введения компонентов набора.

[00371] Набор может включать компонент для обнаружения маркера дифференциации клеток. Кроме того, набор может включать одно или несколько антител, которые связывают клеточный маркер, или праймеры для ОТ-ПЦР или реакции ПЦР, например, полуколичественной или количественной ОТ-ПЦР или реакции ПЦР. Такие компоненты можно использовать для оценки активации маркеров созревания клеток или потери маркеров недифференцированных или незрелых клеток. Если реагентом для индикации является антитело, его можно поставлять в виде сухого препарата, например лиофилизированного, или в виде раствора. Антитело или другой реагент для обнаружения можно связать с меткой, например, радиологической, флуоресцентной (например, GFP) или колориметрической меткой для использования при обнаружении. Если реагент для обнаружения представляет собой праймер, он может поставляться в виде сухого препарата, например лиофилизированного, или в виде раствора.

[00372] Набор, как правило, поставляется с различными элементами, включенными в одну упаковку, например, упаковку на волокнистой основе, например, картонную, или в полимерную, например, в пенополистироловую коробку. Корпус может быть сконфигурирован так, чтобы удерживать разницу температур внутри и снаружи, например, он может обеспечивать изолирующие свойства для поддержания реагентов при заранее выбранной температуре в течение заранее выбранного времени.

Определения

[00373] Для удобства ниже приведены определения некоторых терминов и фраз, используемых в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если не указано иное или не подразумевается из контекста, следующие термины и фразы включают значения, указанные ниже. Определения приведены для помощи при описании конкретных вариантов выполнения и не предназначены для ограничения заявленного изобретения, поскольку объем изобретения ограничивается только формулой изобретения. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые

здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Если существует явное несоответствие между использованием термина в данной области техники и его определением, приведенным в данном документе, определение, приведенное здесь, имеет преимущественную силу.

[00374] Для удобства здесь собраны некоторые термины, используемые в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения.

[00375] Используемый здесь термин «клетка» относится к одной клетке, а также к популяции (т.е. более чем одной) клеток. Популяция может быть чистой популяцией, включающей один тип клеток, такой как популяция плюрипотентных стволовых клеток или популяция дифференцированных Т-клеток. Используемый здесь термин «популяция» относится к чистой популяции или к популяции, включающей большинство (например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99%) одного типа клеток. Альтернативно, популяция может включать более одного типа клеток, например смешанная клеточная популяция. Он не предназначен для ограничения количества клеток в популяции; например, смешанная популяция клеток может включать по меньшей мере одну дифференцированную клетку. В настоящем изобретении нет ограничений на количество типов клеток, которые может содержать смешанная клеточная популяция.

[00376] Используемый здесь термин «гематопозитическая стволовая клетка» или «HSC» относится к стволовой клетке, обладающей способностью к самообновлению, а также дающей начало всем типам клеток крови трех гемопоэтических линий: эритроидным, лимфоидным, и миелоидным. Эти типы клеток включают миелоидные линии (моноциты и макрофаги, нейтрофилы, базофилы, эозинофилы, эритроциты, мегакарициты/тромбоциты, дендритные клетки) и лимфоидные линии (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки). HSC человека определяют как CD34⁺, CD59⁺, CD90/Thy1⁺, CD38^{low/-}, c-kit/CD117^{-/low} и Lin⁻. Мышиными HSC- считаются CD34^{low/-}, SCA-1⁺, CD90/Thy1^{+/low}, CD38⁺, c-Kit/CD117⁺ и Lin⁻. Обнаружение экспрессии этих маркерных панелей позволяет разделить определенные клеточные популяции с помощью таких методов, как сортировка клеток, активируемая флуоресценцией (FACS). В одном варианте выполнения термин «гематопозитическая стволовая клетка» или «HSC» относится к стволовой клетке, обладающей способностью к самообновлению и имеющей следующие маркеры клеточной поверхности: CD34⁺, CD59⁺, Thy1/CD90⁺, CD38^{lo/-}, CD133⁺, c-Kit/CD117^{-/lo} и Lin⁻. В одном варианте выполнения термин «гематопозитическая стволовая клетка» или «HSC» относится к стволовой клетке, которая определяется по меньшей мере как CD34⁺. В

одном варианте выполнения термин «гематопозитическая стволовая клетка» или «HSC» относится к стволовой клетке, которая обладает способностью к самообновлению и определяется по меньшей мере как $CD34^{+}$ и $c-kit/CD117^{lo/-}$. В одном варианте выполнения термин «гематопозитическая стволовая клетка» или «HSC» относится к стволовой клетке, которая обладает способностью к самообновлению и определяется по меньшей мере как $CD38^{low/+}$, $c-kit/CD117^{low}$. Термин HSC можно использовать взаимозаменяемо с термином «гематопозитические стволовые клетки и клетки-предшественники» (HSPC).

[00377] Используемые здесь термины «iPS-клетка», «iPSC» и «индуцированная плюрипотентная стволовая клетка» используются взаимозаменяемо и относятся к плюрипотентной клетке, искусственно полученной путем трансфекции следующих факторов перепрограммирования OCT4, SOX2, KLF4 и, необязательно, c-MYC или nanog и LIN28, из дифференцированной клетки, например соматической клетки. Альтернативные комбинации факторов перепрограммирования включают OCT4, SOX2, NANOG и LIN28. Термин hPSC относится к плюрипотентной стволовой клетке человека.

[00378] Используемый здесь термин «линия» при использовании в контексте дифференциации и развития стволовых клеток и клеток-предшественников относится к пути дифференциации и развития клеток, по которому клетка может стать полностью дифференцированной клеткой. Например, HSC имеет три гемопоэтических линии: эритроидную, лимфоидную и миелоидную; HSC обладают потенциалом, т.е. способностью дифференцироваться и развиваться в те терминально дифференцированные типы клеток, известные для всех этих трех клонов. Когда используется термин «множество линий», это означает, что клетка способна в будущем дифференцироваться и развиваться в те терминально дифференцированные типы клеток, известные более чем для одной линии. Например, HSC обладает многолинейным потенциалом. Когда используется термин «ограниченная линия», это означает, что клетка может дифференцироваться и развиваться в те терминально дифференцированные типы клеток, известные для одной линии. Например, общая миелоидная клетка-предшественник (CMP) или мегакариоцитарно-эритроидная клетка-предшественник (MEP) имеет ограниченное происхождение, потому что клетка может дифференцироваться и развиваться только в те терминально дифференцированные типы клеток миелоидного происхождения, а не в клетки лимфоидного происхождения. Терминально дифференцированные клетки миелоидного ряда включают эритроциты, моноциты, макрофаги, мегакариоциты, миелобласты, дендритные клетки и гранулоциты (базофилы, нейтрофилы, эозинофилы и тучные клетки); и окончательно дифференцированные клетки лимфоидной линии

включают Т-лимфоциты/Т-клетки, В-лимфоциты/В-клетки, дендритные клетки и естественные клетки-киллеры.

[00379] Используемый в настоящем документе термин «клетка-предшественник» относится к незрелой или недифференцированной клетке, которая потенциально способна позже созреть (дифференцироваться) в определенный тип клеток (полностью дифференцированную или терминально дифференцированную клетку), например, клетку крови, клетку кожи, клетку кости или клетки волос. Клетки-предшественники имеют более примитивный клеточный фенотип (например, находятся на более ранней стадии пути развития или прогрессии, чем полностью дифференцированная клетка) по сравнению с клеткой, которую они могут дать путем дифференциации. Часто клетки-предшественники также обладают значительным или очень высоким пролиферативным потенциалом. Клетки-предшественники могут давать начало нескольким различным типам дифференцированных клеток или одному типу дифференцированных клеток, в зависимости от пути развития и среды, в которой клетки развиваются и дифференцируются. Клетка-предшественник также может пролиферировать с образованием большего количества клеток-предшественников, которые также являются незрелыми или недифференцированными.

[00380] Термин «дифференцированная клетка» означает любую первичную клетку, которая в своей нативной форме не является плюрипотентной, как этот термин определен здесь. Термин «дифференцированная клетка» также охватывает частично дифференцированные клетки, такие как мультипотентные клетки (например, взрослые соматические стволовые клетки). В некоторых вариантах выполнения термин «дифференцированная клетка» также относится к клетке более специализированного клеточного типа, полученной из клетки менее специализированного клеточного типа (например, из недифференцированной клетки или перепрограммированной клетки), где клетка подверглась клеточному процессу дифференциации.

[00381] В контексте клеточного онтогенеза термин «дифференцироваться» или «дифференцирование» является относительным термином, означающим, что «дифференцированная клетка» представляет собой клетку, которая продвинулась дальше по пути развития, чем ее клетка-предшественник. Таким образом, в некоторых вариантах выполнения перепрограммированная клетка, как этот термин определяется в настоящем документе, может дифференцироваться в клетки-предшественники с ограниченным по происхождению (таким как мезодермальная стволовая клетка или энтодермальная стволовая клетка), которые, в свою очередь, могут дифференцироваться в другие типы клеток-предшественников, которые ниже по пути развития (такие как

тканеспецифический предшественник, например, предшественник кардиомиоцитов или предшественник поджелудочной железы), а затем к конечной дифференцированной клетке, которая играет характерную роль в определенном типе ткани и может сохранять или не сохранять способность к дальнейшему размножению.

[00382] Термин «мультипотентный», когда он используется в отношении «мультипотентной клетки», относится к клетке, которая способна дифференцироваться в некоторые, но не во все клетки, происходящие из всех трех зародышевых листков. Таким образом, мультипотентная клетка является частично дифференцированной клеткой. Мультипотентные клетки хорошо известны в данной области, и примеры мультипотентных клеток включают взрослые соматические стволовые клетки, такие как, например, гемопоэтические стволовые клетки и нервные стволовые клетки, стволовые клетки волосяных фолликулов, стволовые клетки печени и т.д. Мультипотентные означает, что стволовые клетки могут образовывать многие типы клеток данной линии, но не клетки других линий. Например, мультипотентная стволовая клетка крови может образовывать множество различных типов клеток крови (красные, белые, тромбоциты и т.д.), но не может образовывать нейроны; дифференциация сердечно-сосудистых клеток-предшественников (MISC) в специфические типы зрелых сердечных, пейсмекерных, гладкомышечных и эндотелиальных клеток; колонии мультипотентных предшественников (PMF) поджелудочной железы продуцируют типы клеток панкреатической линии (клетки, которые продуцируют инсулин, глюкагон, амилазу или соматостатин) и нервной линии (клетки, которые морфологически подобны нейронам, астроцитам или олигодендроцитам).

[00383] Термин «перепрограммирующий ген», используемый здесь, относится к гену, экспрессия которого способствует перепрограммированию дифференцированной клетки, например соматической клетки, в недифференцированную клетку (например, клетку в плюрипотентном состоянии или частично плюрипотентном состоянии, мультипотентную клетку). Перепрограммирующим геном могут быть, например, гены, кодирующие основные факторы транскрипции Sox2, Oct3/4, Klf4, Nanog, Lin-28, c-myc и т.п. Термин «фактор перепрограммирования» относится к белку, кодируемому геном перепрограммирования.

[00384] Термин «экзогенный» относится к веществу, присутствующему в клетке, отличному от его природного источника. Термин «экзогенный», при использовании в данном документе, относится к нуклеиновой кислоте (например, к нуклеиновой кислоте, кодирующей перепрограммирующий фактор транскрипции, например, Sox2, Oct3/4, Klf4, Nanog, Lin-28, c-myc и т.п.) или белку (например,

полипептид фактора транскрипции), который был введен в результате процесса, включающего действие человека, в биологическую систему, такую как клетка или организм, в которой он обычно не встречается или в котором он обнаруживается в наименьших количествах. Вещество (например, нуклеиновая кислота, кодирующая фактор транскрипции *sox2*, или белок, например, полипептид SOX2) будет считаться экзогенным, если оно введено в клетку или предок клетки, которая наследует это вещество.

[00385] Используемый здесь термин «выделенный» означает, что клетки помещают в условия, отличные от их естественной среды. Термин «выделенный» не исключает последующего использования этих клеток в комбинациях или смесях с другими клетками.

[00386] Используемый здесь термин «размножение» относится к увеличению количества подобных клеток посредством клеточного деления (митоза). Термины «пролиферирующий» и «размножающийся» используются взаимозаменяемо.

[00387] Используемый здесь термин «маркер клеточной поверхности» относится к любой молекуле, которая экспрессируется на поверхности клетки. Экспрессия на клеточной поверхности обычно требует, чтобы молекула обладала трансмембранным доменом. Некоторые молекулы, которые обычно не обнаруживаются на клеточной поверхности, могут быть сконструированы с помощью рекомбинантных методов для экспрессии на поверхности клетки. Многие встречающиеся в природе маркеры клеточной поверхности называются молекулами «CD» или «кластер дифференциации». Маркеры клеточной поверхности часто обеспечивают антигенные детерминанты, с которыми могут связываться антитела. Маркером клеточной поверхности, имеющим особое значение для описанных здесь способов, является CD34. Полезные гемопоэтические клетки-предшественники (например, гемогенный эндотелий) в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно экспрессируют CD34 или, другими словами, они являются CD34 положительными.

[00388] Клетка может быть обозначена как «положительная» или «отрицательная» для любого маркера клеточной поверхности, и оба таких обозначения полезны для применения способов, описанных здесь. Клетка считается «положительной» в отношении маркера клеточной поверхности, если она экспрессирует маркер на своей клеточной поверхности в количествах, достаточных для обнаружения с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как контактирование клетки с антителом, которое связывает конкретно к этому маркеру, а затем проведение проточного цитометрического анализа такой контактировавшей клетки для определения того, связывается ли антитело с клеткой. Следует понимать, что хотя клетка может

экспрессировать информационную РНК маркера клеточной поверхности, но чтобы считаться положительной для описанных здесь способов, клетка должна экспрессировать его на своей поверхности. Точно так же клетка считается «отрицательной» или «отрицательной/низкой» (сокращенно «-/lo» или «lo/-») по маркеру клеточной поверхности, если клетка не экспрессирует маркер на своей клеточной поверхности в количествах, достаточных для обнаружения, с использованием методов, известных специалистам в данной области, таких как контактирование клетки с антителом, которое специфически связывается с этим маркером, и последующим проведением проточного цитометрического анализа такой контактировавшей клетки для определения того, связывается ли антитело с клеткой. В некоторых вариантах выполнения, когда используются агенты, специфичные в отношении маркеров клеточной поверхности, все агенты могут содержать одну и ту же метку или метку, такую как флуоресцентная метка, и, таким образом, все клетки, положительные в отношении этой метки, могут быть исключены или удалены, чтобы не контактировать с гемопоэтическими стволовыми клетками или клетками-предшественниками, для применения в описанных здесь способах.

[00389] Используемый здесь термин «ингибитор гистонметилтрансферазы» или «ингибитор» относится к любой молекуле, которая ингибирует экспрессию гистонметилтрансферазы (например, G9a, GLP, EZH1) или ингибирует каталитическую активность фермента по метилированию лизина, расположенного на субстратном гистоновом белке. Например, ингибитор гистонметилтрансферазы может представлять собой кРНК или дцРНК, которые ингибируют экспрессию G9a, GLP или EZH1 в ингибируемой клетке, или гРНК, которая способствует деградации иРНК G9a, GLP или EZH1 в ингибируемой клетке. Например, ингибитор гистонметилтрансферазы представляет собой небольшую молекулу, которая противодействует активности фермента. Примеры включают, но без ограничения, малые молекулы AMI-1, A-366, BIX-01294, BIX01338, BRD4770, хетоцин, UNC0224, UNC0631, UNC0638, UNC0642, UNC0646, EPZ5676, EPZ005687, GSK343, EPZ-6438, 3-дезазанпанокин А (DZNeP) HCl, UNC1999, MM-102, SGC 0946, энтакапон, EPZ015666, UNC0379, EI1, MI-2 (менин-ингибитор MLL), MI-3 (менин-ингибитор MLL), PFI-2, GSK126, EPZ004777, BRD4770 и EPZ-6438, как описано здесь.

[00390] Используемый в настоящем документе термин «низкомолекулярное соединение» относится к химическому агенту, включающему, помимо прочего, пептиды, пептидомиметики, аминокислоты, аналоги аминокислот, полинуклеотиды, аналоги полинуклеотидов, аптамеры, нуклеотиды, аналоги нуклеотидов, органические или неорганические соединения (т.е. включая гетероорганические и металлоорганические

соединения) с молекулярной массой менее приблизительно 10000 граммов на моль, органические или неорганические соединения с молекулярной массой менее приблизительно 5000 граммов на моль, органические или неорганические соединения с молекулярной массой менее приблизительно 1000 граммов на моль, органические или неорганические соединения, имеющие молекулярную массу менее приблизительно 500 граммов на моль, а также соли, сложные эфиры и другие фармацевтически приемлемые формы таких соединений. В некоторых вариантах выполнения низкомолекулярное соединение представляет собой гетероорганическое соединение или металлоорганическое соединение.

[00391] Предполагается, что термин «ингибирующая РНК» включает молекулу нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени (например, микроРНК-мишени), которая опосредует снижение уровня или активности нуклеиновой кислоты-мишени. Неограничивающие примеры ингибирующих РНК включают интерферирующие РНК, кшРНК, киРНК, рибозимы, антагомиры и антисмысловые олигонуклеотиды. Здесь описаны способы получения ингибирующих РНК. Дополнительные способы получения ингибирующих РНК известны в данной области. В одном варианте выполнения микроРНК G9a/GLP или EZH1, описанная здесь, представляет собой ингибирующую РНК, которая вызывает снижение активности иРНК G9a/GLP или EZH1.

[00392] Используемый здесь термин «интерферирующая РНК» относится к любой последовательности двухцепочечной или одноцепочечной РНК, способной прямо или косвенно (т.е. при преобразовании) ингибировать или подавлять экспрессию гена путем опосредования РНК-интерференции. Интерферирующая РНК включает, но без ограничения, короткую интерферирующую РНК («киРНК») и короткую шпилечную РНК («кшРНК»). «РНК-интерференция» относится к селективной деградации транскрипта, совместимого с последовательностью информационной РНК.

[00393] Используемый здесь термин «кшРНК» (короткая шпилечная РНК) относится к молекуле РНК, содержащей антисмысловой участок, петлевую часть и смысловой участок, где смысловой участок имеет комплементарные нуклеотиды, которые образуют пары оснований с антисмысловым участком с образованием дуплексного стебля. После посттранскрипционного процессинга короткая шпилечная РНК превращается в короткую интерферирующую РНК в результате расщепления, опосредованного ферментом Dicer, который является членом семейства РНКаз III. Используемая здесь фраза «посттранскрипционный процессинг» относится к процессингу

иРНК, который происходит после транскрипции и опосредуется, например, ферментами Dicer и/или Drosha.

[00394] Используемый здесь термин «короткая интерферирующая РНК» или «киРНК» относится к любой молекуле малой РНК, способной ингибировать или подавлять экспрессию генов путем опосредования РНК-интерференции специфичным для последовательности образом. Малая РНК может иметь длину, например, от 18 до 21 нуклеотида. Каждый дуплекс киРНК образован направляющей (гидовой) и пассажирской цепями. Эндонуклеаза Argonaute 2 (Ago 2) катализирует раскручивание дуплекса киРНК. После раскручивания направляющая цепь включается в комплекс специфичности РНК-интерференции (RISC), а пассажирская цепь высвобождается. RISC использует направляющую цепь для поиска иРНК, которая имеет комплементарную последовательность, ведущую к эндонуклеолитическому расщеплению иРНК-мишени.

[00395] Ретровирусы представляют собой РНК-вирусы, которые используют обратную транскриптазу во время цикла репликации. Термин «ретровирус» относится к любому известному ретровирусу (например, ретровирусам типа с, таким как вирус саркомы мышей Молони (MoMSV), вирусу саркомы мышей Харви (HaMuSV), вирусу опухоли молочной железы мышей (MuMTV), вирусу лейкемии обезьян гиббона (GaLV), вирусу лейкемии кошек (FLV), спумавирусу.

[00396] Ретровирусная геномная РНК превращается в двухцепочечную ДНК с помощью обратной транскриптазы. Эта двухцепочечная форма ДНК вируса способна интегрироваться в хромосому инфицированной клетки; после интеграции он называется «провирусом». Провирус служит матрицей для РНК-полимеразы II и направляет экспрессию молекул РНК, которые кодируют структурные белки и ферменты, необходимые для производства новых вирусных частиц.

[00397] На каждом конце провируса находятся структуры, называемые «длинными концевыми повторами» или «LTR». Термин «длинный концевой повтор (LTR)» относится к доменам пар оснований, расположенных на концах ретровирусных ДНК, которые в контексте своей природной последовательности представляют собой прямые повторы и содержат области U3, R и U5. LTR обычно обеспечивают функции, фундаментальные для экспрессии ретровирусных генов (например, промотория, инициация и полиаденилирование генных транскриптов), и репликации вируса. LTR содержит многочисленные регуляторные сигналы, включая элементы контроля транскрипции, сигналы полиаденилирования и последовательности, необходимые для репликации и интеграции вирусного генома. Вирусный LTR разделен на три области, называемые U3, R и U5. Область U3 содержит энхансер и промоторные элементы. Область U5 представляет

собой последовательность между сайтом связывания праймера и областью R, и она содержит последовательность полиаденилирования. Область R (повторяющаяся) окружена областями U3 и U5. LTR, состоящий из областей U3, R и U5, находится как на 5'-, так и на 3'-конце вирусного генома. В одном варианте выполнения изобретения промотор в LTR, включая 5'-LTR, заменен гетерологичным промотором. Примеры гетерологичных промоторов, которые можно использовать, включают, например, промотор вируса, образующего очаг в селезенке (SFFV), промотор, индуцируемый тетрациклином (TET), контрольную область локуса β -глобина и промотор β -глобина (LCR), и промотор цитомегаловируса (CMV).

[00398] Термин «лентивирус» относится к группе (или роду) ретровирусов, вызывающих медленно развивающееся заболевание. Вирусы, включенные в эту группу, включают ВИЧ (вирус иммунодефицита человека, включая ВИЧ типа 1 и ВИЧ типа 2), этиологический агент синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИД); вирус висна-маэди, вызывающий энцефалит (висна) или пневмонию (маэди) у овец, вирус артрита-энцефалита коз, вызывающий иммунодефицит, артрит и энцефалопатию у коз; вирус инфекционной анемии лошадей, вызывающий аутоиммунную гемолитическую анемию и энцефалопатию у лошадей; вирус кошачьего иммунодефицита (FIV), вызывающий иммунодефицит у кошек; вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), который вызывает лимфаденопатию, лимфоцитоз и, возможно, инфекцию центральной нервной системы крупного рогатого скота; и вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вызывающий иммунодефицит и энцефалопатию у приматов меньшего размера. Заболевания, вызываемые этими вирусами, характеризуются длительным инкубационным периодом и затяжным течением. Обычно вирусы латентно поражают моноциты и макрофаги, откуда распространяются на другие клетки. ВИЧ, FIV и SIV легко инфицируют Т-лимфоциты, т.е. Т-клетки.

[00399] Термин «R-область» относится к области внутри ретровирусных LTR, начинающейся с начала кэпирующей группы (т.е. начала транскрипции) и заканчивающейся непосредственно перед началом поли-А-тракта. Область R также определяется как граничащая с областями U3 и U5. Область R играет важную роль во время обратной транскрипции, обеспечивая перенос зарождающейся ДНК с одного конца генома на другой.

[00400] Термин «промотор/энхансер» относится к сегменту ДНК, который содержит последовательности, способные выполнять функции как промотора, так и энхансера. Например, длинные концевые повторы ретровирусов содержат как промоторные, так и энхансерные функции. Энхансер/промотор может быть

«эндогенным», «экзогенным» или «гетерологичным». «Эндогенный» энхансер/промотор представляет собой тот, который естественным образом связан с данным геном в геноме. «Экзогенный» или «гетерологичный» энхансер/промотор представляет собой энхансер/промотор, который помещают рядом с геном с помощью генетических манипуляций (т.е. методов молекулярной биологии), так что транскрипция этого гена управляется связанным энхансером/промотором.

[00401] Используемый здесь термин «нуклеиновая кислота» или «последовательность нуклеиновой кислоты» относится к любой молекуле, предпочтительно полимерной молекуле, включающей звенья рибонуклеиновой кислоты, дезоксирибонуклеиновой кислоты или их аналогов. Нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Одноцепочечная нуклеиновая кислота может представлять собой одну цепь нуклеиновой кислоты денатурированной двухцепочечной ДНК. Альтернативно, это может быть одноцепочечная нуклеиновая кислота, не полученная из какой-либо двухцепочечной ДНК. В одном аспекте нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК. В другом аспекте нуклеиновая кислота может представлять собой РНК. Подходящая ДНК может включать, например, геномную ДНК или кДНК. Подходящая РНК может включать, например, иРНК, иРНК, киРНК, киРНК и т.д.

[00402] Нуклеиновая кислота может быть выбрана, например, из группы, включающей: нуклеиновую кислоту, кодирующую интересующий белок, олигонуклеотиды, аналоги нуклеиновой кислоты, например, пептидно-нуклеиновую кислоту (PNA), псевдокомплементарную PNA (pc-PNA) и закрытую нуклеиновую кислоту (LNA). Такие последовательности нуклеиновых кислот включают, например, но без ограничения, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие белки, например, которые действуют как репрессоры транскрипции, антисмысловые молекулы, рибозимы, малые ингибирующие последовательности нуклеиновых кислот, например, но без ограничения, РНКи, кшРНКи, киРНК, микроРНКи (миРНК) и антисмысловые олигонуклеотиды.

[00403] Используемый здесь термин «приживление» по отношению к реципиенту-хозяину означает начало роста новых кроветворных клеток, происходящих из имплантированных клеток, и создание здоровых стволовых клеток крови, которые появляются в крови реципиента через минимальный период времени, составляющий 10 дней после имплантации. Приживление может произойти уже через 10 дней после трансплантации, но чаще всего через 14-20 дней.

[00404] Используемый здесь термин «восстановление» по отношению к иммунной системе или системе крови реципиента-хозяина относится к восстановлению врожденного резервуара или рабочей системы или ее части в организме реципиента-хозяина до естественного или функционального состояния. Например, в костном мозге после химиотерапии, когда были уничтожены стволовые клетки костного мозга.

[00405] Термины «снижение», «сниженный», «уменьшение» или «ингибировать» используются здесь для обозначения снижения на статистически значимую величину. В некоторых вариантах выполнения «снижение», «уменьшение» или «ингибирование» обычно означает снижение по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольным уровнем (например, при отсутствии данного лечения или агента) и может включать, например, уменьшение по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 35%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 45%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 55%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 65%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99% или более. Используемый здесь термин «снижение» или «ингибирование» не включает полное ингибирование или снижение по сравнению с эталонным уровнем. «Полное ингибирование» представляет собой 100% ингибирование по сравнению с эталонным уровнем. Снижение предпочтительно может быть до уровня, принятого в пределах диапазона нормы для индивидуума без данного расстройства.

[00406] Термины «увеличение», «повышение», «усиление» или «активирование» используются здесь для обозначения увеличения на статически значимую величину. В некоторых вариантах выполнения термины «увеличение», «повышение», «усиление» или «активация» могут означать увеличение по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольным уровнем, например увеличение по меньшей мере на приблизительно 20%, или по меньшей мере на приблизительно 30%, или по меньшей мере на приблизительно 40%, или по меньшей мере на приблизительно 50%, или по меньшей мере на приблизительно 60%, или по меньшей мере на приблизительно 70%, или по меньшей мере на приблизительно 80%, или по меньшей мере на приблизительно 90%, или вплоть до и включая увеличение на 100%, или любое увеличение на 10%-100% по

сравнению с эталонным уровнем, или по меньшей мере приблизительно в 2 раза, или по меньшей мере приблизительно в 3 раза, или по меньшей мере приблизительно в 4 раза, или по меньшей мере приблизительно в 5 раз, или по меньшей мере приблизительно в 10 раз, или любое увеличение между 2-кратным и 10-кратным или более по сравнению с эталонным уровнем. В контексте маркера или симптома «увеличение» представляет собой статистически значимое увеличение такого уровня.

[00407] Используемый здесь термин «субъект» означает человека или животное. Обычно животное представляет собой позвоночное животное, такое как примат, грызун, домашнее животное или промысловое животное. К приматам относятся шимпанзе, яванские макаки, паукообразные обезьяны и макаки, например резус. К грызунам относятся мыши, крысы, сурки, хорьки, кролики и хомяки. Домашние и промысловые животные включают коров, лошадей, свиней, оленей, бизонов, буйволов, кошачьих, например, домашнюю кошку, собачьих, например, собак, лис, волков, птиц, например, кур, эму, страусов, и рыб, например, форель, сом и лосось. В некоторых вариантах выполнения субъект представляет собой млекопитающее, например, примата, например, человека. Термины «индивидуум», «пациент» и «субъект» используются здесь взаимозаменяемо.

[00408] Предпочтительно субъект представляет собой млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой человека, примата, отличного от человека, мышь, крысу, собаку, кошку, лошадь или корову, но без ограничения этими примерами. Млекопитающих, отличных от человека, можно с пользой использовать в качестве субъектов, представляющих животные модели клеточной заместительной терапии. Субъект может быть мужского или женского пола.

[00409] Субъектом может быть человек, у которого ранее была диагностирована патология, или который был идентифицирован как страдающий или имеющий состояние, нуждающееся в лечении (например, гематологическое заболевание, рак и т.д.), или имеющий одно или несколько осложнений, связанных с таким состоянием, и, необязательно, что он уже подвергался лечению по поводу гематологического заболевания или одного или нескольких осложнений, связанных с гематологическим заболеванием. Альтернативно, субъект также может быть тем, у кого ранее не было диагностировано гематологическое заболевание или одно или несколько осложнений, связанных с гематологическим заболеванием. Например, субъектом может быть субъект, у которого проявляются один или более факторов риска гематологического заболевания или одно или более осложнений, связанных с гематологическим заболеванием, или субъект, у которого отсутствуют факторы риска.

[00410] «Субъектом, нуждающимся» в лечении определенного состояния, может быть субъект, страдающий этим состоянием, у которого диагностировано это состояние или у которого имеется риск развития этого состояния.

[00411] Вариант последовательности аминокислот или ДНК может иметь по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или более идентичности нативной или эталонной последовательности. Степень гомологии (процент идентичности) между нативной и мутантной последовательностями можно определить, например, путем сравнения двух последовательностей с использованием свободно доступных компьютерных программ, обычно используемых для этой цели во всемирной паутине (например, BLASTp или BLASTn с настройками по умолчанию).

[00412] Изменения нативной аминокислотной последовательности могут быть осуществлены любым из ряда способов, известных специалистам в данной области. Мутации могут быть введены, например, в определенные локусы путем синтеза олигонуклеотидов, содержащих мутантную последовательность, фланкированных сайтами рестрикции, позволяющими лигировать фрагменты нативной последовательности. После лигирования полученная реконструированная последовательность кодирует аналог, имеющий желаемую аминокислотную вставку, замену или делецию. В качестве альтернативы, процедуры сайт-специфического мутагенеза, направленного на олигонуклеотиды, могут быть использованы для получения измененной нуклеотидной последовательности, имеющей определенные кодоны, измененные в соответствии с требуемой заменой, делецией или вставкой. Способы внесения таких изменений очень хорошо известны и включают, например, способы, раскрытые в Walder et al. (Gene 42:133, 1986); Bauer et al. (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, January 1985, 12-19); Smith et al. (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); и патентах США №№ 4518584 и 4737462, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании правильной конформации полипептида, также может быть заменен, как правило, серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения аберрантного сшивания. И наоборот, цистеиновые связи могут быть добавлены к полипептиду для улучшения его стабильности или облегчения олигомеризации.

[00413] Термин «экспрессия» относится к клеточным процессам, вовлеченным в продуцирование РНК и белков и, при необходимости, в секрецию белков, включая, где применимо, но без ограничения, например, транскрипцию, процессинг транскриптов, трансляцию и фолдинг, модификацию и процессинг белков. Экспрессия может относиться к транскрипции и стабильному накоплению смысловой (иРНК) или антисмысловой РНК, полученной из фрагмента или фрагментов нуклеиновой кислоты настоящего изобретения, и/или к трансляции иРНК в полипептид.

[00414] В некоторых вариантах выполнения экспрессия биомаркера(ов), мишени(ей) или гена/полипептида, описанных здесь, является/являются тканеспецифичными. В некоторых вариантах выполнения экспрессия биомаркера(ов), мишени(ей) или гена/полипептида, описанных здесь, является глобальной. В некоторых вариантах выполнения экспрессия биомаркера(ов), мишени(ей) или гена/полипептида, описанных здесь, является системной.

[00415] «Продукты экспрессии» включают РНК, транскрибированную с гена, и полипептиды, полученные путем трансляции иРНК, транскрибированной с гена. Термин «ген» означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая транскрибируется (ДНК) в РНК *in vitro* или *in vivo*, когда она функционально связана с соответствующими регуляторными последовательностями. Ген может включать или не включать области, предшествующие и следующие за кодирующей областью, например, 5'-нетранслируемые (5'UTR) или "лидерные" последовательности и 3'-UTR или "концевые" последовательности, а также промежуточные последовательности (интроны) между отдельными кодирующими участками (экзоны).

[00416] В некоторых вариантах выполнения можно сконструировать полипептид, нуклеиновую кислоту или клетку, как описано здесь. Используемый в данном документе термин «сконструированный» относится к аспекту манипулирования человеком. Например, полипептид считается «сконструированным», когда по меньшей мере один аспект полипептида, например, его последовательность, подвергался манипуляциям человека, чтобы отличаться от аспекта, существующего в природе. Согласно общепринятой практике и как понятно специалистам в данной области техники, потомство сконструированной клетки обычно по-прежнему называют «сконструированной», даже если манипуляция была фактически выполнена на предшествующем объекте.

[00417] В некоторых вариантах выполнения описанная здесь дифференцированная и/или сконструированная Т-клетка является экзогенной. В некоторых вариантах выполнения дифференцированная и/или сконструированная Т-

клетка, описанная здесь, является эктопической. В некоторых вариантах выполнения описанная здесь дифференцированная и/или сконструированная Т-клетка не является эндогенной.

[00418] Термин «экзогенный» относится к веществу, присутствующему в клетке, отличному от его природного источника. Термин «экзогенный» при использовании здесь, может относиться к нуклеиновой кислоте (например, нуклеиновой кислоте, кодирующей полипептид) или к полипептиду, который был введен в результате процесса, включающего деятельность человека, в биологическую систему, такую как клетка или организм, в котором обычно она не обнаруживается, и при этом желательно ввести нуклеиновую кислоту или полипептид в такую клетку или организм. Альтернативно, «экзогенный» может относиться к нуклеиновой кислоте или полипептиду, которые были введены в результате процесса, включающего деятельность человека, в биологическую систему, такую как клетка или организм, в которой они обнаружены в относительно небольших количествах, и желательно увеличить количество нуклеиновой кислоты или полипептида в клетке или организме, например, для создания эктопической экспрессии или уровней. Напротив, термин «эндогенный» относится к веществу, которое является нативным для биологической системы или клетки. Используемый здесь термин «эктопический» относится к веществу, которое находится в необычном месте и/или в необычном количестве. Эктопическое вещество может быть веществом, которое обычно находится в данной клетке, но в гораздо меньшем количестве и/или в другое время. Эктопическое вещество также включает вещество, такое как полипептид или нуклеиновая кислота, которое не встречается в природе или не экспрессируется в данной клетке в ее естественной среде.

[00419] Нуклеиновые кислоты, кодирующие описанный здесь полипептид (например, полипептид CAR), могут быть включены в вектор. Термин «вектор», используемый здесь, относится к конструкции нуклеиновой кислоты, предназначенной для доставки в клетку-хозяин или для переноса между различными клетками-хозяевами. Используемый здесь вектор может быть вирусным или невирусным. Термин «вектор» охватывает любой генетический элемент, способный к репликации, когда он связан с соответствующими контрольными элементами, и который может переносить последовательности генов в клетки. Вектор может представлять, помимо прочего, клонирующий вектор, вектор экспрессии, плазмиду, фаг, транспозон, космиду, хромосому, вирус, вирион и т.п.

[00420] Вектор может быть рекомбинантным, например, если он содержит последовательности, происходящие по меньшей мере из двух разных источников. В

некоторых вариантах выполнения вектор содержит последовательности, происходящие по меньшей мере из двух разных видов. В некоторых вариантах выполнения вектор содержит последовательности, происходящие из по меньшей мере двух разных генов, например, он содержит слитый белок или нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт экспрессии, который функционально связан по меньшей мере с одним ненативным (например, гетерологичным) генетическим контрольным элементом (например, такой как промотор, супрессор, активатор, энхансер, элемент ответа и т.п.).

[00421] В некоторых вариантах выполнения вектор или нуклеиновая кислота, описанные здесь, оптимизированы по кодонам, например, последовательность нативной или дикого типа последовательности нуклеиновой кислоты была изменена или сконструирована таким образом, чтобы включать альтернативные кодоны, так что измененная или сконструированная нуклеиновая кислота кодирует тот же полипептид в виде продукта экспрессии, как последовательность нативного/дикого типа, но она будет транскрибироваться и/или транслироваться с повышенной эффективностью в желаемой системе экспрессии. В некоторых вариантах выполнения система экспрессии представляет собой организм, отличный от источника последовательности нативного/дикого типа (или клетку, полученную из такого организма). В некоторых вариантах выполнения вектор и/или последовательность нуклеиновой кислоты, описанные здесь, оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетке млекопитающего или млекопитающего, например мыши, клетке мыши или клетке человека. В некоторых вариантах выполнения вектор и/или последовательность нуклеиновой кислоты, описанные здесь, оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетке человека. В некоторых вариантах выполнения вектор и/или последовательность нуклеиновой кислоты, описанные здесь, оптимизированы по кодонам для экспрессии в дрожжах или дрожжевых клетках. В некоторых вариантах выполнения вектор и/или последовательность нуклеиновой кислоты, описанные здесь, оптимизированы по кодонам для экспрессии в бактериальной клетке. В некоторых вариантах выполнения вектор и/или последовательность нуклеиновой кислоты, описанные здесь, оптимизированы по кодонам для экспрессии в клетке *E. coli*.

[00422] Используемый здесь термин «вектор экспрессии» относится к вектору, который направляет экспрессию РНК или полипептида из последовательностей, связанных с регуляторными последовательностями транскрипции на векторе. Экспрессируемые последовательности часто, но не обязательно, гетерологичны клетке. Вектор экспрессии может содержать дополнительные элементы, например, вектор экспрессии может иметь две системы репликации, что позволяет поддерживать его в двух

организмах, например, в клетках человека для экспрессии и в прокариотическом хозяине для клонирования и амплификации.

[00423] Используемый здесь термин «вирусный вектор» относится к векторной конструкции нуклеиновой кислоты, которая включает по меньшей мере один элемент вирусного происхождения и способна упаковываться в частицу вирусного вектора. Вирусный вектор может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, как описано здесь, вместо несущественных вирусных генов. Вектор и/или частица могут быть использованы с целью переноса любых нуклеиновых кислот в клетки *in vitro* или *in vivo*. В данной области известны многочисленные формы вирусных векторов. Неограничивающие примеры вирусного вектора по данному изобретению включают вектор AAV, аденовирусный вектор, лентивирусный вектор, ретровирусный вектор, герпесвирусный вектор, альфавирусный вектор, поксвирусный вектор, бакуловирусный вектор и химерный вирусный вектор.

[00424] Следует понимать, что векторы, описанные здесь, в некоторых вариантах выполнения можно комбинировать с другими подходящими композициями и терапевтическими средствами. Например, использование подходящего эписомального вектора обеспечивает средство для сохранения интересующего нуклеотида у субъекта во внехромосомной ДНК с высоким числом копий, тем самым устраняя потенциальные эффекты хромосомной интеграции.

[00425] Используемые здесь термины «лечить», «лечение» или «облегчение», «улучшение» относятся к терапевтическим способам лечения, цель которых состоит в том, чтобы обратить вспять, облегчить, улучшить, ингибировать, замедлить или остановить прогрессирование или тяжесть заболевания, состояния, связанного с заболеванием или расстройством, например гематологическим заболеванием или раком. Термин «лечение» включает уменьшение или улучшение по меньшей мере одного неблагоприятного эффекта или симптома состояния, заболевания или нарушения, связанного с гематологическим заболеванием или раком. Лечение обычно считается «эффективным», если один или несколько симптомов или клинических маркеров уменьшаются. В качестве альтернативы, лечение является «эффективным», если прогрессирование заболевания уменьшено или остановлено. То есть «лечение» включает не только улучшение симптомов или маркеров, но также прекращение или по меньшей мере замедление прогрессирования или ухудшения состояния или симптомов по сравнению с тем, что можно было бы ожидать при отсутствии лечения. Благоприятные или желаемые клинические результаты включают, помимо прочего, облегчение одного или нескольких симптомов, уменьшение распространенности заболевания, стабилизацию

(т.е. отсутствие ухудшения) состояния при заболевании, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или паллиативное облегчение болезненного состояния, ремиссии (частичной или полной) и/или снижения смертности, поддающиеся обнаружению или не поддающиеся обнаружению. Термин «лечение» заболевания также включает облегчение симптомов или побочных эффектов заболевания (включая паллиативное лечение).

[00426] Используемый здесь термин «введение» относится к введению соединения субъекту, как раскрыто здесь, способом или путем, который приводит по меньшей мере к частичной доставке агента в желаемое место. Фармацевтические композиции, содержащие описанные здесь соединения, можно вводить любым подходящим путем, который приводит к эффективному лечению субъекта. В некоторых вариантах введение включает физическую активность человека, например, инъекцию, прием внутрь, применение и/или манипуляции с устройством для доставки или аппаратом. Такая деятельность может осуществляться, например, медицинским работником и/или субъектом, который подвергается лечению.

[00427] Используемый здесь термин «контактирование» относится к любому подходящему способу доставки или воздействия агента по меньшей мере на одну клетку. Типичные способы доставки включают, но без ограничения, прямую доставку в культуральную среду, перфузию, инъекцию или другие способы. способ доставки, хорошо известный специалисту в данной области. В некоторых вариантах выполнения контактирование включает физическую активность человека, например инъекцию, действия при дозировании, смешивание и/или декантацию и/или манипулирование устройством или аппаратом для доставки.

[00428] Термин «статистически значимый» или «значительно» относится к статистической значимости и обычно означает разницу в два стандартных отклонения (2SD) или более.

[00429] За исключением рабочих примеров или там, где указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов или условия реакции, используемые здесь, следует понимать как измененные во всех случаях термином «приблизительно». Термин «приблизительно» при использовании в связи с процентами может означать $\pm 1\%$.

[00430] Используемый здесь термин «содержащий» или «включающий» означает, что в дополнение к определенным представленным элементам также могут присутствовать другие элементы. Использование термина «содержащий» указывает на включение, а не на ограничение.

[00431] Термин «состоящий», когда он относится к композициям, способам и их соответствующим компонентам, как описано здесь, исключают любой элемент, не упомянутый в этом описании варианта выполнения.

[00432] Используемый здесь термин «состоящий по существу из» относится к тем элементам, которые необходимы для данного варианта выполнения. Термин допускает наличие дополнительных элементов, которые существенно не влияют на основные и новые или функциональные характеристики этого варианта выполнения изобретения.

[00433] Используемый здесь термин «соответствует» относится к аминокислоте или нуклеотиду в пронумерованном положении в первом полипептиде или нуклеиновой кислоте, или аминокислоте или нуклеотиду, которые эквивалентны пронумерованной аминокислоте или нуклеотиду во втором полипептиде или нуклеиновой кислоте. Эквивалентные пронумерованные аминокислоты или нуклеотиды можно определить путем выравнивания последовательностей-кандидатов с использованием известных в данной области программ оценки степени гомологии, например, BLAST.

[00434] Термины, представленные в единственном числе, включают ссылки на объекты во множественном числе, если контекст явно не указывает на иное. Точно так же слово «или» включает в себя «и», если в контексте явно не указано иное. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Указание «например» происходит от латинского слова «*exemplum gratia*», и оно используется здесь для обозначения неограничивающего примера. Таким образом, указание «например» является синонимом термина «в частности».

[00435] Группы альтернативных элементов или вариантов выполнения изобретения, раскрытые здесь, не должны рассматриваться как ограничения. Каждый член группы может упоминаться и рассматриваться индивидуально или в любой комбинации с другими членами группы или другими элементами, найденными здесь. Один или несколько членов группы могут быть включены в группу или исключены из нее по соображениям удобства и/или патентоспособности. Когда происходит любое такое включение или удаление, считается, что описание содержит группу в измененном виде, что соответствует письменному описанию всех групп Маркуша, используемых в прилагаемой формуле изобретения.

[00436] Если иное не определено в данном документе, научные и технические термины, используемые в связи с настоящей заявкой, должны иметь значения, которые

обычно понимаются специалистами в области, к которой относится настоящее изобретение. Следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретной методологией, протоколами, реагентами и т.д., описанными здесь, и поэтому может варьироваться. Используемая здесь терминология предназначена только для описания конкретных вариантов выполнения и не предназначена для ограничения объема настоящего изобретения, который определяется исключительно формулой изобретения. Определения общих терминов в иммунологии и молекулярной биологии можно найти в The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 20th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2018 (ISBN 0911910190, 978-0911910421); Robert S. Porter et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908); Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8); Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006; Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), W. W. Norton & Company, 2016 (ISBN 0815345054, 978-0815345053); Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA (2012) (ISBN 1936113414); Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X); Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542); Current Protocols in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385), Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005; and Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737), содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

[00437] В некоторых вариантах выполнения изобретения, описанного здесь, не касается процесса клонирования людей, процессов модификации генетической идентичности зародышевой линии человека, использования человеческих эмбрионов в промышленных или коммерческих целях или процессов модификации генетической идентичности животных, которые может причинить им страдания без какой-либо существенной медицинской пользы для человека или животного, а также животных, полученных в результате таких процессов.

[00438] Другие термины определены здесь в рамках описания различных аспектов настоящего изобретения.

[00439] Все патенты и другие публикации, включая ссылки на литературу, выданные патенты, опубликованные патентные заявки и находящиеся на рассмотрении патентные заявки, цитируемые здесь, включены сюда посредством ссылки с целью описания и раскрытия, например, методологий, описанных в таких публикациях, которые могут быть использованы в связи с описанной здесь технологией. Эти публикации предоставлены исключительно для раскрытия сведений до даты подачи настоящей заявки. В этом отношении ничто не должно быть истолковано как признание того, что авторы изобретения не имеют права датировать такое раскрытие ранее в силу предшествующего изобретения или по любой другой причине. Все заявления о дате или представлении о содержании этих документов основаны на информации, доступной заявителям, и не являются признанием правильности дат или содержания этих документов.

[00440] Описание вариантов выполнения изобретения не предназначено быть исчерпывающим или ограничивать изобретение точной описанной формой. Хотя конкретные варианты выполнения и примеры выполнения описаны здесь в иллюстративных целях, в рамках раскрытия настоящего изобретения возможны различные эквивалентные модификации, что понятно специалистам в соответствующей области техники. Например, в то время как стадии или функции способа представлены в заданном порядке, альтернативные варианты выполнения могут выполнять функции в другом порядке, или функции могут выполняться по существу одновременно. Принципы раскрытия, представленные в данном документе, могут быть применены к другим процедурам или способам, если это целесообразно. Различные варианты выполнения, описанные в данном документе, могут быть объединены для обеспечения дополнительных вариантов выполнения. Аспекты раскрытия могут быть изменены, если это необходимо, для использования композиций, функций и концепций приведенных выше ссылок и заявок для предоставления дополнительных вариантов выполнения изобретения. Эти и другие изменения могут быть внесены в раскрытие в свете подробного описания. Предполагается, что все такие модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

[00441] Конкретные элементы любого из вышеупомянутых вариантов выполнения могут быть объединены или заменены элементами в других вариантах выполнения. Кроме того, несмотря на то, что преимущества, связанные с некоторыми вариантами выполнения изобретения, были описаны в контексте этих вариантов выполнения, другие варианты выполнения также могут демонстрировать такие

преимущества, и не все варианты выполнения обязательно должны демонстрировать такие преимущества, чтобы подпадать под объем настоящего изобретения.

[00442] Некоторые варианты выполнения описанной здесь технологии могут быть определены в соответствии с любым из следующих пронумерованных пунктов:

1. Способ, предусматривающий:
 - a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия;
 - b) ингибирование гистонметилтрансферазы в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и
 - c) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.
2. Способ, предусматривающий:
 - a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия;
 - b) ингибирование эпигенетического регулятора в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и
 - c) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.
3. Способ, предусматривающий:
 - a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия;
 - b) ингибирование G9a и/или GLP в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и
 - c) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.
4. Способ, предусматривающий:
 - a) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и

б) дифференциацию полученной популяции $CD34^+$ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию $CD3^+$ Т-клеток.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором лиганд Notch присоединен к твердой подложке.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором лиганд Notch присоединен к чашке для культивирования клеток.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором лиганд Notch получен не из стромальной клетки.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором дифференциация гемогенного эндотелия в присутствии лиганда Notch не предусматривает совместного культивирования со стромальной клеткой, экспрессирующей лиганд Notch.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором дифференциация гемогенного эндотелия в присутствии лиганда Notch не предусматривает совместного культивирования с клетками OP9-DL1 или клетками OP9-DL4.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором лиганд Notch выбран из группы, состоящей из Delta-like-1 (DLL1), Delta-like-4 (DLL4), иммобилизованного $\Delta 1^{ext-IgG}$ и иммобилизованного $\Delta 4^{ext-IgG}$.

11. Способ по п. 10, в котором иммобилизованный $\Delta 1^{ext-IgG}$ состоит из внеклеточного домена Delta-like-1 человека, слитого с доменом Fc IgG1 человека.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию $CD3^+$ Т-клеток составляет по меньшей мере 4 недели.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором среда для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток не содержит сыворотки.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором среда для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток содержит FLT3 и IL7.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором среда для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток содержит 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором среда для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл тромбопоэтина (ТРО) и/или 30 нг/мл SCF в течение по меньшей мере первых 2 недель дифференциации в среде для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащая ТРО, способствует дифференциации в популяцию CD5⁺ CD7⁺ Pro Т-клеток.

18. Способ по любому из пп. 1-4, в котором популяция CD3⁺ Т-клеток содержит популяцию CD4⁺CD8⁺ Т-клеток.

19. Способ по п. 18, дополнительно предусматривающий дифференциацию популяции CD4⁺CD8⁺ Т-клеток в среде для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD4⁺ клеток и популяцию CD8⁺ клеток.

20. Способ по п. 19, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD4⁺CD8⁺ Т-клеток в популяцию CD4⁺ Т-клеток и популяцию CD8⁺ клеток, составляет по меньшей мере 1 неделю.

21. Способ по п. 19, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в популяцию CD4⁺ Т-клеток и популяцию CD8⁺ клеток, составляет по меньшей мере 5 недель.

22. Способ по п. 19, в котором среда для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки содержит 10 нг/мл IL-15 и активатор Т-клеток.

23. Способ по п. 22, в котором активатор Т-клеток содержит 10 мкл/мл активатора CD3/CD28 Т-клеток.

24. Способ по п. 22, в котором активатор Т-клеток содержит одну гранулу активатора Dynabeads CD3/CD28 Т-клеток на клетку.

25. Способ по любому из пп. 18-24, дополнительно предусматривающий по меньшей мере через 1 неделю стадию обогащения клеток CD4⁺ и/или обогащения клеток CD8⁺.

26. Способ по любому из пп. 1-4, в котором популяция плюрипотентных стволовых клеток включает индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) или эмбриональные стволовые клетки (ESC).

27. Способ по п. 26, в котором индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем введения в зрелые клетки только факторов перепрограммирования *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и необязательно *c-MYC* или *nanog* и *LIN28*.

28. Способ по п. 26, в котором индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем введения факторов перепрограммирования два или более раз в зрелые клетки.

29. Способ по любому из пп. 1-4, в котором популяцию плюрипотентных стволовых клеток дифференцируют в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия с использованием эмбрионидных телец или двумерных (2D) адгезивных культур.

30. Способ по любому из пп. 1-4, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия составляет по меньшей мере 8 дней.

31. Способ по любому из пп. 1-4, в котором среда для агрегации содержит BMP4, SB-431542, CHIR99021, bFGF, VEGF, IL-6, IL-11, IGF-1, SCF и EPO.

32. Способ по любому из пп. 29-31, в котором среда для агрегации содержит 10 нг/мл BMP4, 6 мМ SB-431542, 3 мМ CHIR99021, 5 нг/мл bFGF, 15 нг/мл VEGF, 10 нг/мл IL-6, 5 нг/мл IL-11, 25 нг/мл IGF-1, 50 нг/мл SCF и 2 ЕД/мл EPO.

33. Способ по любому из пп. 29-32, дополнительно предусматривающий отбор или выделение полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия с использованием экспрессии поверхностных маркеров на популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия.

34. Способ по любому из пп. 29-33, в котором популяция CD34⁺ гемогенного эндотелия является CD45-отрицательной/низкой.

35. Способ по любому из пп. 29-34, в котором популяция CD34⁺ гемогенного эндотелия является CD38-отрицательной/низкой.

36. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно предусматривающий стадию генетической модификации полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия или полученной популяции CD3⁺ Т-клеток.

37. Способ по п. 36, в котором генетическая модификация представляет собой редактирование эндогенного HLA, удаление эндогенного TCR и/или экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR).

38. Способ по п. 1, в котором гистонметилтрансфераза катализирует присоединение метильной группы к остатку лизина 9 гистона 3 (H3K9) и/или к остатку лизина 27 гистона 3 (H3K27).

39. Способ по п. 1, в котором гистонметилтрансферазу H3K9 и/или H3K27 ингибируют низкомолекулярным ингибитором или ингибитором нуклеиновой кислоты.

40. Способ по п. 39, в котором низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы H3K9 и/или H3K27 представляет собой гетероорганическое соединение или металлоорганическое соединение.

41. Способ по п. 39, в котором низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы H3K9 и/или H3K27 выбран из группы, состоящей из BIX-01294,

UNC0638, E72, BRD4770, A-366, хетоцина, UNC0224, UNC0631, UNC0646, EPZ005687, EPZ-6438 (E7438), 3-деазанепланоцина А (DZNep), EI1, GSK343, GSK126 и UNC1999.

42. Способ по п. 39, в котором ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой нуклеиновую кислоту, нацеленную на экспрессию гистонметилтрансферазы.

43. Способ по п. 39, в котором ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой РНК-интерферирующий ингибитор или агент.

44. Способ по п. 39, в котором ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой EZH1-специфическую нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из аптамера, связывающего EZH1, EZH1-специфического РНК-интерферирующего агента и вектора, кодирующего EZH1-специфический РНК-интерферирующий агент, где РНК-интерферирующий агент содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 11-19.

45. Способ по п. 2, в котором эпигенетический регулятор представляет собой ДНК-метилтрансферазу (DNMT); белок метил-СрG-связывающего домена (MBD); ДНК-деметилазу; гистонметилтрансферазу (HMT); белок, связывающий метилгистон; гистондеметилазу; гистон-ацетилтрансферазу (HAT); ацетилсвязывающий белок или гистондеацетилазу (HDAC).

46. Способ по п. 45, в котором ингибитор эпигенетического регулятора выбран из группы, состоящей из: UNC0224, MC1568 и CAУ10591.

47. Способ по любому из пп. 45-46, в котором ингибитор эпигенетического регулятора представлен в концентрации по меньшей мере 500 нМ.

48. Способ по любому из пп. 45-46, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34+ клеток в популяцию CD5+CD7+ proT-клеток составляет приблизительно 14 дней.

49. Способ по п. 3, в котором ингибитор G9a и/или GLP выбран из группы, состоящей из: UNC0224; UNC0638; A366; BRD4770; BIX01294; UNC0642; UNC0631; UNC0646; UNC0321; E72; BIX-01338; BRD9539; хетоцина и DCG066.

50. Способ по п. 49, в котором ингибитор G9a и/или GLP представляет собой UNC0224.

51. Способ по любому из пп. 49-50, в котором ингибитор G9a и/или GLP представлен в концентрации от 300 нМ до 5 мкМ.

52. Способ по любому из пп. 49-51, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34+ клеток в популяцию CD5+CD7+ proT-клеток составляет приблизительно 14 дней.

53. Способ, предусматривающий:

а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию $CD34^+$ гемогенного эндотелия; и

б) дифференциацию полученной популяции $CD34^+$ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение не менее 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию $CD3^+$ Т-клеток;

при этом среда для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл TPO и 30 нг/мл SCF по меньшей мере в течение первых двух недель.

54. Способ, предусматривающий:

а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию $CD34^+$ гемогенного эндотелия; и

б) дифференциацию полученной популяции $CD34^+$ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение не менее 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию $CD3^+$ Т-клеток;

при этом среда для дифференциации $CD3^+$ -Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл TPO, 30 нг/мл SCF и ингибитор G9a/GLP, в течение по меньшей мере первых двух недель.

55. Способ по любому из пп. 1-54, в котором популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, наиболее сходный с альфа-бета Т-клетками.

56. Способ по любому из пп. 1-55, в котором популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или более сходен с альфа-бета Т-клетками.

57. Способ по любому из пп. 1-56, в котором популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета-Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,85.

58. Способ по любому из пп. 1-57, в котором популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет значение продуктивной клональности Симпсона равное приблизительно 0,025.

59. Способ по любому из пп. 1-58, в котором популяция $CD3^+$ Т-клеток имеет определяющую комплементарность область (CDR) Т-клеточного рецептора (TCR), которая по меньшей мере на 3 нуклеотида длиннее, чем у иммунной клетки, дифференцированной без ингибирования метилтрансферазой или с использованием стромальных клеток.

60. Иммунная клетка, полученная способом по любому из пп. 1-59.
61. Иммунная клетка по п. 60, где иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, который наиболее подобен альфа-бета Т-клеткам.
62. Иммунная клетка по любому из пп. 60-61, где иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или более подобен альфа-бета Т-клеткам.
63. Иммунная клетка по любому из пп. 60-62, где иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета-Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,85.
64. Иммунная клетка по любому из пп. 60-63, где иммунная клетка имеет значение продуктивной клональности Симпсона равное приблизительно 0,025.
65. Иммунная клетка по любому из пп. 60-64, где иммунная клетка имеет определяющую комплементарность область (CDR) Т-клеточного рецептора (TCR), которая по меньшей мере на 3 нуклеотида длиннее, чем у иммунной клетки, дифференцированной без ингибирования метилтрансферазы с использованием стромальной клетки.
66. Композиция, содержащая иммунную клетку по любому из пп. 60-65 или популяцию этих клеток.
67. Композиция по п. 66, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.
68. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку по любому из пп. 60-65 или популяцию этих клеток и фармацевтически приемлемый носитель.
69. Фармацевтическая композиция по п. 68 для применения в заместительной клеточной терапии у субъекта.
70. Способ клеточной заместительной терапии, предусматривающий введение иммунной клетки по любому из пп. 60-65 или их популяции, или композиции по пп. 66-67, или фармацевтической композиции по пп. 68-69 субъекту-реципиенту, нуждающемуся в этом.
71. Способ клеточной заместительной терапии по п. 70, в котором субъект-реципиент прошел химиотерапию и/или облучение.
72. Способ клеточной заместительной терапии по п. 70, в котором субъект-реципиент имеет недостаточность иммунной функции и/или восстановления лимфоцитов.
73. Способ клеточной заместительной терапии по любому из пп. 70-72, в котором перед трансплантацией иммунную клетку или ее популяцию обрабатывают *ex*

in vivo простагландином E2 и/или антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином (NAC) для стимуляции последующего приживания в субъекте-реципиенте.

74. Способ клеточной заместительной терапии по любому из пп. 70-73, в котором иммунная клетка или ее популяция являются аутологичными для субъекта-реципиента.

75. Способ заместительной клеточной терапии по любому из пп. 70-74, в котором тип HLA у иммунной клетки или ее популяции совпадает с субъектом-реципиентом.

Примеры

Пример 1. Дифференциация Т-клеток без стромы из плюрипотентных стволовых клеток человека.

[00443] Т-клетки являются ключевыми компонентами адаптивной иммунной системы человека и обладают большим терапевтическим потенциалом. Однако современная Т-клеточно-опосредованная терапия основана на аутологичных Т-клетках, что препятствует ее широкому применению. Индуцированные человеком плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) представляют собой идеальный источник для масштабируемого производства готовых продуктов для клеточной терапии. Однако получение зрелых и функциональных Т-клеток из iPSC оказалось затруднительным. Кроме того, дифференциация iPSC требует совместного культивирования со стромальными клетками мыши, что ограничивает трансляционный потенциал Т-клеток, полученных из iPSC.

[00444] В настоящем документе описан протокол дифференциации без использования сыворотки и стромы для дифференциации Т-клеток. Гемогенные CD34⁺ эндотелиальные клетки сначала получали из iPS (см., например, Пример 2). Планшеты, обработанные нетканевой культурой, покрывали рекомбинантными белками DL1/DL4-Fc человека (10 мкг/мл в PBS, 3 часа при комнатной температуре). Гемогенные эндотелиальные клетки, полученные из iPSC, культивировали на планшетах для тканевых культур, покрытых лигандами Notch, и факторы роста (Flt3, SCF, Il7, TPO), необходимые для развития Т-клеток, добавляли в среду последовательно (см., например, Фиг. 1А или Фиг. 17). Используя этот протокол, CD5⁺ CD7⁺ Т-клетки-предшественники могут быть получены после 2 недель дифференциации, а CD3⁺ Т-клетки наблюдаются после 5 недель дифференциации (см., например, Фиг. 1В). Эти CD3⁺ клетки могут дополнительно стимулироваться антителом против CD3/CD28, что приводит к усиленной пролиферации и индукции одиночных положительных по CD4 или CD8Т-клеток (см., например, Фиг.

1С). Кроме того, традиционный протокол дифференциации Т-клеток с использованием клеток OP9-DL4 продуцирует врожденно-подобные Т-клетки, которые экспрессируют гамма-дельта TCR. Описанный здесь протокол без стромы обеспечивает продуцирование увеличенного количества Т-клеток, и только небольшая часть этих клеток является врожденно-подобными клетками (см., например, Фиг. 1D), что указывает на то, что этот способ продуцирует Т-клетки, которые демонстрируют более зрелый фенотип. Таким образом, здесь описана новая платформа для создания более клинически значимых Т-клеток, полученных из iPSC.

[00445] Одним из применений способа дифференциации Т-клеток без стромы является получение CAR iPSC-Т-клеток. Химерный антигенный рецептор (CAR) против CD19 вводили в HSPC iPSC, и клетки дифференцировали в Т-клетки с использованием описанного здесь способа дифференциации Т-клеток без стромы (см., например, Фиг. 2A). Экспрессия CAR сохранялась во время дифференциации (см., например, Фиг. 2B). CAR Т-клетки размножались аналогично нетрансдуцированному (UTD) контролю (см., например, Фиг. 2C). Стимуляция клетками CD19-K562 приводила к активации CAR-iPSC Т-клеток, но не нетрансдуцированных (UTD) контрольных или нестимулированных CAR-iPSC Т-клеток (см., например, Фиг. 2D).

[00446] Анализ секвенирования РНК проводили на первичных Т-клетках и Т-клетках, полученных из iPSC. Экспрессию сигнатурных генов Т-клеток исследовали для сравнения сходства iPSC-Т-клеток с РВМС $\alpha\beta$ Т, $\gamma\delta$ Т и NK-клетками (см., например, **Фиг. 3A**). Экспрессию генов, которые различают альфа-бета-Т-клетки и гамма-дельта-Т-клетки, исследовали для сравнения сходства iPSC-Т-клеток с TCR $\alpha\beta$ и TCR $\gamma\delta$ Т-клетками (см., например, **Фиг. 3B**). Результаты показывают, что способы дифференциации, описанные здесь, позволяют продуцировать iPSC-Т-клетки (EZ-Т), которые демонстрируют профиль экспрессии генов, сходный с альфа-бета-Т-клетками из периферической крови донора (abТ). Для сравнения, традиционные iPSC-Т-клетки (conT_OP9) имели фенотип врожденно-подобных Т-клеток. Соответственно, описанные здесь способы (например, без стромы и с нокдауном EZH1) продуцируют Т-клетки с профилями экспрессии, наиболее близкими к природным Т-клеткам, по сравнению со способами с использованием стромы.

[00447] Клетки EZ-Т также демонстрируют разнообразный репертуар TCR. Клетки EZ-Т относятся к Т-клеткам, дифференцированным из CD34⁺ HE, включая ингибирование EZH1 и дифференциацию Т-клеток без стромы, как описано здесь. Секвенирование бета-цепи TCR было выполнено на клетках EZ-Т, и были идентифицированы десятки тысяч уникальных реаранжировок TCR в результате случайной рекомбинации генов TCR во время дифференциации Т-клеток. Было

исследовано использование семейств генов TCRBV в клетках EZ-T. Каждый оттенок отражает одно семейство TCRBV. Продуктивное значение клоальности Симпсона составило 0,0233, что указывает на очень разнообразный репертуар TCR. См., например, **Фиг.4.**

[00448] Клетки EZ-T также имеют более длинные сегменты CDR3, чем контрольные клетки PSC-T. CDR3 является наиболее вариабельной областью TCR, и ее длина может определяться активностью фермента TdT, который случайным образом добавляет нуклеотиды во время перестройки TCR. Сообщалось, что CDR3 короче в незрелых Т-клетках и Т-клетках, полученных из iPSC, по сравнению со зрелыми Т-клетками PBMC. Клетки EZ-T показали увеличенную длину CDR3 по сравнению с контрольными Т-клетками, полученными из iPSC, и были более похожи на Т-клетки PBMC (см., например, **Фиг. 5A-5D**). Поскольку клетки EZ-T демонстрируют более длинные области за счет добавления TdT, то такие CDR демонстрируют большую изменчивость последовательностей и, следовательно, более разнообразный репертуар TCR.

Пример 2: Способ получения гомогенного эндотелия

[00449] Здесь описан 8-дневный протокол получения гомогенного (CD34⁺) эндотелия из индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток; см., например, Sturgeon et al., Wnt Signaling Controls the Specification of Definitive and Primitive Hematopoiesis From Human Pluripotent Stem Cells, Nat Biotechnol. 2014 июнь; 32(6): 554–561, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

День 0: Получение EB из iPSC на MEF

[00450] Как правило, после трех дней или одной недели культивирования на мышинных эмбриональных фибробластах (MEF) iPS-клетки готовы образовывать эмбриоидные тельца (EB). Следующий протокол используется для D0.

[00451] 1. Промывали iPS-клетки, выращенные на MEF, 5 мл среды DMEM/F12.

[00452] 2. Аспирировали среду из каждой чашки. Заменяли на 5 мл 1X коллагеназы IV, разбавленной в 0,22 мкМ фильтрованной средой DMEM/F12.

[00453] 3. Инкубировали при 37°C в течение 5-10 минут и периодически проверяли под микроскопом, отделяются ли колонии iPS.

[00454] 4. Аспирировали коллагеназу IV и заменяли ее 5 мл фильтрованной средой DMEM/F12.

[00455] 5. С помощью стерильного скребка для клеток соскобливали колонии сначала с краев чашки, затем слева направо, а затем сверху вниз.

[00456] 6. Аккуратно и медленно переносили клетки в коническую пробирку с помощью серологической пипетки на 10 мл. Если имелись остаточные колонии, то чашки промывали дополнительными 5 мл и добавляли в ту же пробирку.

[00457] 7. Центрифугировали при 1100 об/мин в течение 1 мин.

[00458] 8. Пока клетки вращались, добавляли 9 мл среды для агрегации с BMP4 (см., например, Таблицу 1) в чашки Corning Ultra Low Adherent диаметром 10 см.

[00459] 9. Аспирировали среду из осажденных колоний iPS и ресуспендировали в 1 мл среды для агрегации с BMP4.

[00460] 10. Аккуратно переносили 1 мл клеток в каждую 10-сантиметровую чашку Ultra Low Adherent, содержащую среду для агрегации. Используя ту же пипетку, отбирали 1 мл из области планшета где не было никаких клеток, и промывали коническую пробирку. Добавляли обратно 1 мл в коническую пробирку; конечный объем каждой чашки, содержащей теперь 3-4 исходных чашки iPS-клеток, теперь составлял 10 мл.

[00461] 11. Чашки переносили в гипоксический инкубатор (5% O₂) при 37°C. 4-5 чашек ставили друг на друга, при этом одну чашку, заполненную PBS, помещали внизу стопки для предотвращения испарения.

Эти операции были выполнены в День 0 получения культуры EB.

День 1: Добавление bFGF

[00462] В день 1 выполняли следующий протокол: 1. Непосредственно добавляли bFGF в каждую 10 см чашку с EB до конечной концентрации 5 нг/мл. Встряхивали чашку для распределения в среде.

День 2: Полная замена среды D2

[00463] На второй день вводили среду D2. Использовали следующий протокол для D2.

[00464] 1. Среда для агрегации D2 включает следующее (см., например, Таблицу 1): BMP4, bFGF, CHIR99021 (StemCell Technologies Inc. № 72054) и SB431542 (StemCell Technologies Inc. № 72234). После оттаивания SB и CHIR повторное замораживание не рекомендуется.

[00465] 2. Собирали EB с помощью серологической пипетки на 10 мл и помещали в коническую пробирку.

[00466] 3. Давали EB отстояться приблизительно 15 минут.

[00467] 4. Аспирировали среду и ресуспендировали в среде D2 (чашка 10 мл/10 см), затем аккуратно переносили обратно в чашки со сверхнизкой адгезией.

День 3: Полная смена среды на среду D3

[00468] На 3-й день вводили среду D3. Использовали следующий протокол для D3.

[00469] 1. Среда для агрегации D3 включает следующее (см., например, Таблицу 1): VEGF и bFGF.

[00470] 2. Собирали EB с помощью серологической пипетки на 10 мл и помещали в коническую пробирку.

[00471] 3. Давали EB отстояться приблизительно 15 минут.

[00472] 4. Аспирировали среду и ресуспендировали в среде D3 (чашка 10 мл/10 см), затем аккуратно переносили обратно в чашки со сверхнизкой адгезией.

Дни 4–5: Без смены среды

[00473] В дни 4-5 никаких изменений в среде не производили.

День 6: Полная замена среды на среду D6

[00474] На 6-й день вводили среду D6. Использовали следующий протокол для D6.

[00475] 1. Среда для агрегации D6 включает следующее (см., например, Таблицу 1): рекомбинантный человеческий VEGF 165 (VEGF-A) (R&D Systems (R&D) # 293-VE-500), bFGF, SCF, EPO, IL-6 рекомбинантный человеческий IL-6 (20 мкг) (Peprotech™ # 200-06), IL-11 и IGF-1.

[00476] 2. Собирали EB с помощью серологической пипетки на 10 мл и помещали в коническую пробирку.

[00477] 3. Давали EB осесть приблизительно на 15 минут.

[00478] 4. Аспирировали среду и ресуспендировали в среде D6 (чашка 10 мл/10 см), затем осторожно переносили обратно в чашки со сверхнизкой адгезией.

День 7: Без смены среды

[00479] На 7-й день смену среды не производили.

День 8: Выделение гомогенного эндотелия путем сортировки MAC для CD34+ клеток.

[00480] На 8-й день гомогенный эндотелий выделяли с помощью магнитно-активируемой клеточной сортировки (MACS) для CD34⁺ клеток. Затем популяцию CD34⁺ гомогенного эндотелия можно использовать для дифференциации Т-клеток с использованием способа дифференциации Т-клеток без стромы, как описано здесь (см., например, пример 1).

[00481] Таблица 1: Цитокины для культуры EB

Продукт	Окончательная концентрация	Исходная концентрация	Разбавление	Дни	На 10 мл среды
BMP4	10 нг /мл	100 мкг /мл	10000	0,2	1
SB-431542	6 мМ	100 мМ	16666	2	0,6
CHIR99021	3 мМ	50 мМ	16666	2	0,6
bFGF	5 нг /мл	50 мкг /мл	2000 г.	1,2,3,6	1
VEGF	15 нг /мл	150 мкг /мл	10000	3,6	1
IL-6	10 нг /мл	100 мкг /мл	10000	6	1
IL-11	5 нг /мл	50 мкг /мл	10000	6	1
IGF-1	25 нг /мл	250 мкг /мл	10000	6	1
SCF	50 нг /мл	100 мкг /мл	2000 г.	6	5
EPO	2 ЕД/мл	10000 ЕД/мл	5000	6	2

Пример 3: Ингибирование эпигенетических регуляторов (например, G9a/GLP)

[00482] Группа эпигенетических регуляторов была протестирована в отношении их способности стимулировать дифференциацию Т-клеток. В первом скрининге 5F клеток UNC0224, MC1568 или CAY10591 значительно увеличивали количество итоговых рго Т-клеток (см., например, **Фиг. 6-8**). Во втором скрининге CD34⁺клеток, происходящих из EB (например, CD34⁺гомогенный эндотелий), например, с использованием способов дифференциации Т-клеток без стромы, как описано здесь, UNC0224 значительно увеличивал количество результирующих рго Т-клеток (см., например, **Фиг. 9-11**).). Дозозависимая реакция показала, что концентрация UNC0224 от 312 нМ до 5 мкМ лучше всего способствует дифференциации Т-клеток (см., например, **Фиг. 12A-12B**). UNC0224 является ингибитором G9a/GLP, поэтому было протестировано множество других ингибиторов G9a/GLP. Каждый из UNC0638, BRD4770, BIX01294 и UNC0642 значительно увеличивал количество полученных ргоТ-клеток (см., например, **Фиг. 13B, 13D-13F**).

[00483] UNC0224 усиливает коммитацию Т-клеток за счет эритроидного/миелоидного потенциала. Хотя обработка UNC0224 приводила к значительному увеличению CD5+CD7+ Pro Т-клеток, она также приводила к значительному снижению клеток эритроидного или миелоидного происхождения (см., например, **Фиг. 14А-14С**). UNC0224 также способствовал спецификации Т-клеток, а не пролиферации клеток. В то время как обработка UNC0224 приводила к значительному увеличению числа или процента CD5+CD7+ Pro Т-клеток, она также приводила к значительному снижению общего количества клеток (см., например, **Фиг. 15А-15С**). Не желая быть связанными теорией, ожидается, что метилирование H3K9 опосредует репрессию лимфоидных генов. Таким образом, обработка ингибиторами метилирования H3K9 (см., например, **Фиг. 6-16, Таблицы 2-3**) способствует дифференциации Т-клеток, например, при использовании способов дифференциации Т-клеток без стромы, как описано здесь. Такие ингибиторы метилирования H3K9 можно использовать вместо или в сочетании с ингибированием гистоновых метилтрансфераз (например, нокдаун EZH1).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ, предусматривающий:

а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия;

б) ингибирование гистонметилтрансферазы в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и

с) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

2. Способ, предусматривающий:

а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия;

б) ингибирование эпигенетического регулятора в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и

с) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

3. Способ, предусматривающий:

а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия;

б) ингибирование G9a и/или GLP в полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия; и

с) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

4. Способ, предусматривающий:

а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и

б) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток в присутствии лиганда Notch в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором лиганд Notch присоединен к твердой подложке.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором лиганд Notch присоединен к чашке для культивирования клеток.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором лиганд Notch получен не из стромальной клетки.

8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором дифференциация гемогенного эндотелия в присутствии лиганда Notch не предусматривает совместного культивирования со стромальной клеткой, экспрессирующей лиганд Notch.

9. Способ по любому из пп. 1-8, в котором дифференциация гемогенного эндотелия в присутствии лиганда Notch не предусматривает совместного культивирования с клетками OP9-DL1 или клетками OP9-DL4.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором лиганд Notch выбран из группы, состоящей из Delta-like-1 (DLL1), Delta-like-4 (DLL4), иммобилизованного Delta1^{ext-IgG} и иммобилизованного Delta4^{ext-IgG}.

11. Способ по п. 10, в котором иммобилизованный Delta1^{ext-IgG} состоит из внеклеточного домена Delta-like-1 человека, слитого с доменом Fc IgG1 человека.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток составляет по меньшей мере 4 недели.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток не содержит сыворотки.

14. Способ по любому из пп. 1-13, в котором среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток содержит FLT3 и IL7.

15. Способ по любому из пп. 1-14, в котором среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток содержит 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл тромбопоэтина (ТРО) и/или 30 нг/мл SCF в течение по меньшей мере первых 2 недель дифференциации в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащая ТРО, способствует дифференциации в популяцию CD5⁺ CD7⁺ Pro Т-клеток.

18. Способ по любому из пп. 1-4, в котором популяция $CD3^+$ Т-клеток содержит популяцию $CD4^+CD8^+$ Т-клеток.

19. Способ по п. 18, дополнительно предусматривающий дифференциацию популяции $CD4^+CD8^+$ Т-клеток в среде для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию $CD4^+$ клеток и популяцию $CD8^+$ клеток.

20. Способ по п. 19, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции $CD4^+CD8^+$ Т-клеток в популяцию $CD4^+$ Т-клеток и популяцию $CD8^+$ клеток составляет по меньшей мере 1 неделю.

21. Способ по п. 19, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции $CD34^+$ гемогенного эндотелия в популяцию $CD4^+$ Т-клеток и популяцию $CD8^+$ клеток составляет по меньшей мере 5 недель.

22. Способ по п. 19, в котором среда для дифференциации в одиночно-положительные Т-клетки содержит 10 нг/мл IL-15 и активатор Т-клеток.

23. Способ по п. 22, в котором активатор Т-клеток содержит 10 мкл/мл активатора CD3/CD28 Т-клеток.

24. Способ по п. 22, в котором активатор Т-клеток содержит одну гранулу активатора Dynabeads CD3/CD28 Т-клеток на клетку.

25. Способ по любому из пп. 18-24, дополнительно предусматривающий по меньшей мере через 1 неделю стадию обогащения клеток $CD4^+$ и/или обогащения клеток $CD8^+$.

26. Способ по любому из пп. 1-4, в котором популяция плюрипотентных стволовых клеток включает индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) или эмбриональные стволовые клетки (ESC).

27. Способ по п. 26, в котором индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем введения в зрелые клетки только факторов перепрограммирования *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и необязательно *c-MYC* или *nanog* и *LIN28*.

28. Способ по п. 26, в котором индуцированные плюрипотентные стволовые клетки получают путем введения факторов перепрограммирования два или более раз в зрелые клетки.

29. Способ по любому из пп. 1-4, в котором популяцию плюрипотентных стволовых клеток дифференцируют в популяцию $CD34^+$ гемогенного эндотелия с использованием эмбрионных телец или двумерных (2D) адгезивных культур.

30. Способ по любому из пп. 1-4, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия составляет по меньшей мере 8 дней.

31. Способ по любому из пп. 1-4, в котором среда для агрегации содержит BMP4, SB-431542, CHIR99021, bFGF, VEGF, IL-6, IL-11, IGF-1, SCF и EPO.

32. Способ по любому из пп. 29-31, в котором среда для агрегации содержит 10 нг/мл BMP4, 6 мМ SB-431542, 3 мМ CHIR99021, 5 нг/мл bFGF, 15 нг/мл VEGF, 10 нг/мл IL-6, 5 нг/мл IL-11, 25 нг/мл IGF-1, 50 нг/мл SCF и 2 ЕД/мл EPO.

33. Способ по любому из пп. 29-32, дополнительно предусматривающий отбор или выделение полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия с использованием экспрессии поверхностных маркеров на популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия.

34. Способ по любому из пп. 29-33, в котором популяция CD34⁺ гемогенного эндотелия является CD45-отрицательной/низкой.

35. Способ по любому из пп. 29-34, в котором популяция CD34⁺ гемогенного эндотелия является CD38-отрицательной/низкой.

36. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно предусматривающий стадию генетической модификации полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия или полученной популяции CD3⁺ Т-клеток.

37. Способ по п. 36, в котором генетическая модификация представляет собой редактирование эндогенного HLA, удаление эндогенного TCR и/или экспрессию химерного антигенного рецептора (CAR).

38. Способ по п. 1, в котором гистонметилтрансфераза катализирует присоединение метильной группы к остатку лизина 9 гистона 3 (H3K9) и/или к остатку лизина 27 гистона 3 (H3K27).

39. Способ по п. 1, в котором гистонметилтрансферазу H3K9 и/или H3K27 ингибируют низкомолекулярным ингибитором или ингибитором нуклеиновой кислоты.

40. Способ по п. 39, в котором низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы H3K9 и/или H3K27 представляет собой гетероорганическое соединение или металлоорганическое соединение.

41. Способ по п. 39, в котором низкомолекулярный ингибитор гистонметилтрансферазы H3K9 и/или H3K27 выбран из группы, состоящей из BIX-01294, UNC0638, E72, BRD4770, A-366, хетоцина, UNC0224, UNC0631, UNC0646, EPZ005687, EPZ-6438 (E7438), 3-деазанепланоцина А (DZNep), EI1, GSK343, GSK126 и UNC1999.

42. Способ по п. 39, в котором ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой нуклеиновую кислоту, нацеленную на экспрессию гистонметилтрансферазы.

43. Способ по п. 39, в котором ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой РНК-интерферирующий ингибитор или агент.

44. Способ по п. 39, в котором ингибитор нуклеиновой кислоты представляет собой EZH1-специфическую нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из аптамера, связывающего EZH1, EZH1-специфического РНК-интерферирующего агента и вектора, кодирующего EZH1-специфический РНК-интерферирующий агент, где РНК-интерферирующий агент содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 11-19.

45. Способ по п. 2, в котором эпигенетический регулятор представляет собой ДНК-метилтрансферазу (DNMT); белок метил-СрG-связывающего домена (MBD); ДНК-деметилазу; гистонметилтрансферазу (HMT); белок, связывающий метилгистон; гистондеметилазу; гистон-ацетилтрансферазу (HAT); ацетилсвязывающий белок или гистондеацетилазу (HDAC).

46. Способ по п. 45, в котором ингибитор эпигенетического регулятора выбран из группы, состоящей из: UNC0224; MC1568 и CAY10591.

47. Способ по любому из пп. 45-46, в котором ингибитор эпигенетического регулятора представлен в концентрации по меньшей мере 500 нМ.

48. Способ по любому из пп. 45-46, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34⁺ клеток в популяцию CD5⁺CD7⁺ proT-клеток, составляет приблизительно 14 дней.

49. Способ по п. 3, в котором ингибитор G9a и/или GLP выбран из группы, состоящей из: UNC0224; UNC0638; A366; BRD4770; BIX01294; UNC0642; UNC0631; UNC0646; UNC0321; E72; BIX-01338; BRD9539; хетоцина и DCG066.

50. Способ по п. 49, в котором ингибитор G9a и/или GLP представляет собой UNC0224.

51. Способ по любому из пп. 49-50, в котором ингибитор G9a и/или GLP представлен в концентрации от 300 нМ до 5 мкМ.

52. Способ по любому из пп. 49-51, в котором время, достаточное для стимуляции дифференциации из популяции CD34⁺ клеток в популяцию CD5⁺CD7⁺ proT-клеток, составляет приблизительно 14 дней.

53. Способ, предусматривающий:

а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и

б) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение не менее 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток;

при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл TPO и 30 нг/мл SCF по меньшей мере в течение первых двух недель.

54. Способ, предусматривающий:

а) дифференциацию популяции плюрипотентных стволовых клеток в среде агрегации в течение времени, достаточного для стимуляции дифференциации в популяцию CD34⁺ гемогенного эндотелия; и

б) дифференциацию полученной популяции CD34⁺ гемогенного эндотелия в среде для дифференциации CD3⁺-Т-клеток, содержащей 15 нг/мл FLT3 и 25 нг/мл IL7, в присутствии 10 мкг /мл лиганда Notch, в течение не менее 4 недель для стимуляции дифференциации в популяцию CD3⁺ Т-клеток;

при этом среда для дифференциации CD3⁺-Т-клеток дополнительно содержит 5 нг/мл TPO, 30 нг/мл SCF и ингибитор G9a/GLP, в течение по меньшей мере первых двух недель.

55. Способ по любому из пп. 1-54, в котором популяция CD3⁺ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, наиболее сходный с альфа-бета Т-клетками.

56. Способ по любому из пп. 1-55, в котором популяция CD3⁺ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или более сходен с альфа-бета-Т-клетками.

57. Способ по любому из пп. 1-56, в котором популяция CD3⁺ Т-клеток имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,85.

58. Способ по любому из пп. 1-57, в котором популяция CD3⁺ Т-клеток имеет значение продуктивной клональности Симпсона равное приблизительно 0,025.

59. Способ по любому из пп. 1-58, в котором популяция CD3⁺ Т-клеток имеет определяющую комплементарность область (CDR) Т-клеточного рецептора (TCR), которая по меньшей мере на 3 нуклеотида длиннее, чем у иммунной клетки, дифференцированной без ингибирования метилтрансферазой или с использованием стромальных клеток.

60. Иммунная клетка, полученная способом по любому из пп. 1-59.

61. Иммунная клетка по п. 60, где иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, который наиболее подобен альфа-бета Т-клеткам.

62. Иммунная клетка по любому из пп. 60-61, где иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40% или более подобен альфа-бета Т-клеткам.

63. Иммунная клетка по любому из пп. 60-62, где иммунная клетка имеет профиль экспрессии генов с коэффициентом корреляции Пирсона по сравнению с альфа-бета-Т-клетками периферической крови составляющим по меньшей мере 0,85.

64. Иммунная клетка по любому из пп. 60-63, где иммунная клетка имеет значение продуктивной клональности Симпсона равное приблизительно 0,025.

65. Иммунная клетка по любому из пп. 60-64, где иммунная клетка имеет определяющую комплементарность область (CDR) Т-клеточного рецептора (TCR), которая по меньшей мере на 3 нуклеотида длиннее, чем у иммунной клетки, дифференцированной без ингибирования метилтрансферазы с использованием стромальной клетки.

66. Композиция, содержащая иммунную клетку по любому из пп. 60-65 или популяцию этих клеток.

67. Композиция по п. 66, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

68. Фармацевтическая композиция, содержащая иммунную клетку по любому из пп. 60-65 или популяцию этих клеток и фармацевтически приемлемый носитель.

69. Фармацевтическая композиция по п. 68 для применения в заместительной клеточной терапии у субъекта.

70. Способ клеточной заместительной терапии, предусматривающий введение иммунной клетки по любому из пп. 60-65 или их популяции, или композиции по пп. 66-67, или фармацевтической композиции по пп. 68-69 субъекту-реципиенту, нуждающемуся в этом.

71. Способ клеточной заместительной терапии по п. 70, в котором субъект-реципиент прошел химиотерапию и/или облучение.

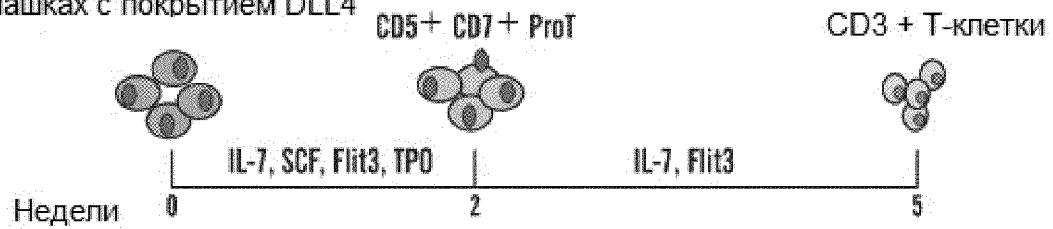
72. Способ клеточной заместительной терапии по п. 70, в котором субъект-реципиент имеет недостаточность иммунной функции и/или восстановления лимфоцитов.

73. Способ клеточной заместительной терапии по любому из пп. 70-72, в котором перед трансплантацией иммунную клетку или ее популяцию обрабатывают *ex vivo* простагландин Е2 и/или антиоксидантом N-ацетил-L-цистеином (NAC) для стимуляции последующего приживания в субъекте-реципиенте.

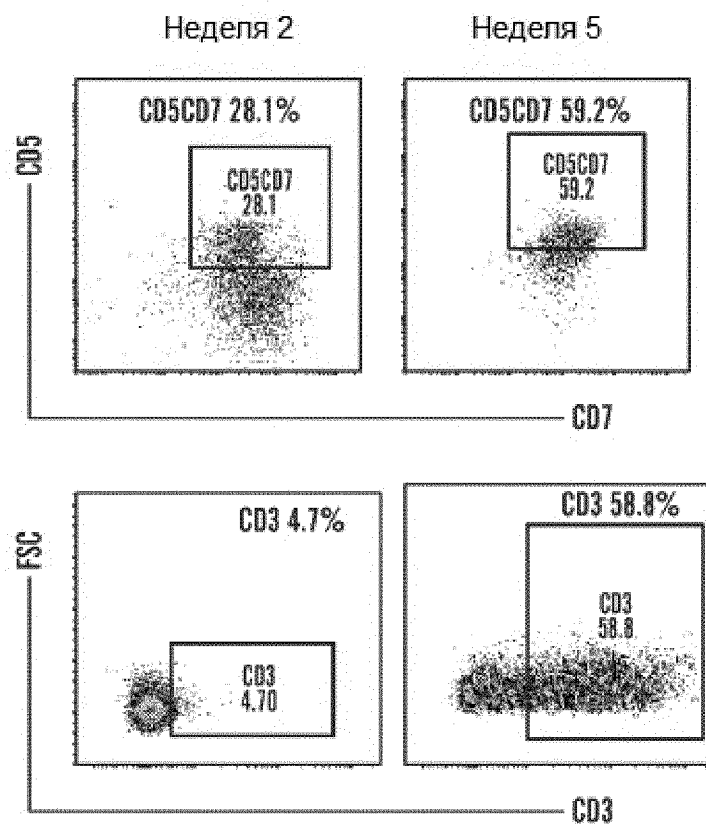
74. Способ клеточной заместительной терапии по любому из пп. 70-73, в котором иммунная клетка или ее популяция являются аутологичными для субъекта-реципиента.

75. Способ заместительной клеточной терапии по любому из пп. 70-74, в котором тип HLA у иммунной клетки или ее популяции совпадает с субъектом-реципиентом.

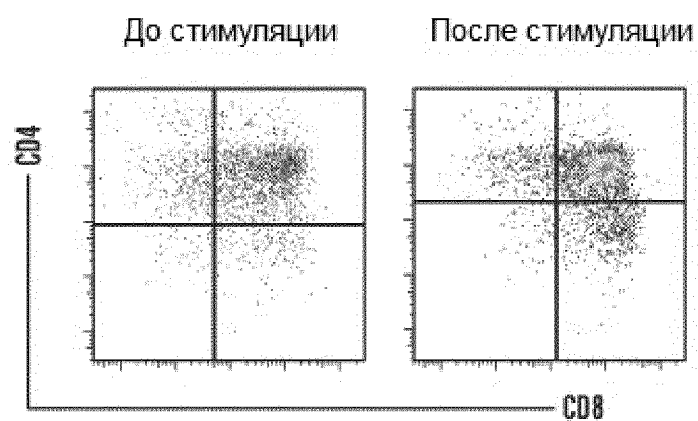
HSP, полученные из iPSC
на чашках с покрытием DLL4



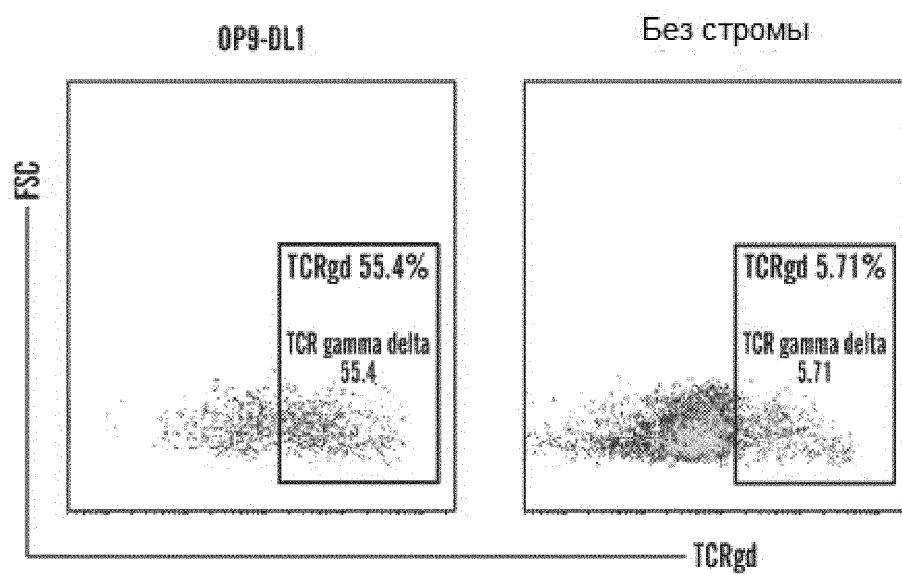
Фиг. 1А



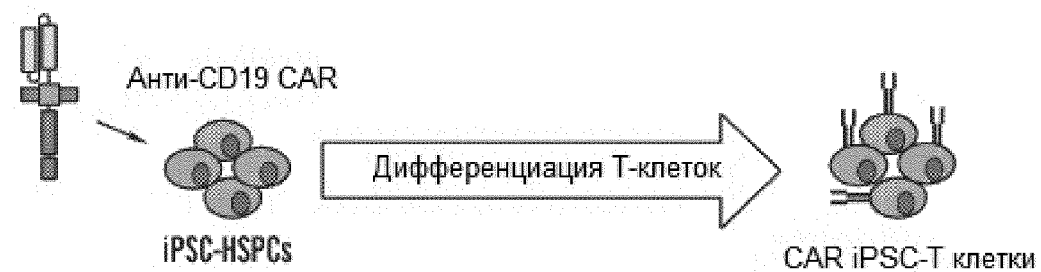
Фиг. 1В



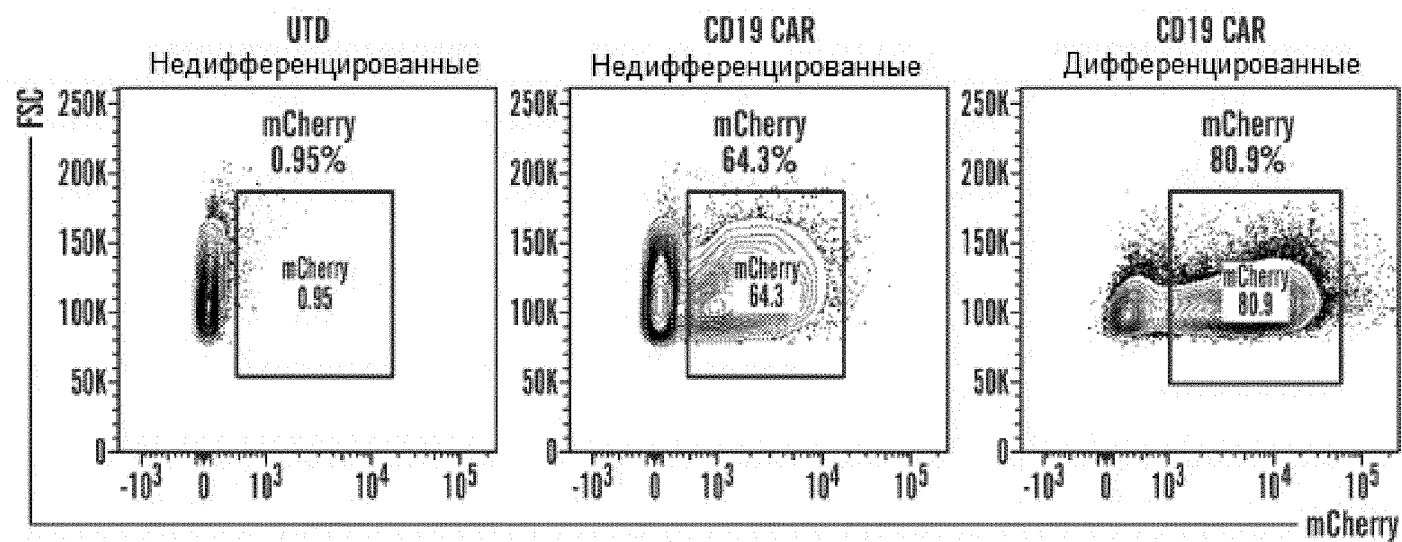
Фиг. 1С



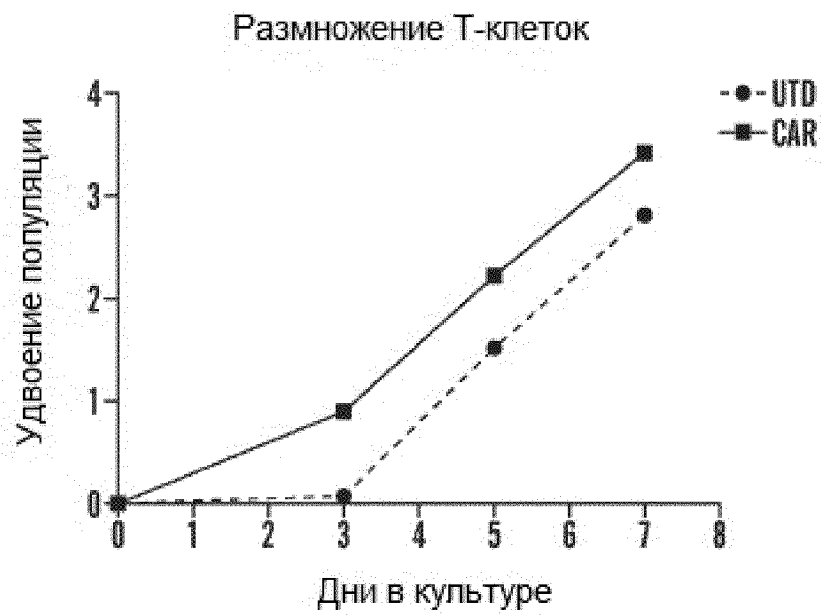
Фиг. 1D



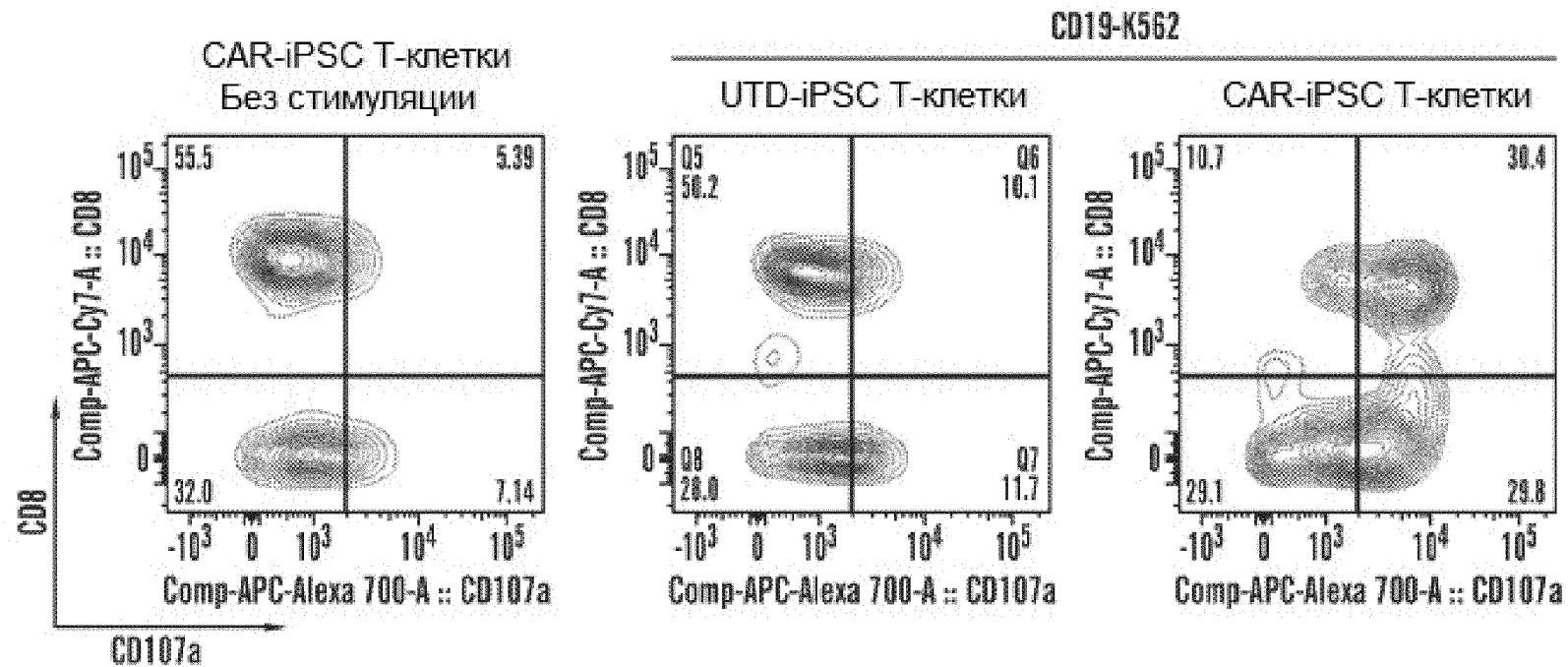
Фиг. 2А



Фиг. 2В

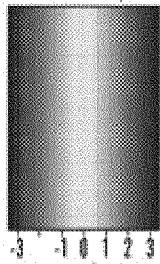


Фиг. 2С



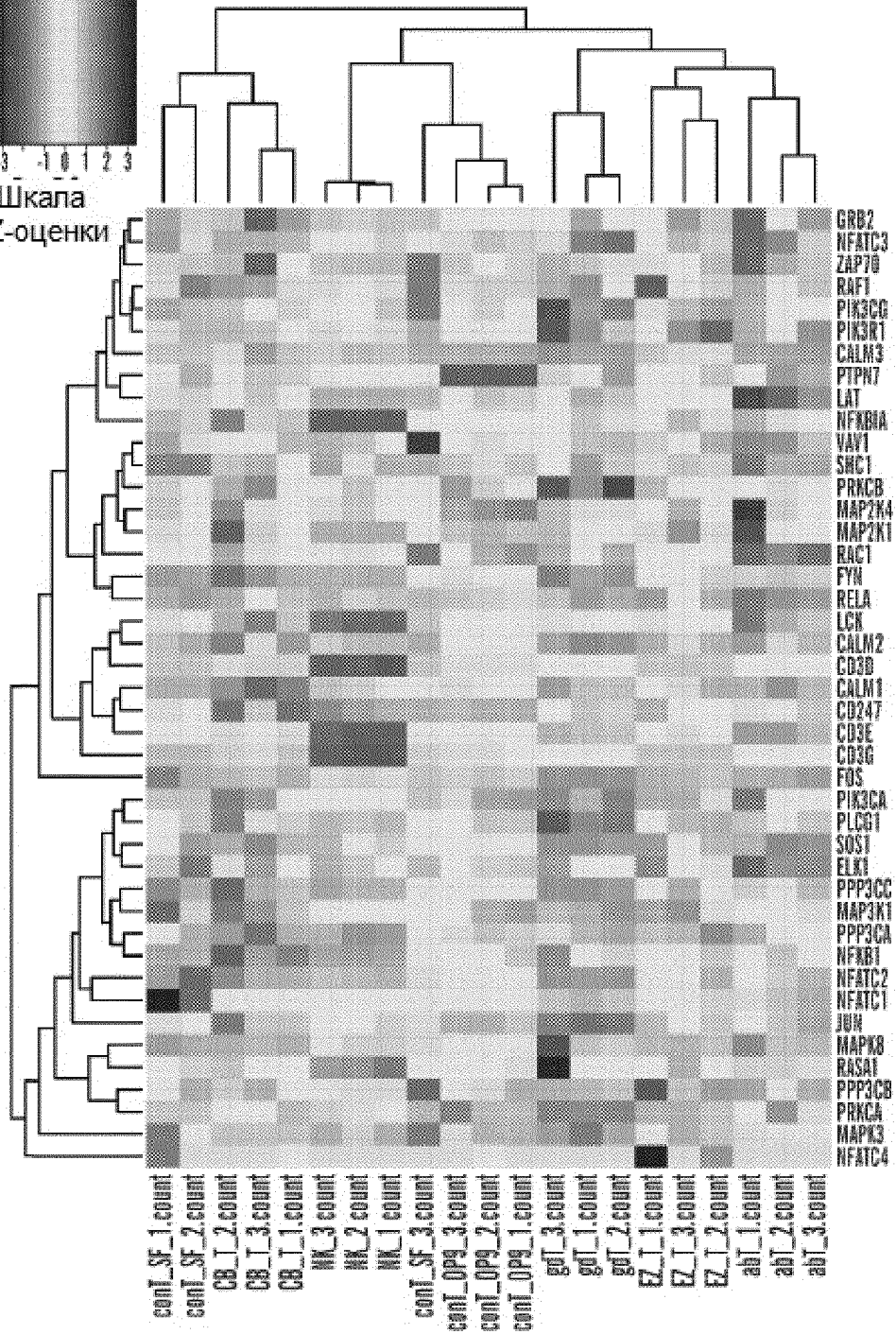
Фиг. 2D

Цветовой ключ



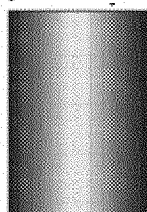
Шкала

Z-оценки



Фиг. 3А

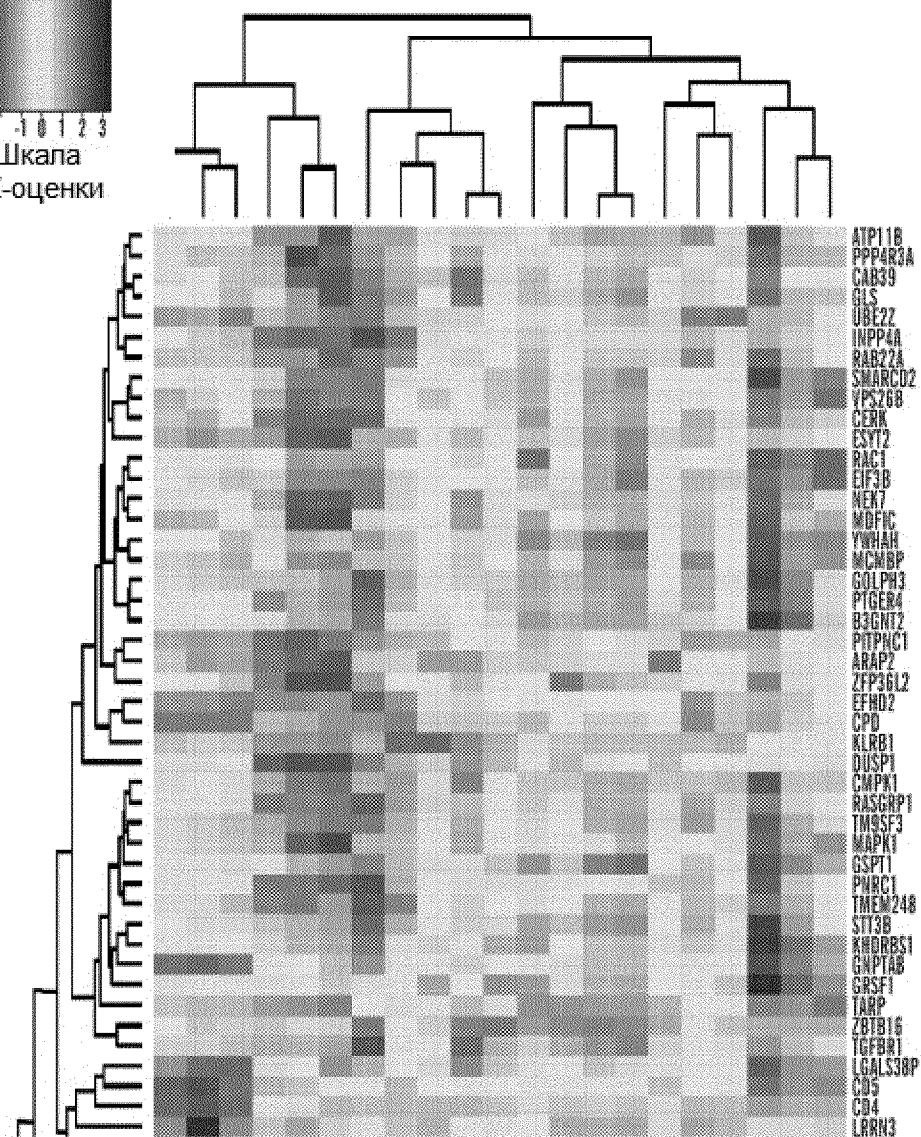
Цветовой ключ



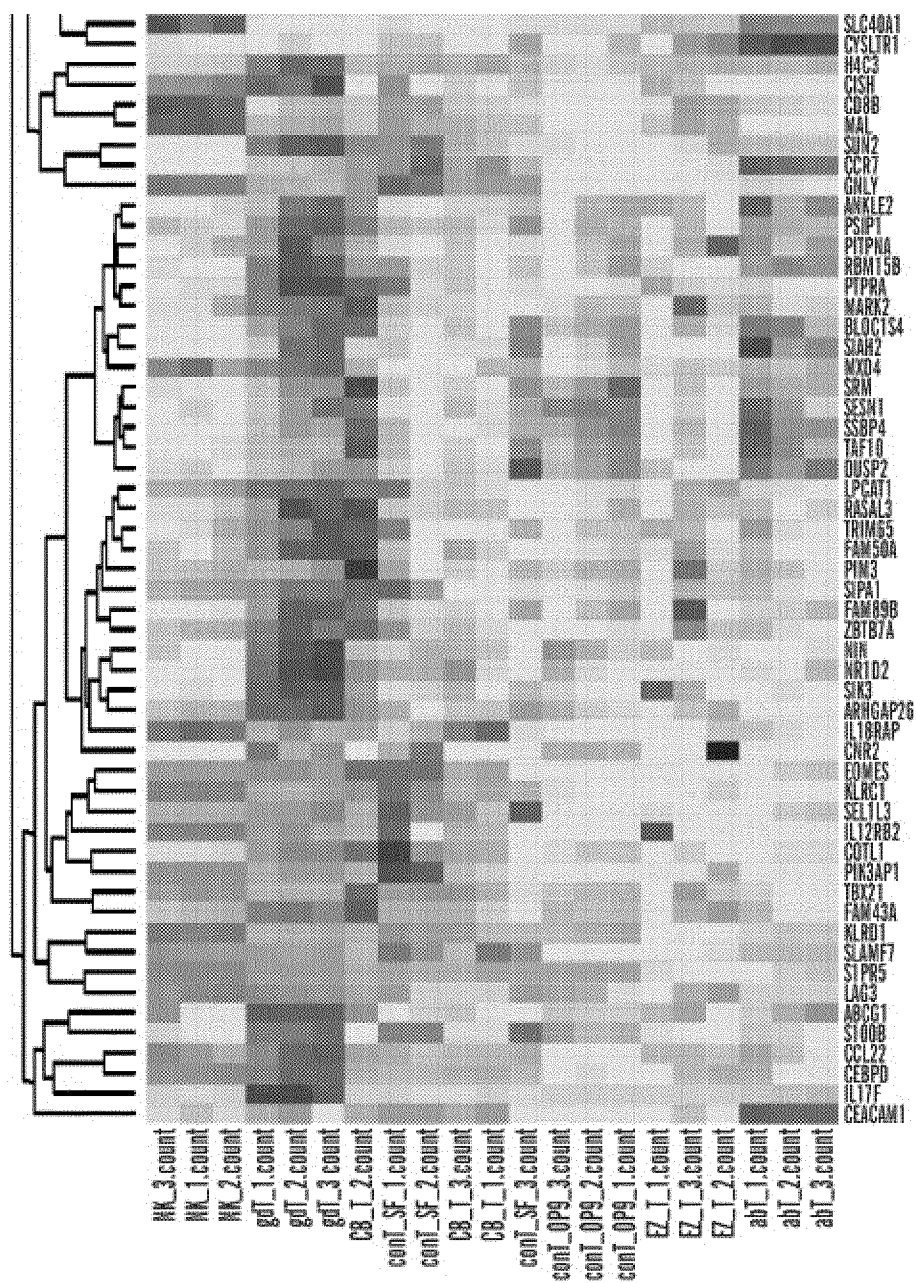
-3 -1 0 1 2 3

Шкала

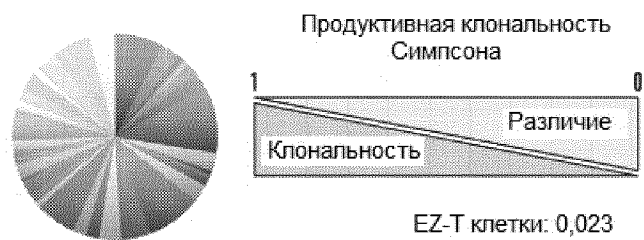
Z-оценки



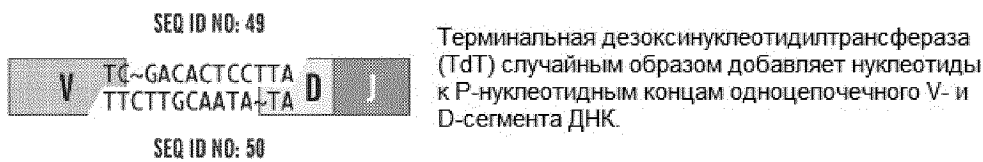
Фиг. 3В



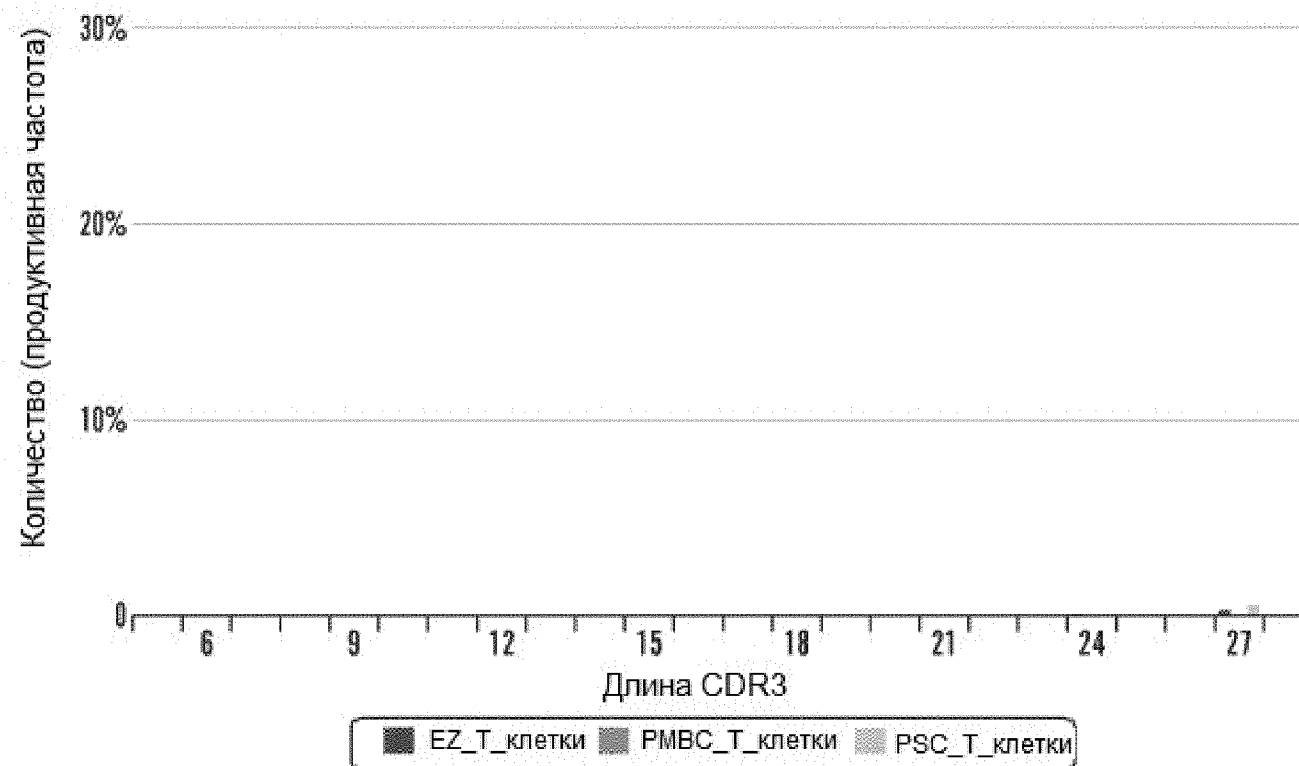
Фиг. 3В (продолжение)



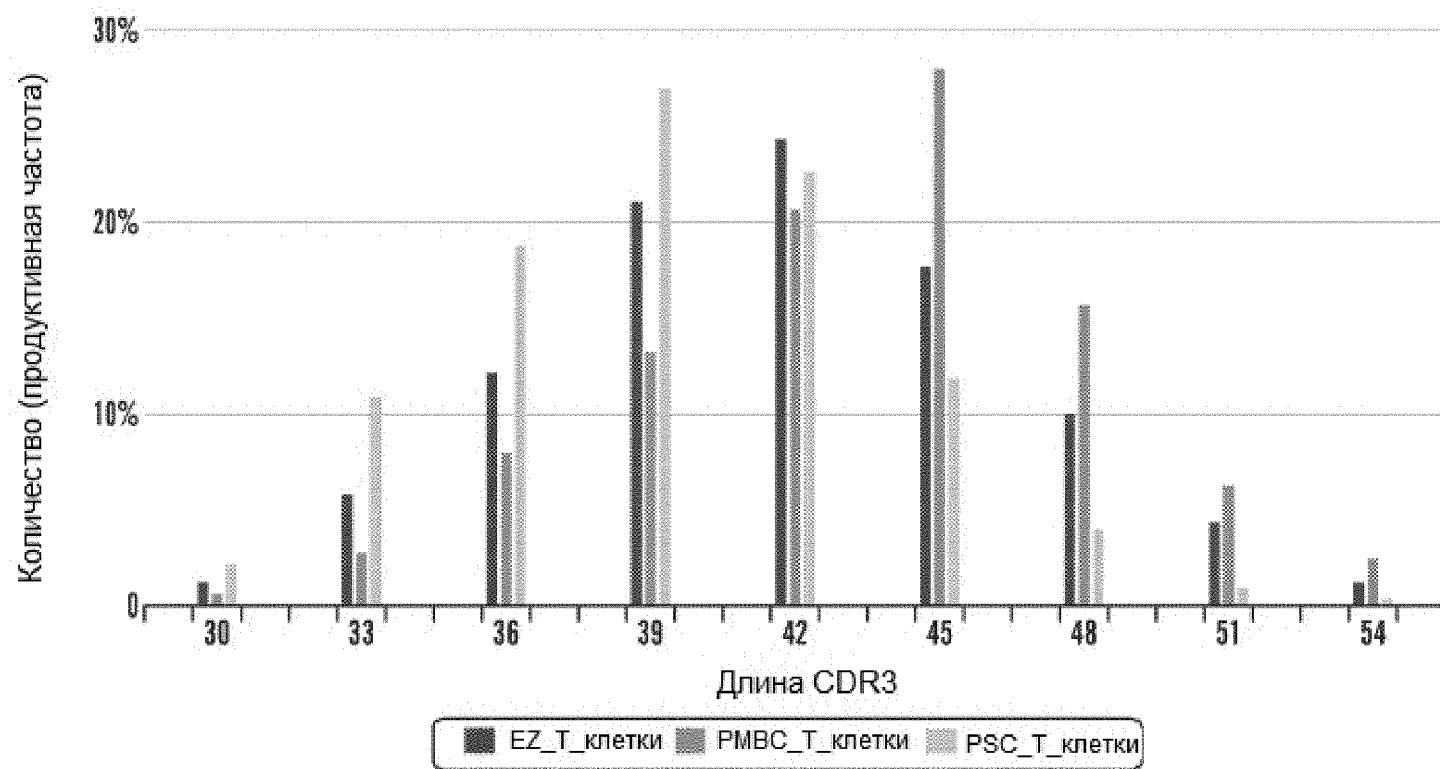
Фиг. 4



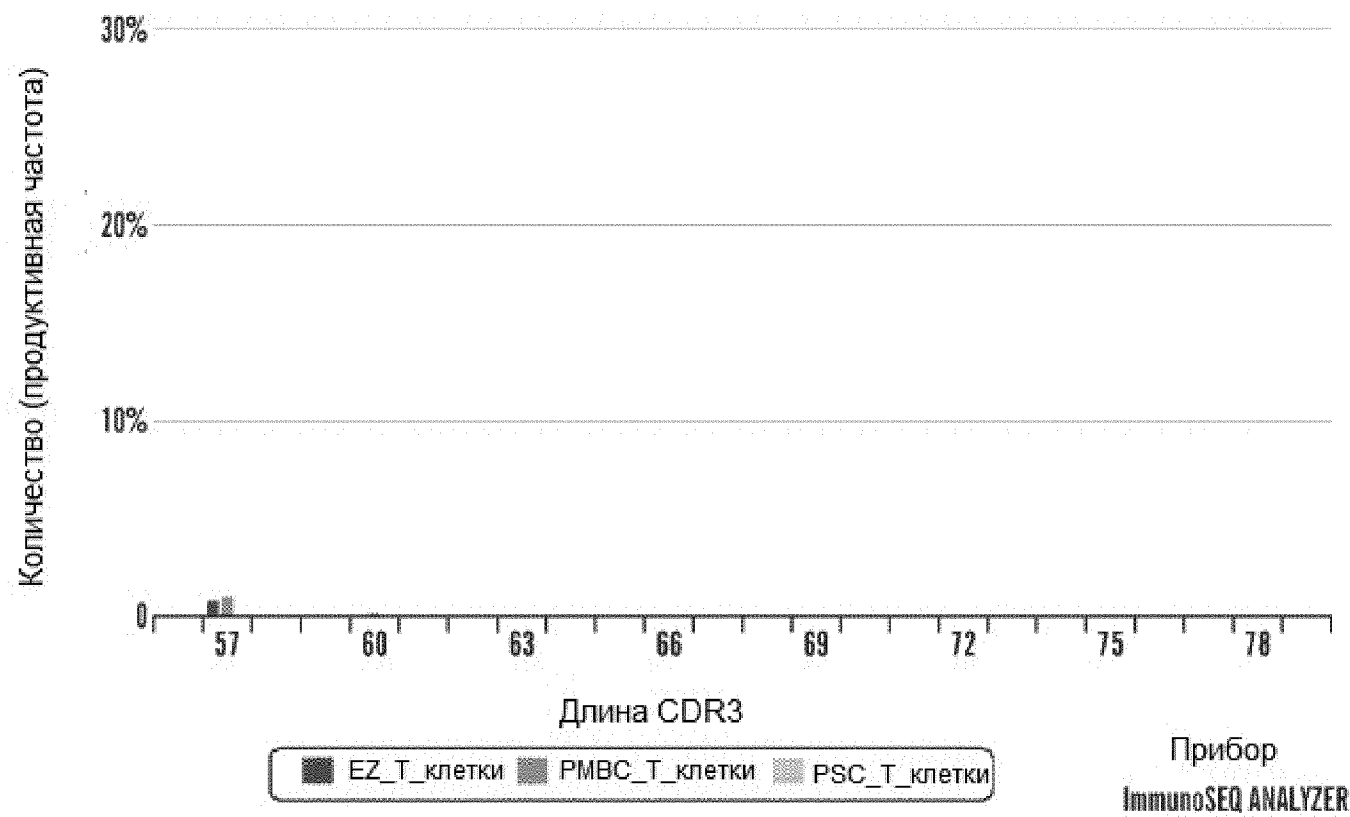
Фиг. 5А



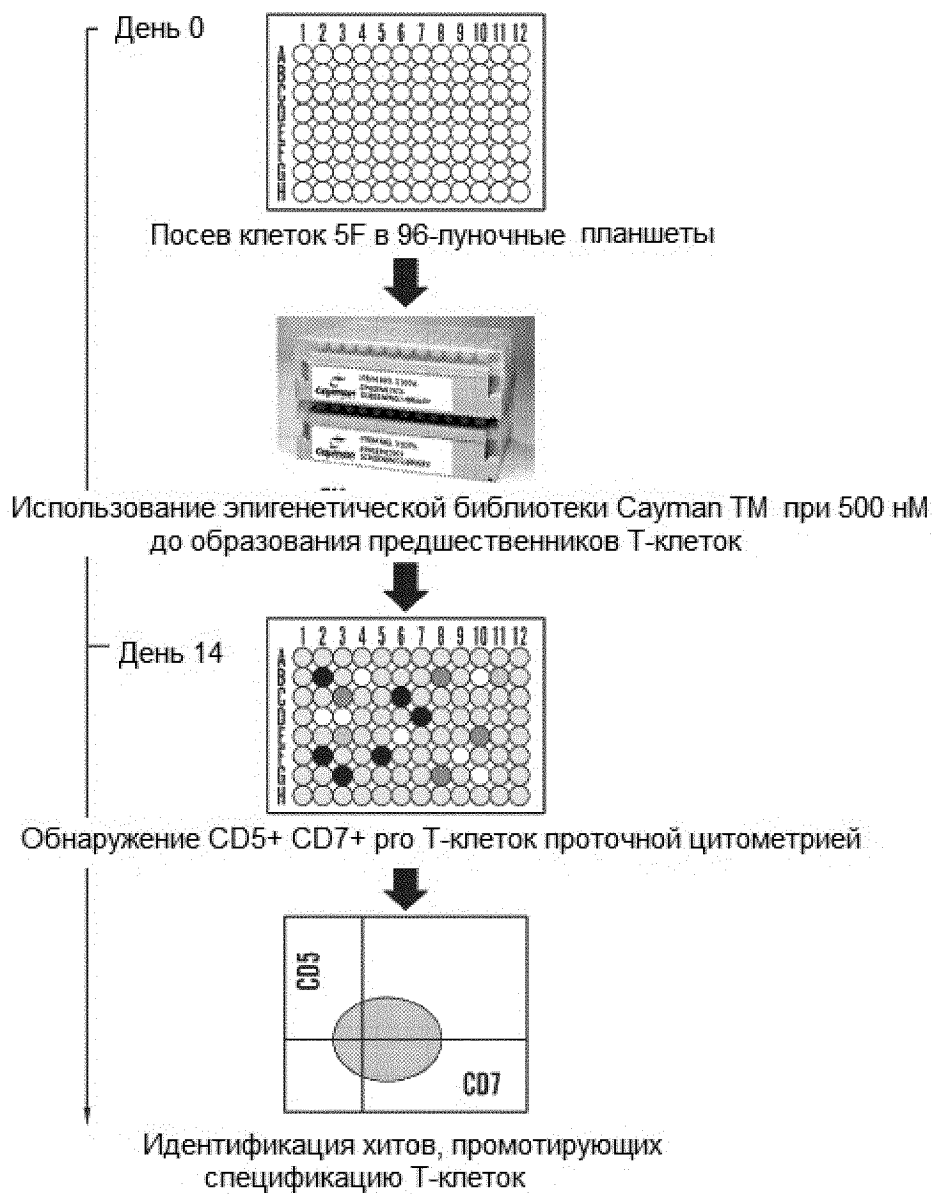
Фиг. 5В



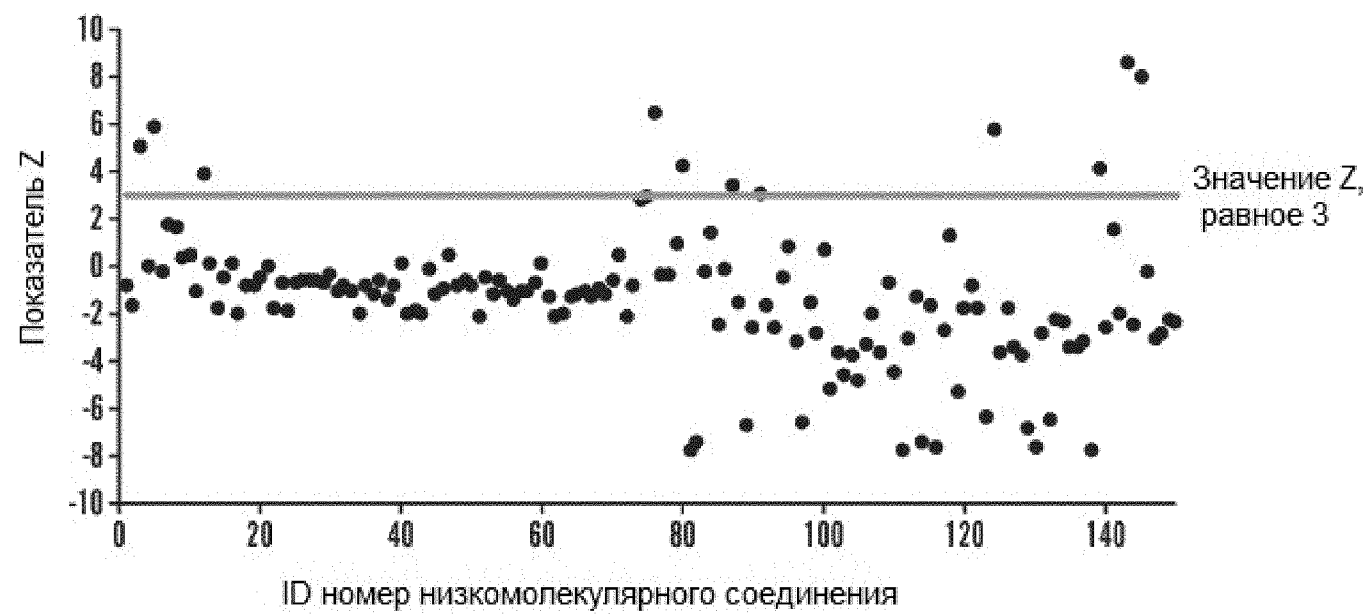
Фиг. 5С



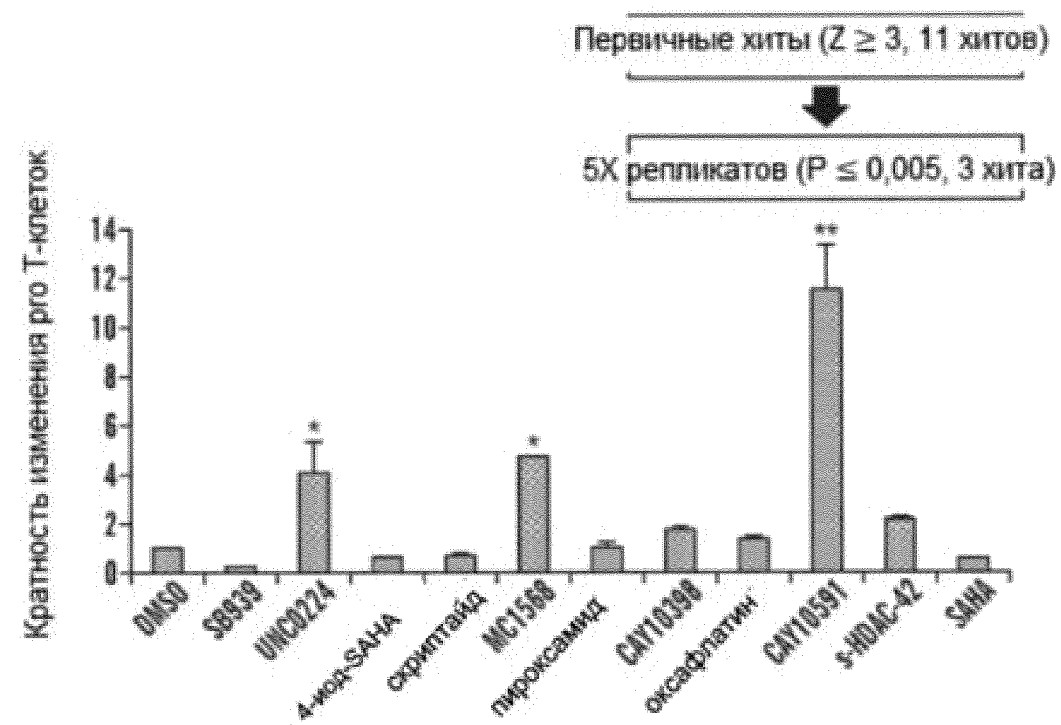
Фиг. 5D



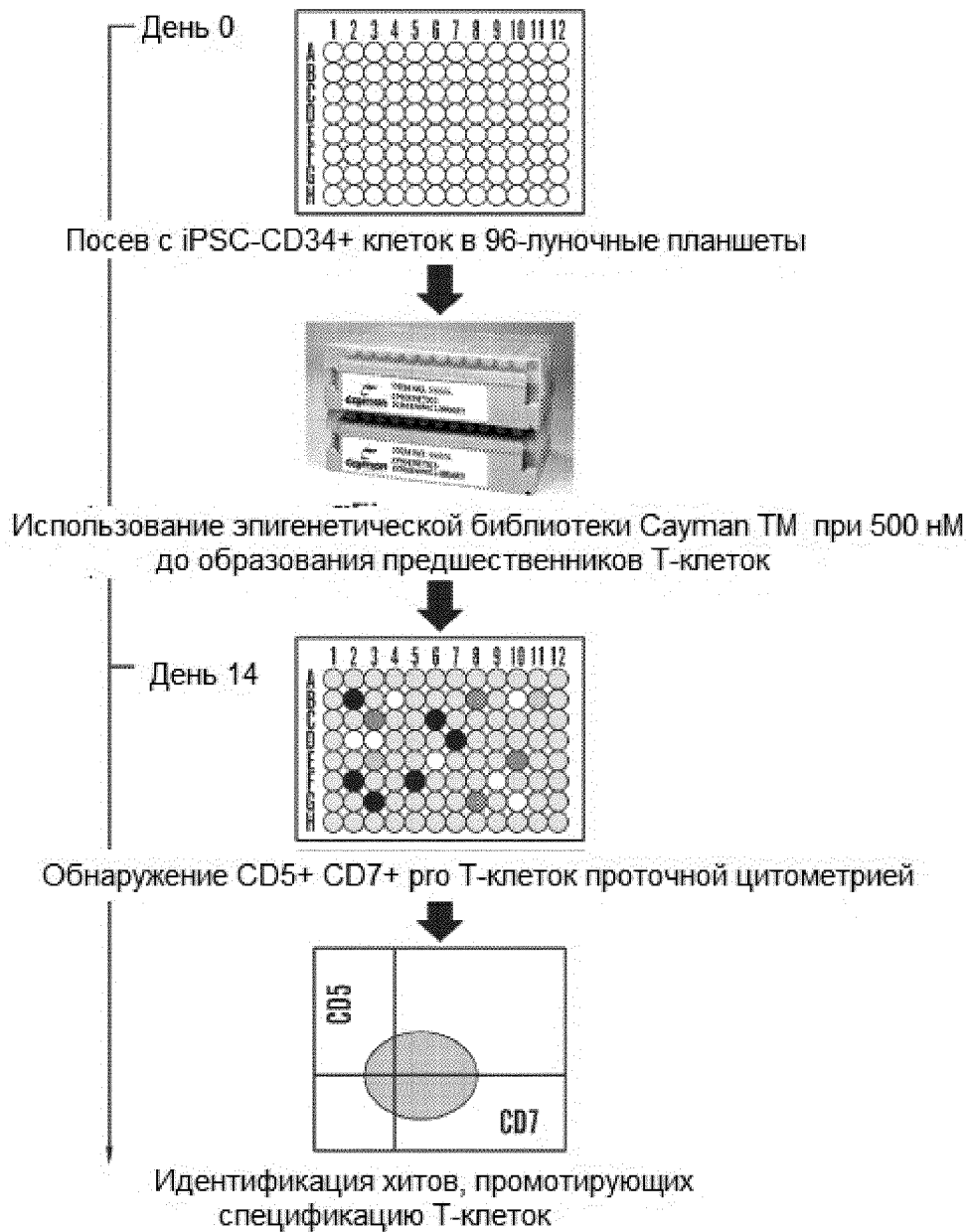
Фиг. 6



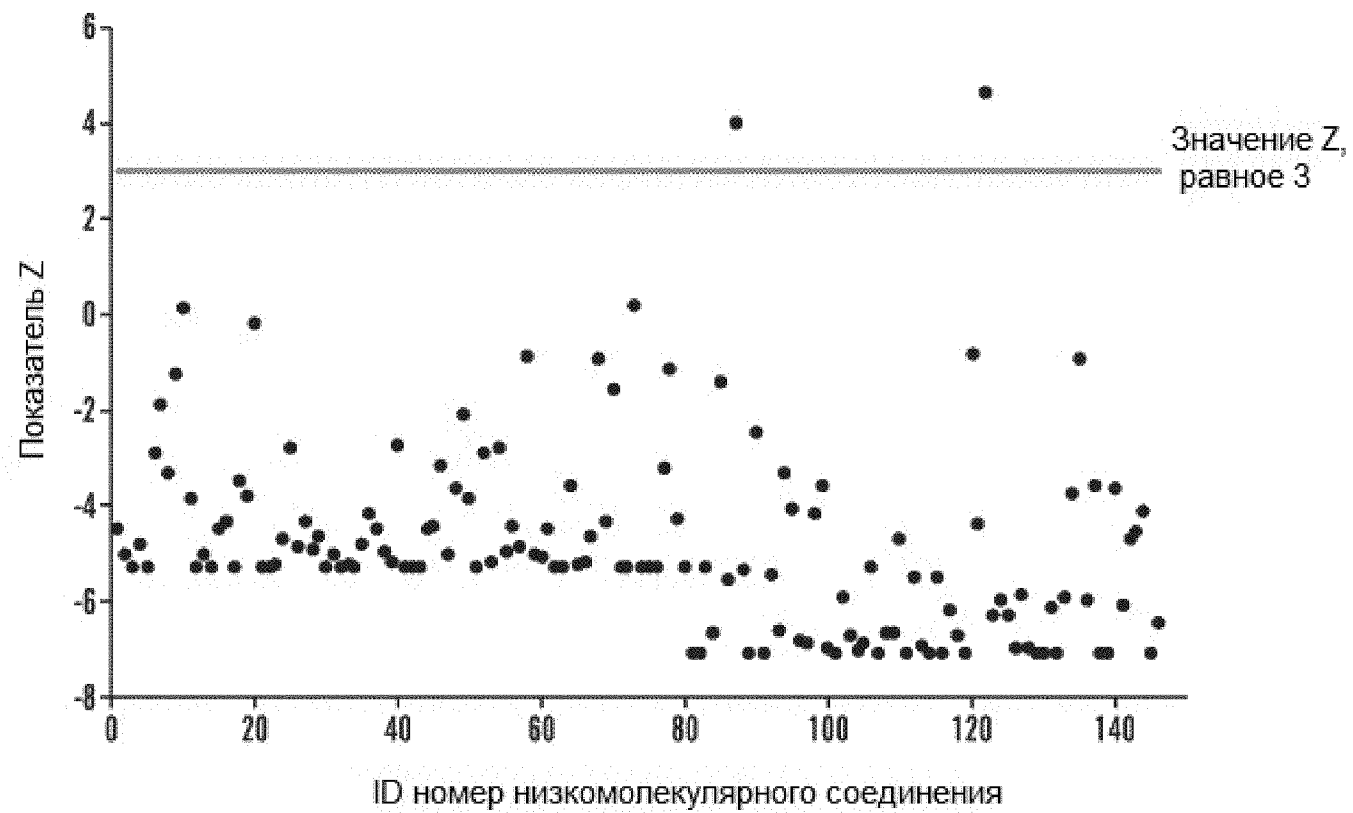
Фиг. 7



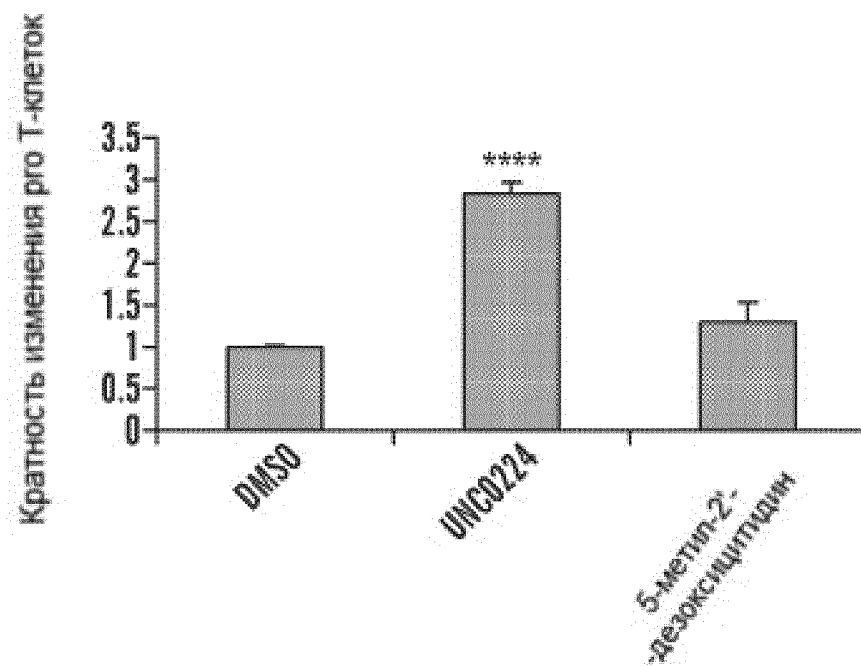
Фиг. 8



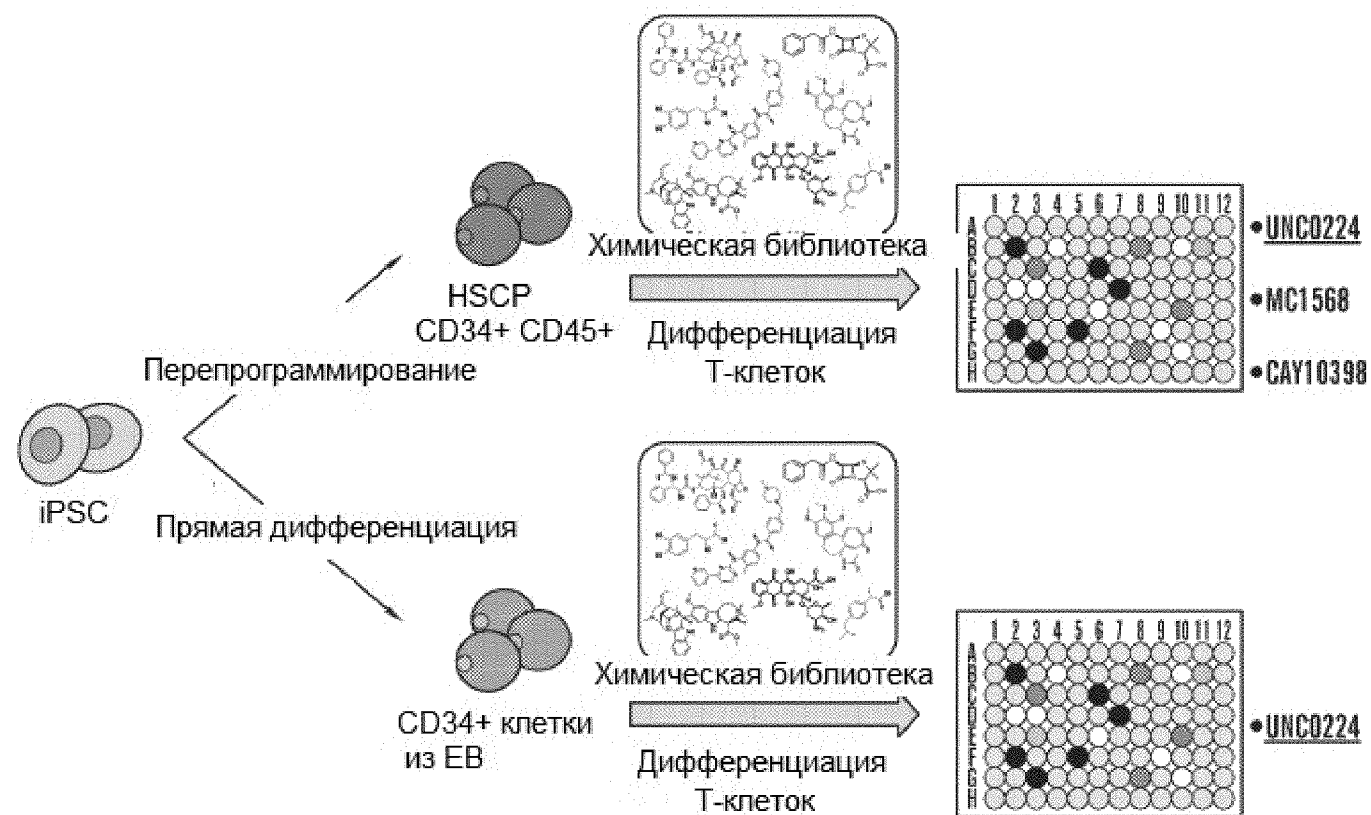
Фиг. 9



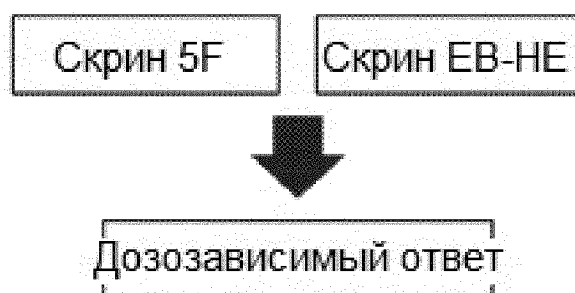
Фиг. 10А



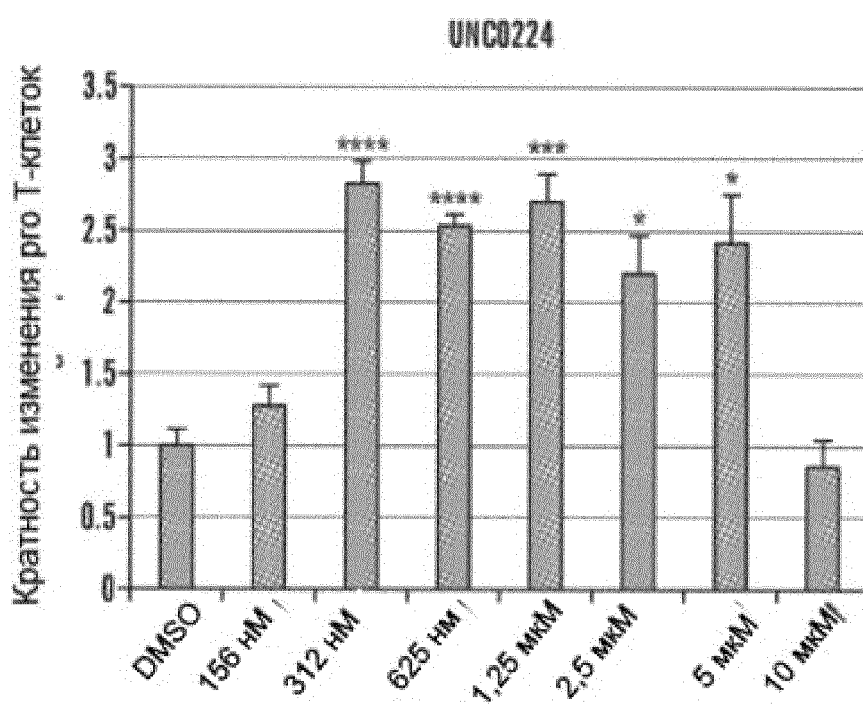
Фиг. 10В



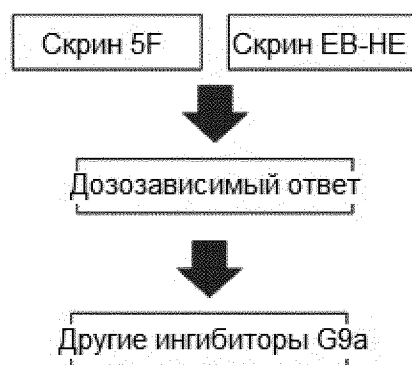
Фиг. 11



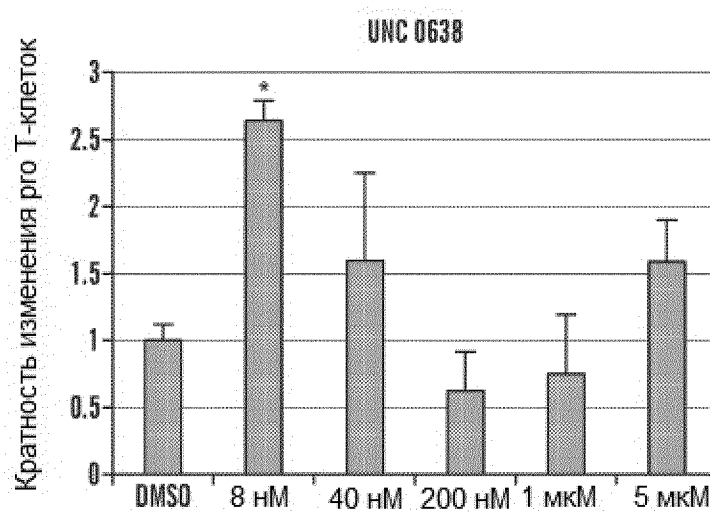
Фиг. 12А



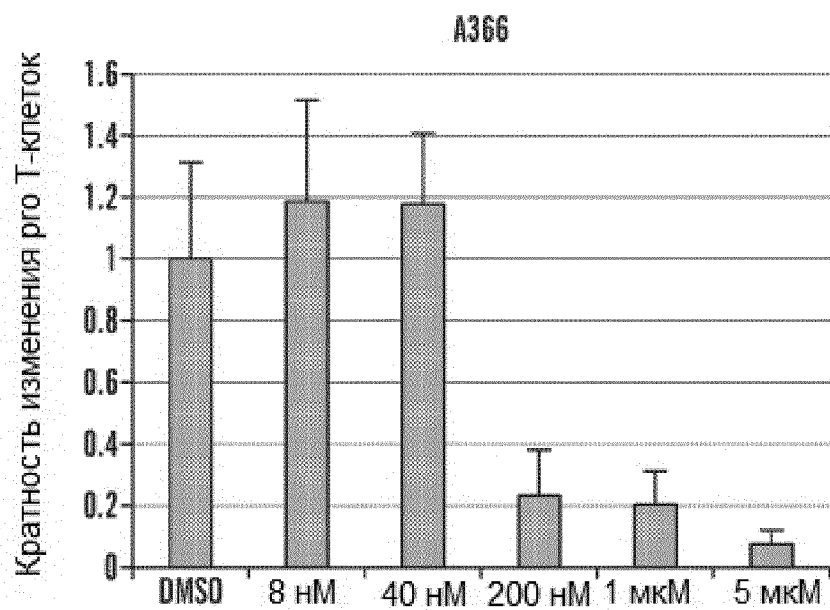
Фиг. 12В



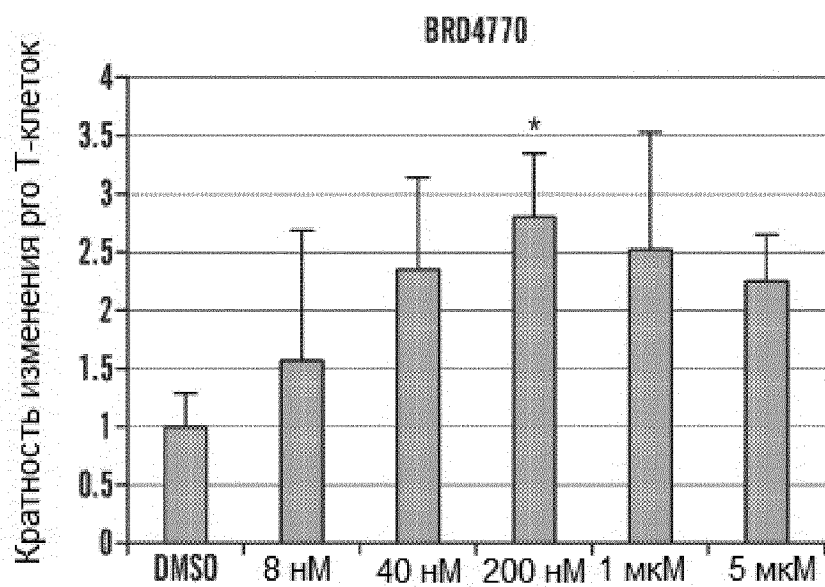
Фиг. 13А



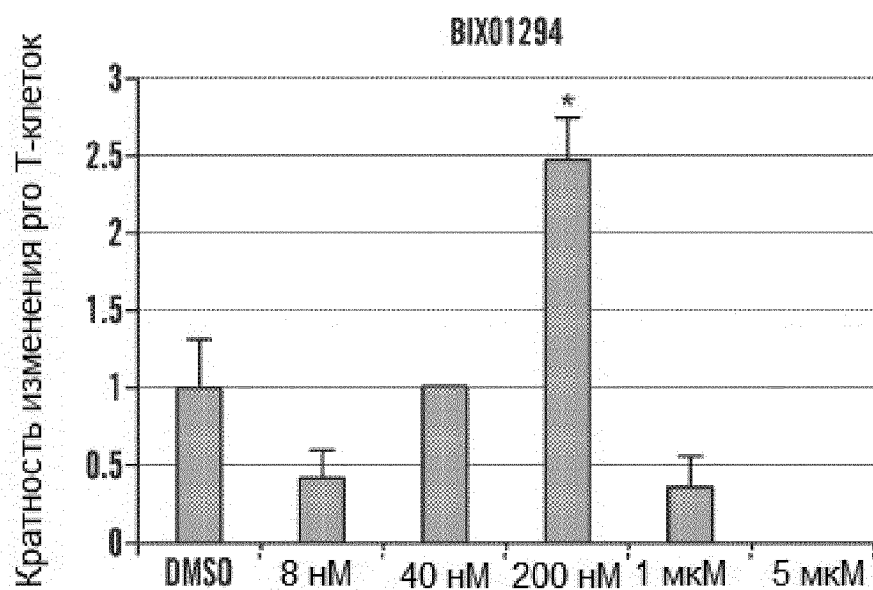
Фиг. 13В



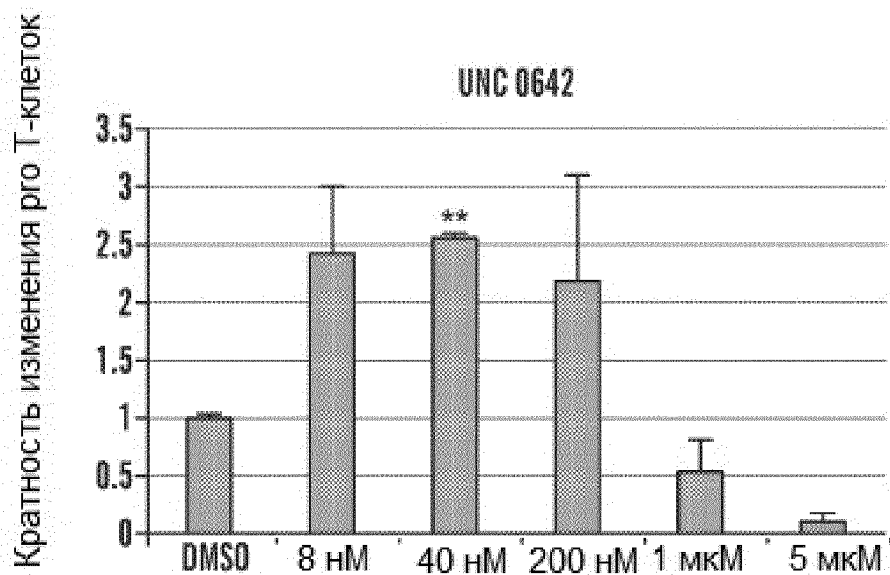
Фиг. 13С



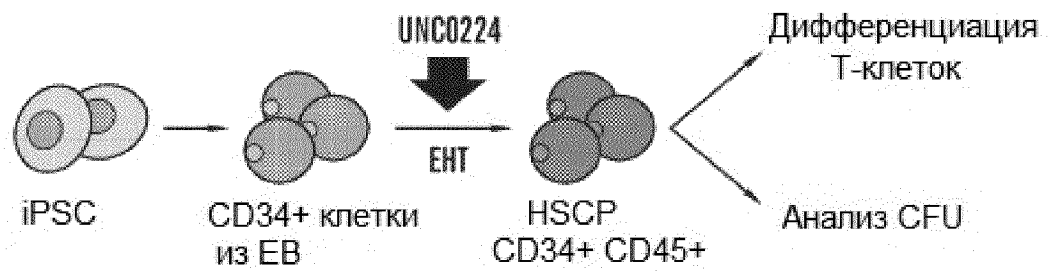
Фиг. 13D



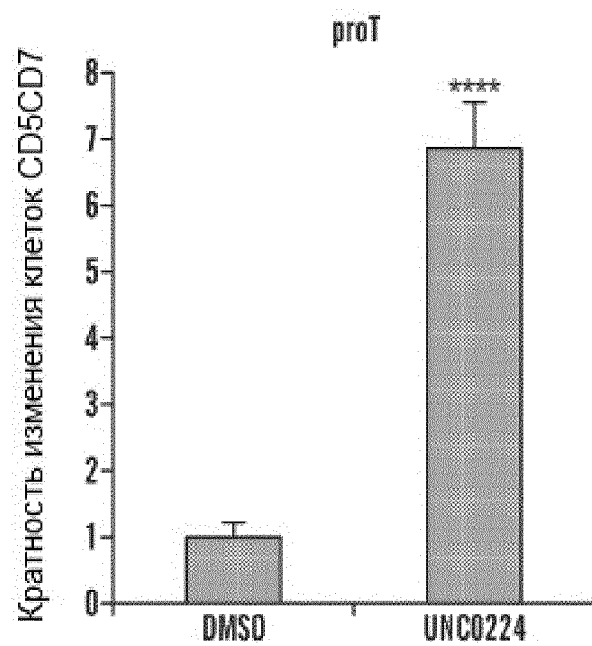
Фиг. 13Е



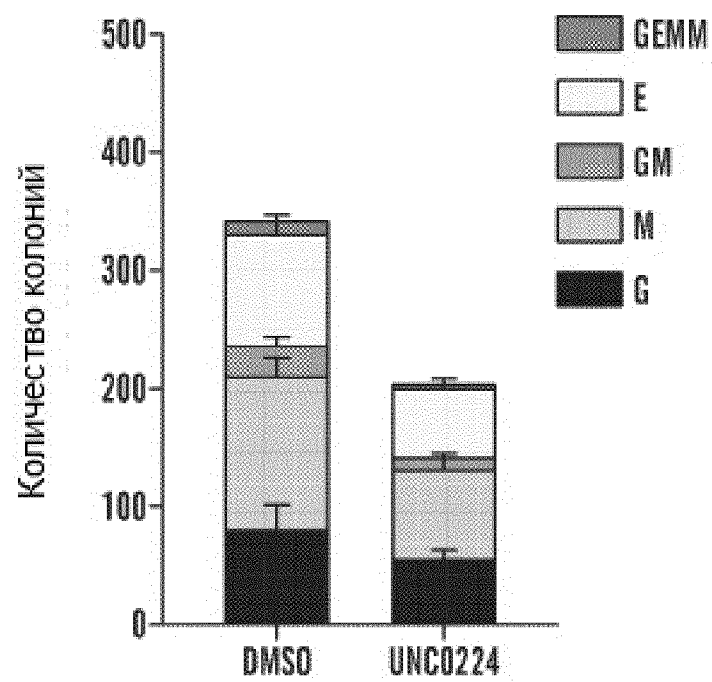
Фиг. 13F



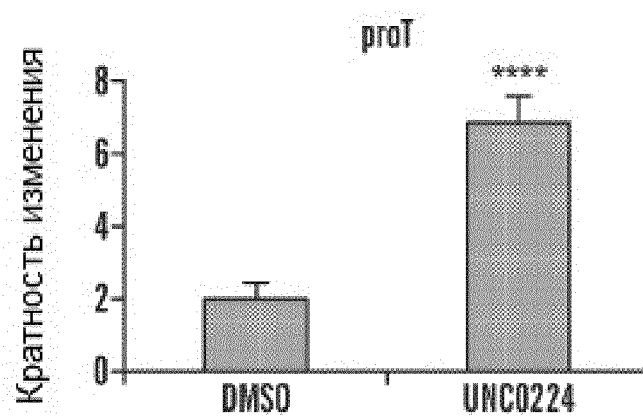
Фиг. 14А



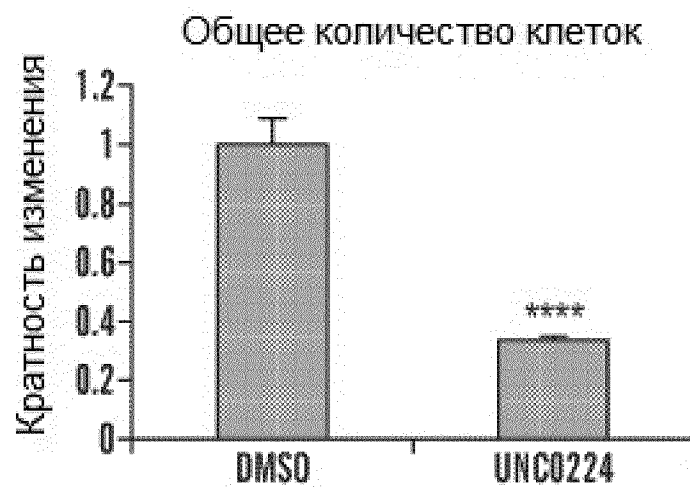
Фиг. 14В



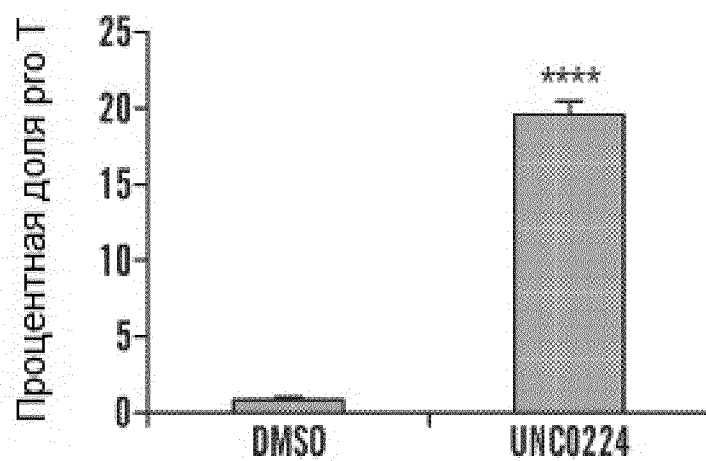
Фиг. 14С



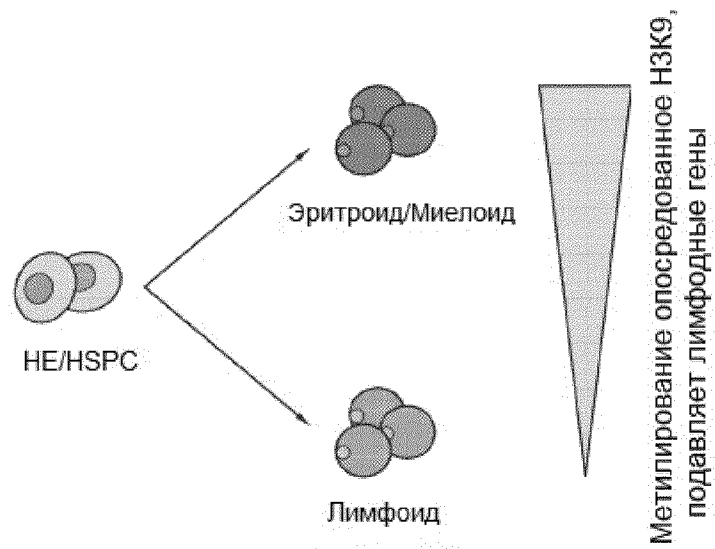
Фиг. 15А



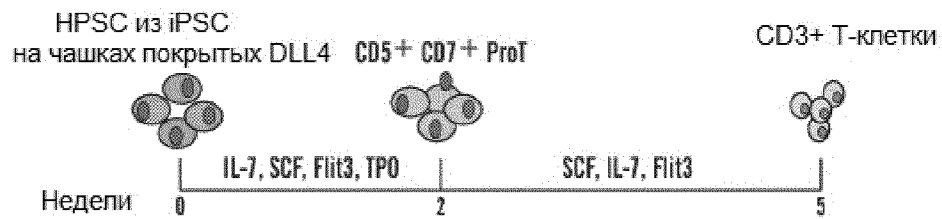
Фиг. 15В



Фиг. 15С



Фиг. 16



Фиг. 17