(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292459 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.14

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. ***C12N 5/0789*** (2010.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК-КИЛЛЕРОВ ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

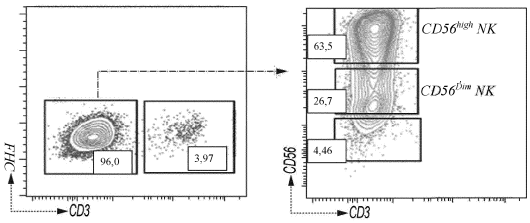
(31) **62/983,511**
(32) **2020.02.28**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/019917**
(87) **WO 2021/174004 2021.09.02**

(71) Заявитель:
ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)

(72) Изобретатель:
Цянь Юй, Чан Хуэй-Синь, Ши Си, Ху Цзяньсинь, Цао Лань (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении, помимо прочего, предложен способ эффективного получения естественных клеток-киллеров из индуцированных плюрипотентных клеток. Способ включает стадии (I) культивирования плюрипотентных стволовых клеток в культуральной среде для получения CD56+/CD3- иммунных клеток.



202292459 A1

202292459 A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК-КИЛЛЕРОВ ИЗ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] В данной заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке США с серийным номером 62/983 511, поданной 28 февраля 2021 г., раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Естественные клетки-киллеры (NK-клетки) представляют собой цитотоксические лимфоциты иммунной системы. NK-клетки обладают цитотоксичной активностью в отношении раковых, инфицированных патогенами и иным образом поврежденных клеток. NK-клетки представляют собой врожденные лимфоидные клетки (ILC), а именно большие гранулярные цитотоксические лимфоциты, которые обеспечивают соединение врожденного и адаптивного звеньев иммунного ответа. Они составляют 10-15% циркулирующих лимфоцитов в периферической крови. NK-клетки также демонстрируют самый высокий уровень цитотоксической активности в иммунной системе. Таким образом, измененная функциональность или количество NK-клеток оказывает влияние на функционирование иммунной системы против инфекции и рака.

[0003] NK-клетки не обладают специфическими антигенными рецепторами на клеточной поверхности. Поэтому NK-клетки могут уничтожать раковые и инфицированные патогенами клетки без предварительной сенсибилизации, что делает их частью врожденного иммунного ответа. Они также играют определенную роль в иммунном надзоре за опухолями, оказывая непосредственное влияние на адаптивный иммунный ответ. Эти и другие особенности делают NK-клетки особенно привлекательным типом клеток для применения в адоптивной клеточной терапии.

[0004] Для получения NK-клеток из клеток-предшественников были описаны различные протоколы. Однако ранее описанные протоколы являются трудозатратными и требуют выполнения множества трудоемких стадий, включая стадии выделения клеток, что в свою очередь повышает время изготовления/производства и увеличивает денежные затраты на получение NK-клеток.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящей заявке представлены, в частности, улучшенные способы получения CD56+/CD3- иммунных клеток (т.е. NK-клеток или NK-подобных клеток). Данная заявка основана, по меньшей мере частично, на удивительном открытии эффективного и надежного получения CD56+/CD3- иммунных клеток из основной популяции клеток, полученных из плюрипотентных стволовых клеток (например, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC)) без необходимости проведения стадии выделения клеток. До настоящей заявки способы индуцирования NK-клеток часто требовали выделения определенных типов клеток на основе известных клеточных линий для получения NK-клеток. Как описано в данном документе, в настоящей заявке неожиданно было продемонстрировано, что NK-клетки могут быть успешно получены из основной популяции клеток без необходимости выделения каких-либо

типов клеток на основе линий. Таким образом, данный способ имеет многочисленные преимущества перед существующими способами получения NK-клеток, включая, например, возможность масштабирования и получения больших количеств NK-клеток с минимальными затратами средств и времени. Таким образом, данное изобретение представляет собой значительный прорыв в области клеточной терапии.

[0006] Полученные из iPSC CD56+/CD3- клетки (также упоминаемые в данном документе как «iNK-клетки»), полученные описанными в данном документе способами, являются функциональными и могут быть в дальнейшем генетически модифицированы, например, путем введения CAR для нацеливания на определенные популяции клеток.

[0007] В некоторых аспектах предложен способ получения NK-клеток из плюрипотентных стволовых клеток, включающий: (A) обеспечение основной популяции клеток, включающей гемопоэтические клетки-предшественники (HPC) (основная масса HP-клеток), полученные из плюрипотентных стволовых клеток, (B) культивирование основной массы HP-клеток в одной или более культуральных средах для получения CD56+/CD3- клеток, при этом способ не включает стадию выделения клеток.

[0008] В некоторых вариантах осуществления способ не включает стадию выделения на стадиях (A) и (B).

[0009] В некоторых вариантах осуществления основная масса HP-клеток на стадии (A) включает CD34+ клетки.

[0010] В некоторых вариантах осуществления 20% или более клеток в основной массе HP-клеток представляют собой CD34+ клетки.

[0011] В некоторых вариантах осуществления от 20% до 90% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки. Например, в некоторых вариантах осуществления около 30% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки. В некоторых вариантах осуществления около 40% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки. В некоторых вариантах осуществления около 50% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки. В некоторых вариантах осуществления около 60% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки. В некоторых вариантах осуществления около 70% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки. В некоторых вариантах осуществления около 80% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки. В некоторых вариантах осуществления около 90% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки. В некоторых вариантах осуществления более чем 70% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки.

[0012] В некоторых вариантах осуществления стадия (B) включает (i) культивирование основной массы HP-клеток в среде для индукции CD4/CD8 для получения промежуточной гетерогенной популяции клеток, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8- и CD4+/CD8+ клетки; и (ii) культивирование промежуточной гетерогенной популяции клеток в среде для индукции NK для получения CD56+/CD3- клеток.

[0013] В некоторых вариантах осуществления стадия (A) включает культивирование плюрипотентных стволовых клеток в среде для индукции HPC для получения основной массы HP-клеток.

[0014] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC).

[0015] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит по меньшей мере одно соединение или любую комбинацию соединений, выбранных из костного морфогенетического белка-4 (BMP4), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF), аскорбиновой кислоты, лиганда Flt3 (Flt3L), тромбопоэтина (TPO) и ингибитора TGFβ.

[0016] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит BMP4 в концентрации от 5 нг/мл до 500 нг/мл.

[0017] В некоторых вариантах осуществления BMP4 находится в концентрации 50 нг/мл.

[0018] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит VEGF в концентрации от 5 нг/мл до 500 нг/мл.

[0019] В некоторых вариантах осуществления VEGF находится в концентрации 50 нг/мл.

[0020] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит bFGF в концентрации от 5 нг/мл до 500 нг/мл.

[0021] В некоторых вариантах осуществления bFGF находится в концентрации 50 нг/мл.

[0022] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит аскорбиновую кислоту в концентрации от 5 мкг/мд до 500 мкг/мл.

[0023] В некоторых вариантах осуществления аскорбиновая кислота находится в концентрации 50 мкг/мл.

[0024] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит Flt3L в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

[0025] В некоторых вариантах осуществления Flt3L находится в концентрации 50 нг/мл.

[0026] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит TPO в концентрации от 1 нг/мл до 200 нг/мл.

[0027] В некоторых вариантах осуществления TPO находится в концентрации 100 нг/мл.

[0028] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит по меньшей мере одно соединение или любую комбинацию соединений, выбранных из группы, состоящей из аскорбиновой кислоты, фактора стволовых клеток (SCF), IL-7, Flt3L, тромбопоэтина (TPO), ингибитора p38 и SDF-1. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит аскорбиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит SCF. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит IL-7. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит Flt3L. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит TPO. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит ингибитор p38. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит SDF-1. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит ингибитор p38 и SDF-1.

[0029] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/ CD8 содержит аскорбиновую кислоту в концентрации от 5 мкг/мл до 500 мкг/мл.

[0030] В некоторых вариантах осуществления аскорбиновая кислота находится в концентрации 50 мкг/мл.

[0031] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/ CD8 содержит SCF в концентрации от 5 нг/мл до 100 нг/мл.

[0032] В некоторых вариантах осуществления SCF находится в концентрации 50 нг/мл.

[0033] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/ CD8 содержит IL-7 в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

[0034] В некоторых вариантах осуществления IL-7 находится в концентрации 50 нг/мл.

[0035] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/ CD8 содержит Flt3L в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

[0036] В некоторых вариантах осуществления Flt3L находится в концентрации 50 нг/мл Flt3L.

[0037] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/ CD8 содержит TPO в концентрации от 1 нг/мл до 200 нг/мл.

[0038] В некоторых вариантах осуществления TPO находится в концентрации 100 нг/мл.

[0039] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/ CD8 содержит ингибитор p38 в концентрации от 0,5 мкМ до 100 мкМ.

[0040] В некоторых вариантах осуществления ингибитор p38 представляет собой SB203580. В некоторых вариантах осуществления ингибитор p38 представляет собой BIRB 796. В некоторых вариантах осуществления ингибитор p38 представляет собой VX-702. В некоторых вариантах осуществления ингибитор p38 представляет собой SB239063. В некоторых вариантах осуществления ингибитор p38 представляет собой SB202190. В некоторых вариантах осуществления ингибитор p38 представляет собой BMS 582949.

[0041] В некоторых вариантах осуществления SB203580 находится в концентрации 15 мкМ.

[0042] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/ CD8 содержит ингибитор SDF1 в концентрации от 10 нг/мл до 100 нг/мл.

[0043] В некоторых вариантах осуществления ингибитор SDF-1 находится в концентрации 30 нМ.

[0044] В некоторых вариантах осуществления ингибитор SDF-1 находится в концентрации 30 нМ, а ингибитор p38, например, SB203580, находится в концентрации 15 мкМ.

[0045] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из активатора CD3, IL-2 и IL7. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK содержит активатор CD3. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK содержит IL-7.

[0046] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK содержит IL-2 в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

[0047] В некоторых вариантах осуществления IL-2 находится в концентрации 10 нг/мл.

[0048] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK содержит IL-7 в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

[0049] В некоторых вариантах осуществления IL-7 находится в концентрации 10 нг/мл.

[0050] В некоторых вариантах осуществления каждая из стадий культивирования проводится при уровне кислорода около 5%.

[0051] В некоторых вариантах осуществления каждая из стадий культивирования проводится при уровне кислорода более 14%.

[0052] В некоторых вариантах осуществления каждая из стадий культивирования проводится при атмосферном уровне кислорода.

[0053] В некоторых вариантах осуществления каждая из стадий культивирования проводится при уровне кислорода менее 5%.

[0054] В некоторых вариантах осуществления культивирование плюрипотентных стволовых клеток в основной клеточной среде для получения основной массы HP-клеток длится более 10 дней.

[0055] В некоторых вариантах осуществления культивирование плюрипотентных стволовых клеток в основной клеточной среде для получения основной массы HP-клеток длится от 11 до 15 дней.

[0056] В некоторых вариантах осуществления культивирование плюрипотентных стволовых клеток в основной клеточной среде для получения основной массы HP-клеток длится 14 дней.

[0057] В некоторых вариантах осуществления iPSC получают из мононуклеарных клеток периферической крови.

[0058] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения, например, без дальнейшей стадии сортировки/выделения/очистки CD56+/CD3-клеток. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 55% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3-клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 60% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 65% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 70% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 75% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 80% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 85% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 90% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии

обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 95% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 97% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения стадии обогащения.

[0059] В некоторых вариантах осуществления менее чем около 25%, 20%, 15%, 10% или 5% полученных клеток являются CD3+ клетками.

[0060] В некоторых вариантах осуществления фенотип полученных клеток может быть определен с помощью различных способов, известных в данной области техники. Например, фенотип полученных клеток можно определить с помощью проточной цитометрии или секвенирование РНК одиночных клеток (scRNAseq).

[0061] В некоторых вариантах осуществления процент полученных клеток определяется с помощью проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления процент полученных клеток определяется с помощью scRNAseq.

[0062] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию выделения CD56+/CD3- клеток.

[0063] В некоторых вариантах осуществления изобретения CD56+/CD3- клетки выделяют с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) или магнитной сортировки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки выделяют с помощью FACS. В некоторых вариантах осуществления клетки выделяют с помощью магнитной сортировки (MACS).

[0064] В некоторых вариантах осуществления CD56+/CD3- иммунные клетки представляют собой NK-клетки.

[0065] В некоторых вариантах осуществления CD56+/CD3- клетки подвергаются генетической модификации для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0066] В некоторых вариантах осуществления выделенные CD56+/CD3- клетки подвергаются генетической модификации для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0067] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD19.

[0068] В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно генетически модифицируют для экспрессии комплекса IL-15Rα/IL-15.

[0069] В некоторых аспектах предложен способ получения CD56+/CD3- иммунных клеток, происходящих из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), включающий следующие стадии: (1) культивирование iPSC в среде для индукции HPC, содержащей по меньшей мере одно соединение, выбранное из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактор роста фибробластов (bFGF), и аскорбиновую кислоту для получения гетерогенной популяции клеток, включающей гемопоэтические клетки-предшественники (HPC) (основная масса HP клеток); (2) культивирование основной массы HP-клеток, полученной на стадии (1), в среде для индукции CD4/CD8, содержащей одно или более из аскорбиновой кислоты, ингибитора p38 и SDF-1 для получения промежуточной гетерогенной популяции клеток; и (3) культивирование промежуточной гетерогенной популяции клеток из стадии (2) в среде для индукции NK,

содержащей по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из активатора CD3, IL-2 и IL-7.

[0070] В некоторых аспектах предложена популяция NK-клеток, полученная с помощью описанного в данном документе способа.

[0071] В некоторых аспектах предложена популяция несортированных клеток, популяция, включающая полученные из плюрипотентных стволовых клеток CD56+/CD3- клетки в соотношении не менее 60% от общего количества полученных из плюрипотентных стволовых клеток CD56+ иммунных клеток.

[0072] В некоторых вариантах осуществления менее 25% клеток представляют собой CD3+ клетки.

[0073] В некоторых вариантах осуществления менее 5% клеток представляют собой моноциты.

[0074] В некоторых вариантах осуществления менее 5% клеток представляют собой B-клетки.

[0075] В некоторых аспектах предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение субъекту NK-клеток, описанных в данном документе.

[0076] В некоторых вариантах осуществления субъект болен раком.

[0077] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз или лимфому.

[0078] В некоторых аспектах предложен способ получения CD56+/CD3- иммунных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, причем указанный способ включает стадию (I) культивирования плюрипотентных стволовых клеток в одной или более культуральных средах для получения CD56+/CD3- иммунных клеток.

[0079] В некоторых вариантах осуществления стадия (I) включает: (A) культивирование плюрипотентной стволовой клетки в культуральной среде с получением гемопоэтических клеток-предшественников (HPC) (основная масса HP клеток); и (B) культивирование клеток, полученных на стадии (A), в культуральной среде для получения CD56+/CD3- иммунных клеток.

[0080] В некоторых вариантах осуществления стадия (B) включает: (a) культивирование клеток, полученных на стадии (A), в культуральной среде для получения популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки; и (b) культивирование клеток, полученных на стадии (a), в культуральной среде с получением CD56+/CD3- иммунных клеток.

[0081] В некоторых вариантах осуществления любая из предыдущих стадий не включает выполнение стадии выделения популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки.

[0082] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC).

[0083] В некоторых аспектах предложен способ получения CD56+/CD3- иммунных клеток, причем указанный способ включает стадию (II) культивирования клеток, содержащих гемопоэтические клетки-предшественники (HPC) (основная масса HP-клеток), в культуральной среде для получения CD56+/CD3- иммунных клеток.

[0084] В некоторых вариантах осуществления стадия (II) включает: (X) культивирование клеток, содержащих гемопоэтические клетки-предшественники (HPC), в культуральной среде для получения дважды

положительных по CD4/CD8 клеток; и (Y) культивирование клеток, полученных на стадии (X), в культуральной среде для получения CD56+/CD3- иммунных клеток.

[0085] В некоторых вариантах осуществления стадия (II) не включает проведение стадии выделения CD4/CD8 дважды положительных клеток.

[0086] В некоторых вариантах осуществления стадия (A) включает культуральную среду, содержащую по меньшей мере одно соединение, выбранное из костного морфогенетического белка-4 (BMP4), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF), аскорбиновой кислоты, лиганда Flt3 (Flt3L), тромбопоэтина (TPO) и ингибитора TGFβ.

[0087] В некоторых вариантах осуществления стадия (a) или стадия (X) включает культуральную среду, содержащую по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из аскорбиновой кислоты, фактора стволовых клеток (SCF), IL-7, Flt3L, тромбопоэтина (TPO), ингибитора p38 и SDF-1.

[0088] В некоторых вариантах осуществления стадия (b) или стадия (Y) включает культуральную среду, содержащую по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из активатора CD3, IL-2 и IL7.

[0089] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает культивирование клеток, полученных после стадии (b) или стадии (Y), в культуральной среде, содержащей IL-7 и/или IL-15.

[0090] В некоторых вариантах осуществления культивирование проводится при уровне кислорода около 5%.

В некоторых вариантах осуществления стадия (A) длится около 10 дней. В другом варианте осуществления стадия (A) длится около 10-18 дней.

[0091] В некоторых вариантах осуществления iPSC получают из мононуклеарных клеток периферической крови.

[0092] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90% полученных клеток представляют собой CD56+/CD3-клетки.

[0093] В некоторых вариантах осуществления менее 25% полученных клеток представляют собой CD3+ клетки.

[0094] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию выделения CD56+/CD3- клеток.

[0095] В некоторых вариантах осуществления изобретения CD56+/CD3- клетки выделяют с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS).

[0096] В некоторых вариантах осуществления CD56+ иммунные клетки являются CD56+/CD3-.

[0097] В некоторых вариантах осуществления любые плюрипотентные, мультипотентные или полученные от пациента HPC могут быть использованы в описанных в данном документе способах. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой взрослую стволовую клетку. Различные взрослые стволовые клетки известны в данной области техники и включают, например, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки, полученные из пуповиной

крови, стволовые клетки костного мозга, жировые стволовые клетки и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC). Таким образом, NK-клетки, полученные в соответствии с описанными в данном документе способами, могут быть получены из любой плюрипотентной, мультипотентной или полученной от пациента HPC, например, первичной HPC, полученной непосредственно от донора.

[0098] В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для получения NK-клеток, описанных в данном документе, подвергаются генетической модификации на любой стадии клеточной дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для получения описанных в данном документе NK-клеток, подвергаются генетической модификации на плюрипотентной, мультипотентной или унипотентной стадии. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для получения описанных в данном документе NK-клеток, подвергаются генетической модификации на плюрипотентной стадии. Например, клетка может подвергаться генетической модификации на стадии эмбриональной стволовой клетки или на стадии стволовой клетки iPSC. В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для получения описанных в данном документе NK-клеток, подвергаются генетической модификации на мультипотентной стадии. Например, клетка может подвергаться генетической модификации на стадии HSC.

[0099] В некоторых вариантах осуществления клетки подвергаются генетической модификации для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0100] В некоторых вариантах осуществления выделенные CD56+/CD3- клетки подвергаются генетической модификации для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

[0101] В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой CD19.

[0102] В некоторых вариантах осуществления клетки дополнительно генетически модифицируют для экспрессии комплекса IL-15Rα/IL-15.

[0103] В некоторых аспектах предложена популяция несортированных клеток, популяция клеток, включающая полученные из плюрипотентных стволовых клеток CD56+/CD3- клетки в соотношении не менее 60% от общего количества полученных из плюрипотентных стволовых клеток CD56+ иммунных клеток.

[0104] В некоторых вариантах осуществления менее 25% клеток представляют собой CD3+ клетки.

[0105] В некоторых вариантах осуществления менее 5% клеток представляют собой моноциты.

[0106] В некоторых вариантах осуществления менее 5% клеток представляют собой B-клетки.

[0107] В некоторых аспектах предложен способ лечения субъекта, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение субъекту CD56+/CD3- иммунных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток по любому из предшествующих пунктов.

[0108] В некоторых вариантах осуществления субъект болен раком.

[0109] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой лейкоз или лимфому.

[0110] В способах, описанных в данном документе, используются различные культуральные среды, включая, например, среды для индукции HPC, среды для индукции CD4/CD8 и среды для индукции NK.

[0111] В некоторых аспектах индуцированные плюрипотентные клетки (iPSC) культивируют в среде для индукции HPC в течение определенного периода времени для создания популяции клеток, включающей гемопоэтические клетки-предшественники, эта популяция клеток упоминается в данном документе как основная масса HP-клеток. В некоторых вариантах осуществления этот период времени составляет от около 10 до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления этот период времени составляет около 13 дней. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит одно или более из BMP4, VEGF, bFGF, аскорбиновой кислоты, ингибитора TGFβ, фактора стволовых клеток (SCF), тромбопоэтина TPO и Flt3L. В некоторых вариантах осуществления iPSC культивируют с 1-го дня примерно до 10-го дня в среде для индукции HPC, содержащей VEGF, bFGF, аскорбиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления VEGF находится в концентрации около 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления bFGF находится в концентрации около 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления аскорбиновая кислота находится в концентрации около 50 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления iPSC культивируют с 1-го дня примерно до 3-го дня в среде для индукции HPC, содержащей BMP4. В некоторых вариантах осуществления BMP4 находится в концентрации около 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления iPSC культивируют примерно со 2-го дня до примерно 3-го дня с ингибитором TGFβ, таким как SB431542, в концентрации около 6 мкМ. В некоторых вариантах осуществления в период между 7-м и 13-м днями культивирования к культуре добавляют один или более факторов стволовых клеток (SCF), тромбопоэтин TPO и Flt3L. В некоторых вариантах осуществления SCF добавляют в концентрации около 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления TPO добавляют в концентрации около 30 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления Flt3L добавляют в концентрации около 10 нг/мл.

[0112] В некоторых аспектах основную популяцию HP-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8 в течение определенного периода времени для получения популяции клеток, включающей промежуточную гетерогенную популяцию клеток, включающую CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8- клетки и CD4+/CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления основную популяцию HP-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8 в течение 19-22 дней. В некоторых вариантах осуществления основную популяцию HP-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8 в течение около 21 дня. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит одно или несколько из аскорбиновой кислоты, SCF, TPO, Flt3L, IL7, ингибитора p38MAPKi, такого как SB203580, SDF1a. В некоторых вариантах осуществления аскорбиновая кислота находится в концентрации около 50 мкг. В некоторых вариантах осуществления SCF находится в концентрации 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления TPO находится в концентрации около 100 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления Flt3L находится в концентрации около 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления IL7 находится в концентрации около 50 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления SB203580 находится в концентрации около 15 мкМ. В некоторых вариантах осуществления SDF1a находится в концентрации около 30 нМ. В некоторых вариантах осуществления основную массу HP-клеток культивируют на чашке для культивирования, покрытой hDLL4/RetroNectin.

[0113] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из аскорбиновой кислоты, фактора стволовых клеток (SCF), IL-7, Flt3L, тромбопоэтина (TPO), ингибитора p38 и SDF-1. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит ингибитор p38. В некоторых вариантах осуществления среда для

индукции CD4/CD8 содержит SDF-1. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит ингибитор p38 и SDF-1.

[0114] В некоторых аспектах гетерогенную популяцию клеток, включающую CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8- и CD4+/CD8+ клетки, культивируют в среде для индукции NK в течение периода времени для получения популяции клеток, включающей CD56+/CD3- NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления гетерогенную популяцию клеток культивируют в течение периода времени, составляющего около 5-9 дней в среде для индукции NK. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток культивируют в течение около 7 дней. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK-клеток содержит одно или более из IL-7, IL-2 и антитела к CD3. В некоторых вариантах осуществления гетерогенную популяцию клеток культивируют в течение около 7 дней в среде для индукции NK-клеток, содержащей IL-7 и IL-2. В некоторых вариантах осуществления IL-7 находится в концентрации около 10 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления IL-2 находится в концентрации около 10 нг/мл. В некоторых вариантах осуществления гетерогенную популяцию культивируют в среде для индукции NK-клеток, содержащей антитело к CD3, в течение около 3 дней. В некоторых вариантах осуществления данный способ позволяет получить более 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% CD56+/CD3- клеток. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления данный способ позволяет получить более 50% CD56+/CD3- клеток. В некоторых вариантах осуществления данный способ позволяет получить более 60% CD56+/CD3- клеток. В некоторых вариантах осуществления данный способ позволяет получить более 70% CD56+/CD3- клеток. В некоторых вариантах осуществления данный способ позволяет получить более 80% CD56+/CD3- клеток. В некоторых вариантах осуществления данный способ позволяет получить более 90% CD56+/CD3- клеток. В некоторых вариантах осуществления данный способ позволяет получить более 95% CD56+/CD3- клеток.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0115] **На ФИГ. 1** представлена серия графиков проточной цитометрии, показывающих результаты анализа методом проточной цитометрии основной популяции NK-клеток, полученной с использованием описанных в данном документе способов. Вкратце, iPS-клетки культивировали, как описано в данном документе, без промежуточной стадии выделения. Графики проточной цитометрии показывают присутствие популяции CD3-отрицательных клеток, которые являются $CD56^{high}$ клетками (приблизительно 63,5% от основной популяции NK-клеток) и популяции CD3-отрицательных клеток, которые являются $CD56^{dim}$ клетками (приблизительно 26,7% от основной популяции NK-клеток). Обе эти популяции представляют собой NK-клетки. Таким образом, общая полученная популяция CD56-положительных, CD3-отрицательных NK-клеток составляет более 90% от общей популяции клеток.

[0116] **На ФИГ. 2** показаны результаты анализа scRNA основной популяции NK-клеток, полученной с помощью описанных в данном документе способов. Вкратце, iPS-клетки культивировали, как описано в данном документе, без промежуточной стадии выделения. Клетки были классифицированы на четыре популяции клеток — моноциты, B-клетки, NK-клетки и T-клетки. Приблизительно 75% клеток в основной популяции NK-клеток были идентифицированы как NK-клетки (CD56+/CD3-клетки), а приблизительно 25% клеток в основной популяции клеток были идентифицированы как T-клетки. T-клетки, описанные в данном документе, могут включать NKT-клетки (CD56+/CD3+ клетки).

[0117] **На ФИГ. 3** изображена серия фотографий, показывающих результаты анализа противоопухолевой активности у мышей линии NSG (NOD/Shi-scid, IL-2R гамма-нулевые), которым вводили клетки Nalm6, экспрессирующие ген люциферазы, а затем вводили клетки iNK-CAR19. Мышей NSG, которым были пересажены клетки Nalm6, обрабатывали (a) ФСБ, (b) клетками iNK-CAR, и наблюдали противоопухолевую эффективность этих видов обработки. Полученные данные показывают, что клетки iNK-CAR снижали пролиферацию клеток Nalm6.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0118] *Введение*. В контексте данного документа термины «вводить», «процесс введения», «введение» используются взаимозаменяемо в контексте доставки терапевтических клеток, например, CD56+/CD3- иммунных клеток, полученных из iPSC или HPC, субъекту способом или путем, который приводит к доставке таких клеток. В данной области техники известны различные способы введения клеток, включая, например, внутривенное, местное, пероральное, внутримышечное, внутрибрюшинное, интратекальное, подкожное или чрескожное введение. Клетки можно вводить с носителем или без него.

[0119] *Адоптивная клеточная терапия*. Термины «адоптивная клеточная терапия» или «адоптивный перенос клеток» или «клеточная терапия», или «ACT», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к переносу клеток, например, популяции CD56+/CD3- клеток, полученных с использованием способов, описанных в данном документе, и вводимых нуждающемуся в этом субъекту или пациенту. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой CD56+/CD3- иммунную клетку, полученную с использованием способа, описанного в данном документе, и дополнительно экспрессирующую CAR.

[0120] *Животное* . В контексте данного документа термин «животное» относится к любому члену царства животных. В некоторых вариантах осуществления термин «животное» относится к человеку на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления термин «животное» относится к отличным от человека животным на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления отличным от человека животным является млекопитающее (*например*, грызун, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, овца, крупный рогатый скот, примат и/или свинья). В некоторых вариантах осуществления животные включают, но не ограничиваются ими, млекопитающих, птиц, рептилий, земноводных, рыб, насекомых и/или червей. В некоторых вариантах осуществления животное может быть трансгенным животным, генетически модифицированным животным и/или клоном.

[0121] *Антиген-специфический нацеливающий домен*: «антиген-специфический нацеливающий домен» обеспечивает CAR способностью связываться с представляющим интерес антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления антиген-специфический нацеливающий домен нацеливается на антиген, представляющий клинический интерес, против которого было бы желательно вызвать эффекторный иммунный ответ, приводящий к уничтожению опухоли. Антиген-специфический нацеливающий домен может представлять собой любой белок или пептид, который обладает способностью специфически распознавать и связываться с биологической молекулой (например, рецептором клеточной поверхности или опухолевым белком или их компонентом). Антиген-специфический нацеливающий домен включает любой встречающийся в природе, синтетический, полусинтетический или рекомбинантный партнер по связыванию для представляющей интерес биологической молекулы.

[0122] Иллюстративные антиген-специфические нацеливающие домены включают, например, антитела или фрагменты, или производные антител, внеклеточные домены рецепторов, лиганды для молекул/рецепторов клеточной поверхности или их рецептор-связывающие домены и белки, связывающиеся с опухолью.

[0123] В некоторых вариантах осуществления антиген-специфический нацеливающий домен представляет собой антитело или получен из него. Полученный из антитела нацеливающий домен может представлять собой фрагмент антитела или продукт генной инженерии одного или более фрагментов антитела, причем этот фрагмент участвует в связывании с антигеном. Примеры включают вариабельную область (Fv), определяющую комплементарность область (CDR), Fab, одноцепочечное антитело (scFv), вариабельную область тяжелой цепи (VH), вариабельную область легкой цепи (VL) и верблюжье антитело (VHH).

[0124] В некоторых вариантах осуществления связывающий домен представляет собой одноцепочечное антитело (scFv). scFv может быть мышиным, человеческим или гуманизированным scFv.

[0125] *Аллогенный*. Термин «аллогенный» в контексте данного документа относится к любому материалу, полученному от другого животного того же вида, что и индивидуум, которому вводится этот материал. Считается, что два или более индивидуумов являются аллогенными по отношению друг к другу, когда гены в одном или более локусов не являются идентичными. В некоторых аспектах аллогенный материал, полученный от особей одного вида может достаточно сильно отличаться генетически, чтобы вступать в антигенное взаимодействие.

[0126] *Приблизительно или около* . В контексте данного документа термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или большему количеству значений, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично заявленному эталонному значению. В определенных вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100% от возможного значения). Понятно, что когда термин «около» или «приблизительно» используется для изменения заявленного эталонного значения, само заявленное эталонное значение охватывается вместе со значениями, близкими к заявленному эталонному значению по обе стороны от указанного эталонного значения.

[0127] *Аскорбиновая кислота или витамин С.* В контексте данного документа термин «аскорбиновая кислота» или «витамин С» означает L-аскорбиновую кислоту и ее производные, а «производное L-аскорбиновой кислоты» означает производные, которые превращаются в витамин С в результате ферментативной реакции в живом организме. Примеры производных L-аскорбиновой кислоты включают фосфат витамина С, глюкозид аскорбиновой кислоты, аскорбилэтил, сложный эфир витамина С, аскорбилтетрагексилдеканоат, аскорбилстеарат и аскорбил-2-фосфат-6-пальмитат. Примеры фосфата витамина С включают соли фосфата L-аскорбиновой кислоты, такие как натрия фосфат L-аскорбиновой кислоты и магния фосфат L-аскорбиновой кислоты. В одном варианте осуществления витамин С может представлять собой 2-фосфат аскорбиновой кислоты.

[0128] *Основная популяция клеток*. Термин «основная популяция клеток», «основная масса клеток» и т. п. относится к гетерогенной популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления основная клеточная популяция включает гемопоэтические клетки. В некоторых вариантах осуществления основную клеточную популяцию можно получить из плюрипотентных клеток, например, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления основную клеточную популяцию получают из донорской ткани, включая, например, кровь.

[0129] *Среда для индукции CD4/CD8*. В контексте данного документа термин «среда для индукции CD4/CD8» относится к среде для культивирования клеток, которая используется для получения популяции клеток, которая включает CD4-/CD8- клетки, CD4+/CD8+ клетки, CD4+/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления среду для индукции CD4/CD8 используют для дифференциации основной массы HP-клеток в популяцию клеток, которая включает CD4-/CD8- клетки, CD4+/CD8+ клетки, CD4+/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 содержит одно или более или все из аскорбиновой кислоты, SCF, TPO, Flt3L, IL7, ингибитора p38MAPKi, такого как SB203580, и SDF1a.

[0130] *Химерный антигенный рецептор (CAR)*. В контексте данного документа термин «химерный антигенный рецептор» или «CAR» представляет собой сконструированные рецепторы, которые могут придавать антигенную специфичность клеткам (например, NK-клеткам, Т-клеткам, таким как наивные Т-клетки, центральные Т-клетки памяти, эффекторные Т-клетки памяти или их комбинации). CAR также известны как искусственные рецепторы Т-клеток, химерные рецепторы Т-клеток или химерные иммунорецепторы. В некоторых вариантах осуществления CAR по изобретению содержат антигенспецифический нацеливающий домен, внеклеточный домен, трансмембранный домен, необязательно один или более костимулирующих доменов и внутриклеточный сигнальный домен. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, CAR вводят в CD56+/CD3- иммунные клетки (например, NK-клетки или NK-подобные клетки), полученные с использованием способа, описанного в данном документе, таким образом, чтобы перенаправить специфичность в отношении желаемого антигена клеточной поверхности или комплекса MHC-пептид. Эти синтетические рецепторы обычно содержат домен связывания мишени, который связан с одним или более сигнальными доменами посредством гибкого линкера в одной слитой молекуле. Домен связывания мишени используется для направления иммунной клетки (например, CD56+/CD3+ иммунной клетки) на конкретные мишени на поверхности патологических клеток (например, раковой клетки), а сигнальные домены содержат молекулярный механизм для активации и пролиферации иммунной клетки (например, CD56+/CD3- иммунной клетки). Гибкий линкер, который обычно проходит через мембрану иммунной клетки (например, CD56+/CD3- клетки) (т. е. образуя трансмембранный домен), обеспечивает отображение на клеточной мембране домена связывания мишени CAR. CAR успешно позволяют перенаправлять иммунные клетки против антигенов, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток различных злокачественных новообразований, включая лимфомы и солидные опухоли (Gross et al., (1989) Transplant Proc., 21(1 Pt 1): 127-30; Jena et al., (2010) Blood, 116(7):1035-44). Внеклеточный связывающий домен CAR может состоять из одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), полученного путем слияния вариабельных областей тяжелой и легкой цепей мышиного или гуманизированного моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный связывающий домен содержит однодоменное антитело. В качестве альтернативы можно использовать scFv, полученные из Fab (вместо антител, например, полученных из библиотек Fab). В различных вариантах осуществления этот scFv сливается с трансмембранным доменом, а затем с внутриклеточным сигнальным доменом. Разработано по

меньшей мере три поколения CAR. CAR первого поколения содержали домены связывания мишени, присоединенные к сигнальному домену, полученному из цитоплазматической области CD3 дзета или гамма-цепей рецептора Fc. Показано, что CAR первого поколения успешно перенаправляют иммунные клетки на выбранную мишень, но не обеспечивают длительное размножение и противоопухолевую активность *in vivo*. CAR второго и третьего поколения направлены на повышение выживаемости модифицированных клеток и усиление пролиферации за счет включения костимулирующих молекул, таких как CD28, OX-40 (CD134) и 4-1BB (CD137).

[0131] *Культура.* Термин «культура» или «культура клеток» или «культивирование» относится к поддержанию, росту и/или дифференцировке клеток в среде *in vitro*. В различных способах, описанных в данном документе, клетки культивируют в конкретной среде для культивирования клеток (или «средах» в случае множественного числа), которая облегчает или способствует росту или дифференцировке клеток одного типа в клетки другого типа. Например, в определенных вариантах осуществления, описанных в данном документе, культивирование iPSC в среде для культивирования клеток приводит к тому, что по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% клеток становятся CD34+ клетками (т.е. HPC) в общей клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, культивирование популяции клеток, содержащей по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или 80% 30% HPC, приводит к получению популяции клеток, содержащей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8- и CD4+/CD8+ клетки. В еще других вариантах осуществления культивирование популяции клеток, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8- и CD4+/CD8+ клетки, приводит к обогащению популяции CD56+/CD3- клеток (*т.е.* по меньшей мере 50% клеток в общей популяции клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки). Среда для культивирования клеток действует как источник питательных веществ, гормонов и/или других факторов, способствующих размножению и/или поддержанию клеток.

[0132] *Дифференцирование.* Термины «дифференцирование», «индуцирование», «преобразование», «получение» и т.п. относятся к технологическому процессу, в ходе которого клетка одного фенотипа превращается в клетку другого фенотипа.

[0133] *Сконструированный.* Термин «сконструированный» в контексте данного документа описывает полинуклеотид, полипептид или клетку, которые были сконструированы или модифицированы и/или существование и продукция которых требуют вмешательства и/или активности. Например, сконструированная клетка, которая намеренно создана для того, чтобы вызвать определенный эффект, и который отличается от эффекта встречающихся в природе клеток того же типа. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка представляет собой CD56+/CD3- клетку, полученную из iPSC или HPC с использованием способа, описанного в данном документе, и дополнительно экспрессирует химерный антигенный рецептор.

[0134] *Обогащенный.* В контексте данного документа термин «обогащенный» в отношении определенного типа клеток, означает клеточную популяцию, которая имеет по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% %, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% или 90% определенного типа клеток в клеточной популяции, как определено с помощью проточной цитометрии или другого аналитического метода.

[0135] *Ex vivo*. В контексте данного документа термин «*ex vivo*» означает процесс, при котором клетки удаляют из живого организма и размножают вне организма (например, в пробирке, в культуральном мешке, в биореакторе).

[0136] *Функциональный эквивалент или производное*. В контексте данного документа термин «функциональный эквивалент» или «функциональное производное» обозначает в отношении функционального производного аминокислотной последовательности молекулу, которая сохраняет биологическую активность (либо функциональную, либо структурную), которая является практически аналогичной исходной последовательности. Функциональное производное или эквивалент может представлять собой природное производное или может быть получено синтетическим путем. Типичные функциональные производные включают аминокислотные последовательности, имеющие замены, делеции или добавления одной или более аминокислот, при условии сохранения биологической активности белка. Желательно, чтобы замещающая аминокислота имела химико-физические свойства, подобные свойствам замещаемой аминокислоты. Желательные сходные химико-физические свойства включают в заряде, объемности, гидрофобности, гидрофильности и т.п.

[0137] *Гематопоэтическая клетка-предшественник*: термины «гематопоэтическая клетка-предшественник» или «гематопоэтические клетки-предшественники» или «HPC» или «HPCs» относятся к CD34+ клеткам, которые относятся к гемопоэтической линии, но способны к дальнейшей гемопоэтической дифференцировке и включают гемопоэтические стволовые клетки, мультипотенциальные гемопоэтические стволовые клетки, общие миелоидные предшественники, предшественники мегакариоцитов, предшественники эритроцитов и лимфоидные предшественники.

[0138] *Основная масса HPC*. Термины «основная масса HPC», «основная масса гематопоэтических клеток-предшественников» или «основная масса HP-клеток» означают гетерогенную популяцию клеток, включающую гематопоэтические клетки-предшественники. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC получают из iPSC. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC получают из крови.

[0139] *NK-клетки, полученные из HPC*. Термин «NK-клетки, полученные из HPC» означает CD56+/CD3- иммунные клетки (например, NK-клетки или NK-подобные клетки), которые получены из основной популяции HPC после культивирования в среде для культивирования клеток.

[0140] *Среда для индукции HPC*. В контексте данного документа термин среда для индукции HPC относится к культуральной среде, которую используют для получения популяции клеток, включающей гемопоэтические клетки, из исходной клеточной популяции. В некоторых вариантах осуществления исходная клеточная популяция представляет собой iPSC. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит одно или более из BMP4, VEGF, bFGF, аскорбиновой кислоты, ингибитора TGFβ, фактора стволовых клеток (SCF), тромбопоэтина TPO и Flt3L.

[0141] *Иммунные клетки*. В контексте данного документа термин «иммунная клетка» или «иммунные клетки» относится к клеткам иммунной системы, включая, но не ограничиваясь ими, Т-клетки, NK-клетки, T/NK-клетки, дендритные клетки, макрофаги, В клетки, нейтрофилы, эритроциты, моноциты, базофилы, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы и любую их комбинацию. В различных вариантах осуществления иммунные клетки, полученные с использованием описанных в данном документе способов, представляют собой NK-клетки, охарактеризованные как CD56+/CD3- клетки.

[0142] *Индуцированная плюрипотентная стволовая клетка (iPSC).* В контексте данного документа термин «индуцированная плюрипотентная стволовая клетка» или «iPSC» относится к плюрипотентной стволовой клетке, полученной искусственным путем (например, индуцированной) из неплюрипотентной клетки, как правило, взрослой соматической клетки, например, путем индукции экспрессии одного или более генов (включая POU4F1/OCT4 (идентификатор гена: 5460) в комбинации с, но не ограничиваясь ими, SOX2 (идентификатор гена: 6657), KLF4 (идентификатор гена: 9314), cMYC (идентификатор гена: 4609), NANOG (идентификатор гена: 79923), LIN28/LIN28A (идентификатор гена: 79727)). Стволовые клетки могут подвергаться генетической модификации на любой стадии с помощью маркеров или генов, таким образом, чтобы маркеры или гены переносились на любую стадию культивирования. Маркеры можно использовать для очистки или обогащения популяций дифференцированных или недифференцированных стволовых клеток на любой стадии культивирования.

[0143] *Среда для индукции.* Термин «среда для индукции» обычно относится к среде для культивирования клеток, которую используют для дифференциации популяции клеток от первого клеточного фенотипа до второго клеточного фенотипа. В некоторых вариантах осуществления первый клеточный фенотип и второй клеточный фенотип включают гетерогенную популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления первый клеточный фенотип включает гетерогенную популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления второй клеточный фенотип включает гетерогенную популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления среду для индукции используют для дифференциации популяции гетерогенных клеток в популяцию клеток, которая является по существу гомогенной.

[0144] *In vitro.* В контексте данного документа термин «*in vitro*» относится к событиям, происходящим в искусственной среде, *например*, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и *т. д.,* а не в многоклеточном организме.

[0145] *In vivo.* В контексте данного документа термин «*in vivo*» относится к событиям, происходящим в многоклеточном организме, таком как человек и животное, отличное от человека. В отношении клеточных систем этот термин может использоваться для обозначения событий, происходящих внутри живой клетки (в отличие, например, *от систем in vitro*).

[0146] *Стадия выделения.* Термин «стадия выделения» или «стадия выделения клеток» в контексте данного документа означает стадию выделения клеток определенного типа из смеси клеток. В данной области техники известны различные способы выделения определенных типов клеток из смеси клеток, и они включают, например, флуоресцентно-активированную сортировку клеток (FACS), и стратегии сортировки на основе магнитных шариков, такие как активируемая магнитным полем сортировка клеток (MACS).

[0147] *Естественная клетка-киллер (NK).* В контексте данного документа термин «естественная клетка-киллер» или NK-клетка представляет собой лимфоидную клетку, определяемую экспрессией ее маркера и функцией/активностью. Например, у человека NK-клетка экспрессирует CD56. В дополнительном варианте осуществления такие NK-клетки могут экспрессировать CD56 и CD16. В другом примере такие NK-клетки могут представлять собой CD56+/CD3- клетки. NK-клетки могут экспрессировать различные уровни CD56. Например, NK-клетки могут быть «$CD56^{high}$», что означает, что NK-клетки экспрессируют высокий уровень CD56 согласно оценке с помощью методов, известных в данной области техники, например, по оценке с помощью проточной цитометрии. В качестве другого примера, NK-клетки могут быть «$CD56^{dim}$», что означает, что NK-клетки экспрессируют низкий, но поддающийся обнаружению уровень CD56, согласно

оценке методами, известными в данной области техники, например, по оценке с помощью проточной цитометрии.

[0148] *Среда для индукции NK.* В некоторых вариантах осуществления термин «среда для индукции NK» относится к среде для культивирования клеток, которую используют для создания популяции клеток, включающей CD56+/CD3- клетки. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK-клеток содержит одно или более из IL-7, IL-2 и антитела к CD3.

[0149] *iPS NK-клетки.* В контексте данного документа термин «iPS NK-клетки» представляет собой полученные из iPSC NK-клетки, например, NK-клетки, полученные из iPSC в качестве исходных материалов. Такая iPS NK-клетка экспрессирует CD56. В дополнительном варианте осуществления такие iPS NK-клетки могут экспрессировать CD56 и CD16. В другом примере такие iPS NK-клетки могут экспрессировать CD56 и быть CD3- (CD56+/CD3-). iPS NK-клетки также упоминаются в данном документе как «iNK-клетки».

[0150] *Т-клетка.* В контексте данного документа термин «Т-клетка» представляет собой лимфоидную клетку, определяемую экспрессией ее маркера и функцией/активностью. Например, у человека Т-клетка экспрессирует CD3. CD56+/CD3+ клетки известны как NKT-клетки.

[0151] *Термин «одно*цепочечное Fv-антитело» или «scFv» относится к сконструированному антителу, которое содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, соединенные друг с другом непосредственно или через последовательность пептидного линкера.

[0152] *Субъект.* В контексте данного документа термин «субъект» относится к человеку или любому животному, отличному от человека (например, мыши, крысе, кролику, собаке, кошке, крупному рогатому скоту, свинье, овце, лошади или примату). Понятие человек включает пре- и постнатальные формы. Во многих вариантах осуществления субъект представляет собой человека. Субъектом может быть пациент, который относится к человеку, обратившемуся в медицинское учреждение для диагностики или лечения заболевания. Термин «субъект» применяется в данном документе взаимозаменяемо с терминами «индивидуум» или «пациент». Субъект может быть поражен или являться предрасположенным к заболеванию или нарушению, но может и не иметь симптомов заболевания или нарушения.

[0153] *Страдающий от.* У индивидуума, который «страдает от» заболевания, расстройства и/или патологического состояния, было диагностировано или он имеет один или более симптомов заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Заболевание может включать рак, например, лимфому и лейкоз.

[0154] *Терапевтически эффективное количество.* В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» лекарственного средства (например, клеточной терапии) означает количество (например, определенное количество клеток или популяцию клеток, обогащенную определенным процентом определенного типа или типы клеток или клетки), которого достаточно при введении субъекту, страдающему или предрасположенному к заболеванию, нарушению и/или состоянию, для лечения, диагностики, предотвращения и/или отсрочки появления симптома(-ов) заболевания, нарушения и/или состояния. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что терапевтически эффективное количество обычно вводят посредством схемы применения, включающей по меньшей мере одну стандартную дозу. В некоторых вариантах осуществления CD56+/CD3- клетки, описанные в данном документе, модифицируют для экспрессии одного или более трансгенов. В некоторых вариантах осуществления CD56+/CD3- клетки, описанные в данном документе, модифицируют для экспрессии химерного антигенного рецептора, такого как, например, CD19. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом

субъекту вводят от около 100 миллионов до 900 миллионов CD56+/CD3- клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят от около 100 миллионов до 700 миллионов CD56+/CD3- клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят от около 100 миллионов до 500 миллионов CD56+/CD3- клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят от около 200 миллионов до 900 миллионов CD56+/CD3- клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят от около 200 миллионов до 700 миллионов CD56+/CD3- клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуждающемуся в этом субъекту вводят от около 200 миллионов до 500 миллионов CD56+/CD3- клеток, описанных в данном документе.

[0155] *Лечение*. В контексте данного документа термин «лечить», «лечение» или «процесс лечения» относится к любому способу, используемому для частичного или полного облегчения, ослабления, улучшения, подавления, предотвращения, задержки проявления, уменьшения тяжести и/или уменьшения частоты возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или патологического состояния. Лечение может быть назначено субъекту, у которого нет признаков заболевания и/или выявляются только ранние признаки заболевания с целью снижения риска развития патологии, связанной с заболеванием.

[0156] Перечисление числовых диапазонов по конечным точкам в данном документе включает все числа и дроби, входящие в этот диапазон (например, от 1 до 5 включает 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,9, 4 и 5). Следует также понимать, что все числа и их дроби подразумеваются измененными термином «около».

[0157] Различные аспекты данного изобретения более подробно описаны в следующих разделах. Использование разделов не предназначено для ограничения изобретения. Каждый раздел может относиться к любому аспекту изобретения. В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное. В контексте данного документа формы единственного числа включают ссылки на формы как единственного, так и множественного числа, если из контекста явно следует иное.

[0158] Различные аспекты данного изобретения более подробно описаны в следующих разделах. Использование разделов не предназначено для ограничения изобретения. Каждый раздел может относиться к любому аспекту изобретения. В данной заявке применение «или» означает «и/или», если не указано иное.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0159] В настоящем изобретении предложены способы получения NK-клеток из плюрипотентной клетки, такой как iPS-клетка или гемопоэтическая клетка-предшественник (HPC). NK-клетки, полученные из iPSC, называются в данном документе NK-клетками, происходящими из iPS, iPS NK-клетками или iNK-клетками. В изобретении предложены способы культивирования клеток, в которых клетки-предшественники, такие как iPSC или HPC, могут быть дифференцированы с высокой эффективностью в NK-клетки или iPS NK-клетки без необходимости проведения стадии выделения. В раскрытии также показано, что полученные iPS NK-клетки являются функциональными и могут быть дополнительно генетически модифицированы,

например, путем введения химерного антигенного рецептора (CAR), применимого для лечения различных заболеваний или нарушений, таких как рак.

[0160] Различные способы получения CD56+/CD3- клеток (NK-клеток) более подробно описаны ниже.

Способ получения NK-клеток, происходящих из NK или iPS, из плюрипотентных клеток без стадии выделения

[0161] В некоторых вариантах осуществления предложен способ получения NK-клеток или NK-клеток, полученных из iPS, который не требует проведения стадии выделения.

Обзор способа культивирования

[0162] Предложенные в данном документе способы позволяют получать CD56+/CD3- клетки без необходимости проведения каких-либо промежуточных стадий выделения. В некоторых вариантах осуществления способы включают культивирование плюрипотентных стволовых клеток, таких как iPSC, в среде для индукции HPC для получения популяции клеток, включающей гемопоэтические клетки (HPC) (основная масса HP-клеток). Основную популяцию HP-клеток впоследствии культивируют без проведения стадии выделения в среде для индукции CD4/CD8 для получения популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, включающая дважды положительные по CD4/CD8 клетки, также включает CD4+/CD8- клетки, CD4-/CD8- клетки и CD4-/CD8+ клетки. Затем следует период последующего культивирования без проведения стадии выделения, в котором клетки культивируют в среде для индукции NK для получения популяции, обогащенной CD56+/CD3- иммунными клетками. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ получения CD56+/CD3- клеток включает: 1) культивирование плюрипотентных клеток в среде для индукции HPC для получения популяции, включающей гемопоэтические клетки (основная масса HP-клеток); 2) культивирование основной массы HP-клеток в среде для индукции CD4/CD8 для получения популяции клеток, которая включает CD4+/CD8- клетки, CD4-/CD8- клетки и CD4-/CD8+ клетки; и 3) культивирование популяции клеток, которая включают CD4+/CD8- клетки, CD4-/CD8- клетки и CD4-/CD8+ клетки, при индукции NK в течение определенного периода времени для получения CD56+/CD3- клеток.

[0163] В некоторых вариантах осуществления способ получения NK-клеток или iPS NK-клеток включает культивирование клеток, включающих гемопоэтические клетки-предшественники (например, основную массу HP-клеток), для получения популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, с последующим периодом культивирования без проведения стадии выделения, в которой популяция клеток культивируется в среде для получения популяции, обогащенной CD56+/CD3- иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления способ получения CD56+/CD3- иммунных клеток, происходящих из плюрипотентных стволовых клеток, включает культивирование плюрипотентных стволовых клеток в одной или более средах. В некоторых вариантах осуществления способ получения CD56+/CD3- иммунных клеток включает культивирование гемопоэтических клеток-предшественников в одной или более культуральных средах. В некоторых вариантах осуществления способ получения CD56+/CD3- иммунных клеток включает культивирование смеси или популяции клеток, включающих дважды положительные по CD4/CD8 клетки, в одной или более культуральных средах. В некоторых вариантах осуществления популяцию, обогащенную CD56+/CD3- иммунными клетками, впоследствии может быть разделена любым подходящим способом, известным в данной области техники, например, таким как

сортировка FACS или методами выделения на основе магнитных шариков. В одном варианте осуществления iPS клетки могут быть дифференцированы в iPS NK-клетки через около 4-8 недель, 5-7 недель или через около 6 недель. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления iPS-клетки могут быть дифференцированы в NK-клетки через около 4-8 недель. В некоторых вариантах осуществления iPS-клетки могут быть дифференцированы в NK-клетки через около 5-7 недель. В некоторых вариантах осуществления IPS-клетки могут быть дифференцированы в NK-клетки через около 6 недель.

[0164] Процесс дифференцировки клеток можно оценить различными способами, известными в данной области техники. Например, в некоторых вариантах осуществления дифференцировка культивируемых клеток может быть оценена путем получения образца культивируемых клеток и применения к этому образцу культивируемых клеток одного или более аналитических методов для определения клеточного фенотипа клетки. Известные способы определения фенотипа клеток включают, например, проточную цитометрию и иммунофлуоресцентную визуализацию. Любые подходящие анализы отбора проб и фенотипирования могут быть использованы с методами культивирования клеток, описанными в данном документе, для определения хода процесса дифференцировки клеток. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в данном документе, включают один или более этапов отбора проб для определения фенотипа клеток в заданный момент времени.

Обзор от iPSC до основной массы HP-клеток

[0165] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную клетку, такуюкак iPSC, культивируют в среде для индукции HPC с получением популяции, содержащей основную массу HP-клеток. В некоторых вариантах осуществления культивирование iPSC в среде для индукции HPC для получения основной массы HPC-клеток включает культивирование iPSC в среде для индукции HPC. Среда для индукции HPC может содержать различные компоненты, которые позволяют получить основную массу HP-клеток. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит по меньшей мере одно или более соединений, выбранных из костного морфогенетического белка-4 (BMP4), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF), аскорбиновой кислоты, ингибитора ROCK, ингибитора GSK3, фактора стволовых клеток (SCF), тромбопоэтина (TPO), Flt3L и ингибитор TGFβ. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC для индуцирования HPC из iPSC содержит BMP4. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для индукции HPC из iPSC содержит VEGF. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для индукции HPC из iPSC содержит bFGF. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда для индукции HPC из iPSC содержит TGFβ.

[0166] iPSC культивируют в среде для индукции HPC в течение периода времени, достаточного для получения основной массы HP-клеток. В некоторых вариантах осуществления iPSC культивируют в среде для индукции HPC в течение периода, составляющего около 7-21 день или 10-18 дней, или около 14 дней. В некоторых вариантах осуществления iPSC культивируют в среде для индукции HPC в течение периода, составляющего около 13 дней.

[0167] В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях с низким содержанием кислорода, таких как, например, при уровне O_2 около 3%, 4%, 5% или 6%. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки культивируют при уровне O_2 около 3%. В некоторых вариантах осуществления эти клетки культивируют при уровне O_2 около 4%. В некоторых вариантах осуществления эти

клетки культивируют при уровне O_2 около 5%. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют при уровне O_2 около 6%.

Обзор от основной массы HP-клеток до CD4/CD8

[0168] В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток или HPC, полученные иным образом, например, первичные HPC, выделенные от донора-человека, или HPC, дифференцированные из других источников/типов стволовых клеток, таких как эмбриональные стволовые клетки, дополнительно культивируют без какой-либо промежуточной стадии выделения в среде для получения популяции клеток, включающей дважды положительные (DP) по CD4/CD8 клетки. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток или HPC, полученные иным образом, например, первичные HPC, выделенные от донора-человека, или HPC, дифференцированные из других источников/типов стволовых клеток, таких как эмбриональные стволовые клетки, дополнительно культивируют без какой-либо промежуточной стадии выделения в среде для получения популяции клеток, включающей CD4+/CD8 клетки. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток или HPC, полученные иным образом, например, первичные HPC, выделенные от донора-человека, или HPC, дифференцированные из других источников/типов стволовых клеток, таких как эмбриональные стволовые клетки, дополнительно культивируют без какой-либо промежуточной стадии выделения в среде для получения популяции клеток, включающей CD4-/CD8- клетки. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток или HPC, полученные иным образом, например, первичные HPC, выделенные от донора-человека, или HPC, дифференцированные из других источников/типов стволовых клеток, таких как эмбриональные стволовые клетки, дополнительно культивируют без какой-либо промежуточной стадии выделения в среде для получения популяции клеток, включающей CD4-/CD8+ клетки. Следует понимать, что популяция клеток, полученная этим способом, включает CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. Популяция клеток включает, например, лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8, содержащей по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из аскорбиновой кислоты, фактора стволовых клеток (SCF), IL-7, Flt3L, TPO, фибронектина или их варианта, лиганда Notch (например, Jag-1, Jag-2, DLL-1, DLL-3, DLL-4), ингибитора p38 и SDF-1 для получения популяции, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8, содержащей аскорбиновую кислоту, для получения популяции, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8, содержащей SCF, для получения популяции, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8, содержащей IL-7, для получения популяции, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8, содержащей Flt3L, для получения популяции, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8, содержащей ингибитор p38, для получения популяции, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. В некоторых вариантах осуществления основную массу HPC-клеток культивируют в среде для индукции CD4/CD8,

содержащей SDF-1, для получения популяции, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки.

[0169] Период культивирования длится в течение времени, подходящего для получения популяции клеток, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. В некоторых вариантах осуществления культивирование основной массы HP-клеток для получения популяции клеток, включающей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки, составляет около 2-6 недель; 3-5 недель или около 3 недель. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления период культивирования клеток составляет около 2-6 недель. В некоторых вариантах осуществления период культивирования клеток составляет около 3-5 недель. В некоторых вариантах осуществления период культивирования клеток составляет около 3 недель.

[0170] В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях с низким содержанием кислорода, таких как, например, при уровне O_2 около 3%, 4%, 5% или 6%. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях с низким содержанием кислорода, таких как, например, при уровне O_2 около 3%. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях с низким содержанием кислорода, таких как, например, при уровне O_2 около 4%. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях с низким содержанием кислорода, таких как, например, при уровне O_2 около 5%. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях с низким содержанием кислорода, таких как, например, при уровне O_2 около 6%.

Обзор от CD4/CD8 клеток до CD56+/CD3- клеток

[0171] Популяция клеток, включающая CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8-, как описано выше, может быть дополнительно культивирована в среде клеточной культуры для получения популяции CD56+/CD3- клеток. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда представляет собой среду для индукции NK. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK содержит одно или более из IL-7, IL-2 и антитела к CD3.

[0172] В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, включающую CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки, далее культивируют, без промежуточной стадии выделения, в культуральной среде для получения популяции клеток, обогащенной CD56+/CD3- клетками. Такие CD56+ клетки включают, например, естественные клетки-киллеры (NK). В некоторых вариантах осуществления популяцию, включающую CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки, культивируют в среде, включающей активатор CD3, IL-2 и/или IL-7. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления популяцию, включающая CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки, культивируют в среде, включающей активатор CD3. Активаторы CD3 известны в данной области техники и включают, например, комплексы антител, которые связывают поверхностные лиганды CD3 и/или CD28. Активаторы CD3 включают, например, антитело к CD3 или связанный с ним фрагмент. В некоторых вариантах осуществления при использовании антитела к CD3 антитело может представлять собой поликлональное антитело или моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой моноклональное антитело. Антитело может принадлежать к любому классу иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM, IgD, IgE или IgG. Можно использовать

различные виды антител к CD3, включая, например, антитела, полученные из клона OKT3 или клона UCHT1. Концентрация антитела к CD3 в среде составляет, например, от 10 нг/мл до 1000 нг/мл.

[0173] В некоторых вариантах осуществления популяцию, включающую CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки, культивируют в среде, содержащей IL-2. В некоторых вариантах осуществления популяцию, включающую CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки, культивируют в среде, содержащей IL-7. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях с низким содержанием кислорода, таких как, например, при уровне O_2 около 3%, 4%, 5% или 6%. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки культивируют при уровне O_2 около 3%. В некоторых вариантах осуществления эти клетки культивируют при уровне O_2 около 4%. В некоторых вариантах осуществления эти клетки культивируют при уровне O_2 около 5%. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют при уровне O_2 около 6%.

[0174] Популяцию клеток, включающую CD56+ клетки, можно дополнительно культивировать в среде для индукции NK для обогащения популяции CD56+/CD3- клетками. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, включающую CD56+ клетки, культивируют в среде для индукции NK, содержащей IL-7 и/или IL-15, для дополнительного обогащения CD56+ клетками. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, включающую CD56+ клетки, культивируют в среде для индукции NK, содержащей IL-7. В некоторых вариантах осуществления популяцию клеток, включающую CD56+ клетки, культивируют в среде для индукции NK, содержащей IL-15. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в условиях с низким содержанием кислорода, таких как, например, при уровне O_2 около 3%, 4%, 5% или 6%. В некоторых вариантах осуществления получаемые CD56+/CD3- клетки представляют собой NK-клетки. Процент продуцируемых CD56+/CD3- NK-клеток составляет по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более 95%. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 50% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 55% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 60% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 65% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 70% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 75% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 80% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 85% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 90% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить по меньшей мере около 95% CD56+/CD3- NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления способ позволяет получить более 95% CD56+/CD3- NK-клеток.

[0175] В некоторых вариантах осуществления около 5%, 10, 15%, 20%, 25% или около 30% клеток, полученных с помощью данного способа культивирования, представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления менее 5% полученных клеток представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления около 5% полученных клеток представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления около 10% полученных клеток представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления менее 15% полученных клеток представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых

вариантах осуществления менее 20% полученных клеток представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления менее 25% полученных клеток представляют собой CD3+ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления менее 30% полученных клеток представляют собой CD3+ Т-клетки.

[0176] В некоторых вариантах осуществления популяцию, обогащенную CD56+/CD3- клетками, выделяют способами, известными в данной области техники. Такие способы включают, например, методы сортировки на основе проточной цитометрии (FACS) и методы сортировки на основе магнитных полей (MACS).

[0177] В некоторых вариантах осуществления период культивирования для получения CD56+/CD3- NK-клеток из популяции, включающей CD4-/CD8-клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8+ клетки и CD4+/CD8 клетки, составляет около 4, 5, 6, 7 , 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет около 7 дней.

[0178] В некоторых вариантах осуществления обогащенная популяция клеток CD56+ содержит NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления обогащенные CD56+ клетки содержат CD3- клетки. В некоторых вариантах осуществления обогащенные CD56+ клетки содержат CD3+ клетки.

Применимые плюрипотентные клетки для дифференцировки CD56+/CD3- клеток.

[0179] В некоторых вариантах осуществления любые плюрипотентные, мультипотентные или полученные от пациента HPC могут быть использованы в описанных в данном документе способах. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой взрослую стволовую клетку. Различные взрослые стволовые клетки известны в данной области техники и включают, например, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки, полученные из пуповиной крови, стволовые клетки костного мозга, жировые стволовые клетки и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPSC). Таким образом, NK-клетки, полученные в соответствии с описанными в данном документе способами, могут быть получены из любой плюрипотентной, мультипотентной или полученной от пациента HPC, например, первичной HPC, полученной непосредственно от донора.

[0180] В некоторых вариантах осуществления изобретения плюрипотентная клетка включает, например, эмбриональные стволовые (ES) клетки, эмбриональные стволовые клетки, полученные из клонированного эмбриона путем ядерного переноса (ntES клетки), зародышевые стволовые клетки («GS клетки»), эмбриональные зародышевые клетки («EG клетки»), iPS клетки и плюрипотентные клетки, полученные из культивированных фибробластов или стволовых клеток костного мозга (клетки Muse). В некоторых вариантах осуществления iPS клетки могут быть получены из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых людей. Способы получения iPS клеток известны в данной области. Эти клетки могут быть получены путем введения репрограммирующих факторов в произвольные соматические клетки. Примеры факторов перепрограммирования в данном документе включают такие гены, как Oct3/4, Sox2, Soxl, Sox3, Sox15, Soxl 7, Kif 4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tel1, бета-катенин, Lin28b, Salll, Sall4, Esrrb, Nr5a2, Tbx3 и Glisl и их генные продукты. Эти факторы перепрограммирования можно использовать по отдельности, или два или более из них можно использовать в комбинации. Примеры комбинаций факторов перепрограммирования включают описанные в

WO2007/069666, WO2008/118820, WO2009/007852, WO2009/032194, WO2009/058413, W02009/057831, W02009/075119, WO2009/079007, WO2009/091659, WO2009/101084, WO2009/101407, WO2009/102983, WO2009/114949, WO2009/117439, WO2009/126250, WO2009/126251, WO2009/126655, WO2009/157593, WO2010/009015, WO2010/033906, WO2010/033920, WO2010/042800, WO2010/050626, WO2010/056831, WO2010/068955, WO2010/098419, WO2010/102267, WO2010/111409, WO2010/111422, WO2010/115050, WO2010/124290, WO2010/147395, WO2010/147612, Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797, Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528, Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26: 2467-2474, Eluangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol. 26: 1269-1275, Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574, Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3: 475-479, Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135, Feng B, et al. (2009), Nat. Cell Biol. 11: 197-203, R. L. Judson et al., (2009), Nat. Biotechnol., 27: 459-461, Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci US A. 106: 8912-8917, Kim J, et al. (2009), Nature. 461: 649-643, Ichida J K, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5: 491-503, Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6: 167-74, Han J, et al. (2010), Nature. 463: 1096-100, Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28: 713-720 и Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474: 225-9.

[0181] iPSC можно получить из любой подходящей ткани. В некоторых вариантах осуществления iPSC получают из мононуклеарных клеток периферической крови.

[0182] Гематопоэтические клетки-предшественники (HPC) представляют собой клетки, способные дифференцироваться в клетки крови, такие как лимфоциты, эозинофилы, нейтрофилы, базофилы, эритроциты и мегакариоциты. Гематопоэтические клетки-предшественники или гематопоэтические стволовые клетки могут быть идентифицированы, например, на основании наличия поверхностных антигенов CD34 и/или CD43.

[0183] В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для получения CD56+/CD3-NK-клеток, описанных в данном документе, подвергаются генетической модификации на любой стадии клеточной дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления CD56+/CD3-NK-клетки подвергаются генетической модификации для включения желаемого химерного антигенного рецептора (CAR), Т-клеточного рецептора (TCR) или другого сконструированного белка.

[0184] В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для получения CD56+/CD3-NK-клеток, описанных в данном документе, подвергаются генетической модификации на плюрипотентной, мультипотентной или унипотентной стадии. Например, в некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для получения CD56+/CD3-NK-клеток, описанных в данном документе, подвергаются генетической модификации на плюрипотентной стадии. Например, клетка может подвергаться генетической модификации на стадии эмбриональной стволовой клетки или на стадии стволовой клетки iPSC. В некоторых вариантах осуществления клетки, используемые для получения CD56+/CD3- NK-клеток, описанных в данном документе, подвергаются генетической модификации на мультипотентной стадии. Например, клетка может подвергаться генетической модификации на стадии а стадии гемопоэтической стволовой клетки (HSC).

Условия культивирования – iPSC в основную массу HPC-клеток

[0185] В некоторых вариантах осуществления среда для получения гемопоэтических клеток-предшественников (т.е. среда для индукции HPC) из iPSC может быть приготовлена путем добавления витамина С в базальную среду, которую используют для культивирования клеток животных. Примеры базальной среды включают среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), среду 199, минимальную

необходимую среду Игла (EMEM), среду αMEM, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), среду Хэма F12, среду RPMI 1640, среду Фишера и нейробазальную среду. (Life Technologies) и смеси двух или более из этих сред. В некоторых вариантах осуществления среда содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления среда не содержит сыворотки.

[0186] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC может включать StemPro™ -34. StemPro™ -34 представляет собой бессывороточную среду, разработанную для поддержки развития гемопоэтических клеток человека в культуре.

[0187] При необходимости, в некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC может также содержать одно или более веществ, таких как альбумин, инсулин человека, трансферрин человека, селен или селенит натрия, жирную кислоту, микроэлементы, 2-меркаптоэтанол, тиолглицерин, α-монотиоглицерин, липиды, аминокислоты, L-глютамин, заменимые аминокислоты, витамины, факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики, антиоксиданты, пировиноградная кислота, буферы, неорганические соли и цитокины.

[0188] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC включает среду IMDM, содержащую сыворотку, инсулин, трансферрин, селен, тиолглицерин или α-монотиоглицерин, L-глутамин и аскорбиновую кислоту.

[0189] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути костного морфогенетического белка 4 (BMP4). Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, BMP4.

[0190] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути фактора роста эпителия сосудов (VEGF). Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, VEGF.

[0191] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию пути фактор роста фибробластов (FGF). Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, bFGF и FGF2.

[0192] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути фактора стволовых клеток/kit. Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, SCF.

[0193] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути лиганда Flt3. Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, лиганд Flt3 (Flt3L).

[0194] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции HPC содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути тромбопоэтина. Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, TPO.

[0195] Ингибитор TGFβ представляет собой низкомолекулярный ингибитор, который препятствует сигнальной трансдукции семейства TGFβ и включает, например, SB431542, SB202190 (оба R.K. Lindemann et al., Mol. Cancer 2:20 (2003)), SB505124 (GlaxoSmithKline), NPC30345, SD093, SD908, SD208 (Scios), LY2109761, LY364947, LY580276 (Lilly Research Laboratories) и т.п.

[0196] SB431542 является мощным и специфическим ингибитором рецепторов активин-рецептороподобная киназы (ALK) типа I ALK4, ALK5 и ALK7 суперсемейства трансформирующего фактора роста-бета (TGFβ).

[0197] Например, когда ингибитором TGFβ является SB431542, его концентрация в среде предпочтительно составляет 0,5–100 мкМ.

[0198] Среда для индукции HPC для получения основной популяции HP-клеток может быть дополнительно дополнена цитокином(-ами), выбранными из группы, состоящей из BMP4 (костный морфогенетический белок 4), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), bFGF (основной фактор роста фибробластов), SCF (фактор стволовых клеток), TPO (тромбопоэтин) и Flt3L (лиганд Flt3).

[0199] В одном варианте осуществления среда для индукции HPC может включать StemPro34, дополненный человеческим инсулином (около 10 мкг/мл), человеческим трансферрином (около 5,5 мкг/мл), селенитом натрия (около 6,7 нг/мл), L-глютамином (около 2 мМ), α-монотиоглицерином (около 0,4 мМ) и SB431542 (около 6 мкМ).

[0200] В некоторых вариантах осуществления витамин С можно добавлять каждые четыре дня, каждые три дня, каждые два дня или каждый день в течение периода культивирования. Добавление витамина С к среде можно осуществлять в количестве, соответствующем от около 5 мкг/мл до около 500 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления витамин С присутствует в среде в количестве около 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл или 500 мкг/мл.

[0201] В описании термин «витамин С» означает L-аскорбиновую кислоту и ее производные, а термин «производное L-аскорбиновой кислоты» означает производные, которые превращаются в витамин С в результате ферментативной реакции в живом организме. Примеры производных L-аскорбиновой кислоты включают фосфат витамина С (например, 2-фосфат аскорбиновой кислоты), глюкозид аскорбиновой кислоты, аскорбилэтил, сложный эфир витамина С, аскорбилтетрагексилдеканоат, аскорбилстеарат и аскорбил-2-фосфат-6-пальмитат. Предпочтительным является фосфат витамина С. Примеры фосфата витамина С (например, 2-фосфата аскорбиновой кислоты) включают соли фосфата L-аскорбиновой кислоты, такие как натрия фосфат L-аскорбиновой кислоты и магния фосфат L-аскорбиновой кислоты.

[0202] В некоторых вариантах осуществления, когда вещества, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути костного морфогенетического белка 4 (BMP4), представляют собой BMP4, концентрация BMP4 в индукционной среде HPC для получения гемопоэтических прогениторных клеток составляет от около 5 нг/мл до 500 нг/мл, например, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 150 нг/мл, 200 нг/мл, 250 нг/мл, 300 нг/мл, 350 нг/мл, 400 нг/мл, 450 нг/мл или 500 нг/мл.

[0203] В некоторых вариантах осуществления, когда вещества, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути фактора роста эпителия сосудов (VEGF), представляют собой VEGF, концентрация VEGF в индукционной среде HPC для получения гемопоэтических прогениторных клеток составляет от около 5 нг/мл до 500 нг/мл, например, около 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 150 нг/мл, 200 нг/мл, 250 нг/мл, 300 нг/мл, 350 нг/мл, 400 нг/мл, 450 нг/мл или 500 нг/мл.

[0204] В некоторых вариантах осуществления, когда вещества, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути фактора роста фибробластов (FGF), представляют собой bFGF, концентрация bFGF в индукционной среде HPC для получения гемопоэтических прогениторных клеток составляет от около 5 нг/мл до 500 нг/мл, например, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100 нг/мл, 150 нг/мл, 200 нг/мл, 250 нг/мл, 300 нг/мл, 350 нг/мл, 400 нг/мл, 450 нг/мл или 500 нг/мл.

[0205] В некоторых вариантах осуществления, когда вещества, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути фактора стволовых клеток/kit, представляют собой SCR, концентрация SCF в индукционной среде HPC для получения гемопоэтических прогениторных клеток составляет от около 5 нг/мл до 100 нг/мл, например, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл или 100 нг/мл.

[0206] В некоторых вариантах осуществления, когда вещества, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути лиганда Flt3, представляют собой Flt3L, концентрация Flt3L в индукционной среде HPC для получения гемопоэтических прогениторных клеток составляет от около 1 нг/мл до 100 нг/мл, например, 1 нг/мл, 2 нг/мл, 3 нг/мл, 4 нг/мл, 5 нг/мл, 6 нг/мл, 7 нг/мл, 8 нг/мл, 9 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 50 нг/мл или 100 нг/мл.

[0207] В некоторых вариантах осуществления, когда вещества, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути тромбопоэтина, представляют собой TPO, концентрация TPO в индукционной среде HPC для получения гемопоэтических прогениторных клеток составляет от около 1 нг/мл до 200 нг/мл, например, 1 нг/мл, 2 нг/мл, 3 нг/мл, 4 нг/мл, 5 нг/мл, 6 нг/мл, 7 нг/мл, 8 нг/мл, 9 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл, 100, 125 нг/мл, 150 нг/мл, 175 нг/мл или 200 нг/мл.

[0208] В некоторых вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в адгезивной культуре или суспензионной культуре. В случае адгезивной культуры культивирование может осуществляться в культуральном сосуде, покрытом покрывающим средством, и/или может осуществляться совместное культивирование с другими клетками. Примеры других клеток для совместного культивирования включают C3H10Tl/2 (Takayama N., et al. J Exp Med. 2817-2830, 2010) и стромальные клетки, полученные от другого вида (Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov; 221(2): 367-77). Примеры покрывающего средства включают Матригель (Nivea A, et al. PLoS One. 6(7): e22261, 2011), iMatrix 511 (Miyazaki T, et al. Nature Communication 2012 ;3 :1236), желатин, коллаген, эластин и тому подобное, глюкозаминогликан и протеогликан, такие как гиалуроновая кислота, хондроитин сульфат и тому подобное, белки клеточной адгезии, такие как фибронектин или его вариант, витронектин, ламинин и тому подобное. Примеры метода получения суспензионной культуры включают методы, описанные в Chadwick et al. Blood 2003, 102: 906-15, Vijayaragavan et al. Cell Stem Cell 2009, 4: 248-62 и Saeki et al. Stem Cells 2009, 27: 59-67.

[0209] В некоторых вариантах осуществления основная клеточная масса HP также может быть приготовлена из сетеподобной структуры (которую также называют ES-sac или iPS-sac), полученной путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток. «Сетеподобная структура» в данном случае представляет собой трехмерную мешкообразную структуру (с пространством внутри), полученную из плюрипотентных стволовых клеток. Структура образована популяцией эндотелиальных клеток и т.п. и содержит гемопоэтические клетки-предшественники внутри.

[0210] В некоторых вариантах осуществления температурный режим культивирования для получения основной массы HP-клеток составляет от около 37°C до около 42°C. В некоторых вариантах осуществления температура составляет, например, от около 37°C до около 42°C, предпочтительно от около 37 до около 39°C. Период культивирования может быть соответствующим образом определен специалистами в данной области техники путем мониторинга количества гемопоэтических клеток-предшественников и/или тому подобного путем получения образца из клеточной культуры для фенотипического анализа. В данной области техники известны различные методы, связанные с фенотипическим анализом образцов клеток и включающие, например, проточную цитометрию и методы иммунофлуоресценции.

[0211] Период культивирования для получения основной массы HP-клеток может варьироваться и включать, например, от 6 до 14 дней. Примеры периода культивирования включают не менее 6 дней, не менее 7 дней, не менее 8 дней, не менее 9 дней, не менее 10 дней, не менее 11 дней, не менее 12 дней, не менее 13 дней и не менее 14 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет шесть дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 7 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 8 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 9 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 10 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 10 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 11 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 12 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 13 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет 14 дней. В некоторых вариантах осуществления период культивирования составляет более 14 дней. Культивирование можно проводить в условиях низкого содержания кислорода. Примеры условий с низким содержанием кислорода включают уровни 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3% или ниже. Частота замены среды может быть определена специалистом в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления среду можно заменять каждые 2 дня. В некоторых других вариантах осуществления среду можно заменять каждые 3 дня. В некоторых вариантах осуществления среду заменяют каждый день.

[0212] В некоторых вариантах осуществления культивирование для получения основной массы HP-клеток осуществляется путем сочетания одного или более из вышеперечисленных условий. Например, в некоторых вариантах осуществления способ получения основной массы HP-клеток из iPSC включает: (i) культивирование плюрипотентных стволовых клеток на C3H10Tl/2 в базальной среде с добавлением витамина C в условиях с низким содержанием кислорода; и (ii) последующее добавление VEGF, SCF и Flt3L к культуральной жидкости (1), и культивирование клеток в условиях с нормальным уровнем кислорода. Период, в течение которого проводят стадию (i), составляет по меньшей мере не менее шести дней, предпочтительно не менее семи дней, более предпочтительно семи дней. Период, в течение которого проводят стадию (ii), составляет не менее шести дней, не менее семи дней и в течение семи дней.

[0213] В некоторых вариантах осуществления гемопоэтические клетки-предшественники, полученные в основной массе HP-клеток, могут быть выделены перед дальнейшим применением. В некоторых других вариантах осуществления полученные гемопоэтические клетки-предшественники можно использовать в качестве популяции клеток, которая также содержит другие виды клеток (основная масса HP-клеток). Основная популяция HP-клеток представляет собой неразделенный клеточный препарат. В некоторых вариантах осуществления способ не включает стадию выделения.

Условия культивирования – основная масса HP-клеток в CD4/CD8 клетки

[0214] В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 приводит к получению популяции клеток, включающей CD4+/CD8+ клетки, CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки. Термин «дважды положительные по CD4/CD8 клетки» (DP-клетки) означают клетки, которые экспрессируют как CD4, так и CD8. Дважды положительные по CD4/CD8 клетки могут быть идентифицированы как CD4-, CD8-, CD3- и CD45-положительные клетки. Термин «дважды отрицательные по CD4/CD8 клетки» (DN-клетки) означают клетки, которые не экспрессируют ни CD4, ни CD8-. «CD4-/CD8+

клетки» означают клетки, которые не экспрессируют CD4-, но экспрессируют CD8+. «CD4+/CD8-клетки» означают клетки, которые экспрессируют CD4, но не экспрессируют CD8.

[0215] В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, включающая CD4+/CD8+ клетки, CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки, может быть индуцирована для дифференцировки в CD56+/CD3- клетки.

[0216] В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция, включающая, помимо прочего, дважды положительные по CD4/CD8 клетки, может быть получена способом, который включает стадию культивирования гемопоэтических клеток-предшественников или основной массы HP клеток в среде с добавлением витамина C. Витамин C, добавляемый в базальную среду, такой же, как и в описанном выше способе индукции основной массы HP-клеток.

[0217] В некоторых вариантах осуществления среда, используемая для получения популяции клеток, включающей CD4+/CD8+ клетки, CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки и CD4+/CD8- клетки из основной массы HP-клеток, представляет собой среду для индукции CD4/CD8. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции CD4/CD8 может быть приготовлена путем добавления витамина C к базальной среде, которую используют для культивирования клеток животных. Примеры базальной среды включают среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), среду 199, минимальную необходимую среду Игла (EMEM), среду αMEM (Thermo Fisher Scientific (Gibco)), среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), среду Хэма F12, среду RPMI 1640, среду Фишера и нейробазальную среду. (Life Technologies) и смеси двух или более из этих сред. Среда может содержать сыворотку или может не содержать сыворотки.

[0218] При необходимости базальная среда может также содержать одно или более веществ, таких как альбумин, человеческий инсулин, человеческий трансферрин, селен, селенит натрия, жирные кислоты, микроэлементы, 2-меркаптоэтанол, тиолглицерин, липиды, аминокислоты, L-глутамин, заменимые аминокислоты, витамины, факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики, антиоксиданты, пировиноградная кислота, буферы, неорганические соли и цитокины.

[0219] Среда для индукции CD4/CD8 для получения клеточной популяции, включающей, помимо прочих клеток, дважды положительные по CD4/CD8 клетки, может быть в дальнейшем дополнена цитокином(-ами), выбранными из группы, состоящей из аскорбиновой кислоты, SCF, IL-7, Flt3L, TPO, фибронектина или его варианта, лиганда Notch, ингибитора p38 и SDF-1.

[0220] В некоторых вариантах осуществления витамин C можно добавлять каждые четыре дня, каждые три дня, каждые два дня или каждый день в течение периода культивирования. Добавление витамина C к среде можно осуществлять в количестве, соответствующем от около 5 мкг/мл до около 500 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления витамин C присутствует в среде в количестве около 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл или 500 мкг/мл.

[0221] В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути фактора стволовых клеток/kit. Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, SCF.

[0222] В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути лиганда Flt3. Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, лиганд Flt3 (Flt3L).

[0223] В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит одно или более веществ, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути тромбопоэтина. Такие вещества включают, но не ограничиваются ими, TPO.

[0224] В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит одно или более из ингибиторов p38, являющихся ингибиторами p38α и p38β, которые, в свою очередь, подавляют последующую активацию киназы-2 MAPKAP и белка теплового шока 27. Примеры химического ингибитора p38, используемого в данном изобретении, включают, но не ограничиваются ими, SB203580 (4-(4-фторфенил)-2-(4-метилсульфонилфенил)-5-(4-пиридил)-1H-имидазол), и его производное, SB202190 (4-(4-фторфенил)-2-(4-гидроксифенил)-5-(4-пиридил)-1H-имидазол), и его производное, SB239063 (транс-4-[4-(4-фторфенил)-5-(2-метокси-4-пиримидинил)-1H-имидазол-1-ил]циклогексанол) и его производное, SB220025 и его производное, PD169316, RPR200765A, AMG-548, BIRB-796, SClO-469, SCIO-323, VX-702 и FR167653. Эти соединения являются коммерчески доступными и, например, SB203580, SB202190, SC239063, SB220025 и PD169316 доступны от Calbiochem, а SClO-469 и SCIO-323 доступны от Scios и т.п. Другие примеры ингибиторов p38 включают доминантно-отрицательный мутант p38 , который включает p38T180A, полученный путем точечной мутации треонина в положении 180, расположенного в области связывания ДНК p38 с аланином, p38Y182F, полученный путем точечной мутации тирозина в положении 182 p38 у человека и мыши с фенилаланином и т.п. Ингибитор p38 содержится в среде в концентрации, например, от около 0,5 мкМ до около 50 мкМ.

[0225] В некоторых вариантах осуществления базальная среда содержит SDF-1.

[0226] В некоторых вариантах осуществления SDF-1 может представлять собой не только SDF-1α или его зрелую форму, но также изоформу, такую как SDF-1β, SDF-1γ, SDF-1δ, SDF-1ε, SDF-1ϕ и т.п., или их зрелую форму или их смесь в любом соотношении или т.п. Предпочтительно используют SDF-1α. SDF-1 иногда называют CXCL-12 или PBSF.

[0227] В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот в аминокислотной последовательности SDF-1 могут быть заменены, удалены и/или добавлены, если они обладают активностью хемокина, и аналогичным образом, сахарная цепь может быть заменена, удалена и/или добавлена. Аминокислотная мутация является приемлемой, если сохраняются по меньшей мере 4 цистеиновых остатка (Cys30, Cys32, Cys55 и Cys71 в SDF-1α человека) и проявляется не менее 90% идентичность аминокислотной последовательности природного вещества. SDF-1 может быть получен от млекопитающего, например, человека или млекопитающего, отличного от человека, такого как обезьяна, овца, крупный рогатый скот, лошадь, свинья, собака, кошка, кролик, крыса, мышь и т.п. Например, белок, зарегистрированный под номером доступа в GenBank: NP_954637, можно использовать в качестве SDF-1α человека, а белок, зарегистрированный под номером доступа в GenBank: NP_000600, можно использовать в качестве SDF-1β. В некоторых вариантах осуществления, когда веществами, вызывающими сигнальную трансдукцию сигнального пути лиганда Flt3, является Flt3L, концентрация Flt3L в среде для продуцирования популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, составляет от около 1 нг/мл до 100 нг/мл, например, 1 нг/мл, 2 нг/мл, 3 нг/мл, 4 нг/мл, 5 нг/мл, 6 нг/мл, 7 нг/мл, 8 нг/мл, 9 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл или 100 нг/мл.

[0228] В некоторых вариантах осуществления, когда вещества, которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути фактора стволовых клеток/kit, представляют собой SCF, SCF используют для получения популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, в тех же условиях, что описаны выше.

[0229] В некоторых вариантах осуществления, когда вещества,которые вызывают сигнальную трансдукцию сигнального пути тромбопоэтина, представляют собой TPO, TPO используют для получения популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, в тех же условиях, что описаны выше.

[0230] Фибронектин или его вариант для применения по изобретению особо не ограничивается, если он представляет собой молекулу, способную связываться с CD3-положительными клетками. Вариант фибронектина особо не ограничивается, если он представляет собой молекулу, способную связываться с VLA-5 и VLA-4 на поверхности CD3-положительных клеток, и его примеры включают RetroNectin. Фибронектин и его вариант могут присутствовать в среде в любой форме. Например, они могут содержаться в среде во время культивирования или могут быть иммобилизованы на контейнере для культивирования, и предпочтительно являются иммобилизованными на контейнере для культивирования.

[0231] Когда фибронектин или его вариант содержится в среде, нижний предел концентрации фибронектина или его варианта может быть не менее 10 нг/мл, предпочтительно не менее 100 нг/мл, а верхний предел может быть не более 10 000 мкг/мл, предпочтительно не более 1000 μг/мл.

[0232] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-7 в среде, используемой для получения клеточной популяции, содержащей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, составляет от около 1 нг/мл до 100 нг/мл, например, 1 нг/мл, 2 нг/мл, 3 нг/мл, 4 нг/мл, 5 нг/мл, 6 нг/мл, 7 нг/мл, 8 нг/мл, 9 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл или 100 нг/мл.

[0233] SDF-1 может быть коммерчески доступным, очищенным из природного сырья или полученным с помощью пептидного синтеза или методов генной инженерии. SDF-1 содержится в среде в диапазоне, например, от около 10 нг/мл до около 100 нг/мл. Кроме того, вместо SDF-1 можно использовать альтернативу SDF-1, обладающую активностью, подобной SDF-1. Примеры такой альтернативы SDF-1 включают агонист CXCR4 и низкомолекулярное соединение, обладающее активностью агониста CXCR4, и т.п., которые могут быть добавлены в среду вместо SDF-1.

[0234] В некоторых вариантах осуществления, когда SDF-1 представляет собой SDF1α, концентрация SDF-1α в среде для получения клеточной популяции, содержащей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, составляет от около 1 нМ до 100 нМ, например, 1 нМ, 2 нМ, 3 нМ, 4 нМ, 5 нМ, 6 нМ, 7 нМ, 8 нМ, 9 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ или 100 нМ.

[0235] В некоторых вариантах осуществления, когда ингибитор p38 представляет собой SB203580, концентрация SB203580 в среде для получения клеточной популяции, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, составляет от около 0,5 мкМ до 100 мкМ, например, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкм, 3 мкм, 4 мкм, 5 мкм, 6 мкм, 7 мкм, 8 мкм, 9 мкм, 10 мкм, 15 мкм, 20 мкм, 30 мкм, 40 мкм или 50 мкм, 60 мкм, 70 мкм, 80 мкМ, 90 мкМ или 100 мкМ.

[0236] В некоторых вариантах осуществления базальная среда для получения клеточной популяции, содержащей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, включает среду αMEM с добавлением около 15% ФБС, около 4 мМ L-глутамина, около 100 ед/мл пенициллина, около 100 мкг/мл стрептомицина, около 55 мкМ 2-меркаптоэтанола, около 50 мкг/мл 2-фосфата аскорбиновой кислоты, около 10 мкг/мл человеческого инсулина, около 5,5 мкг/мл человеческого трансферрина, около 6,7 нг/мл селенита натрия, около 50 нг/мл SCF, около 50 нг/мл IL-7, около 50 нг/мл Flt3L, около 100 нг/мл TPO, около 15 мкМ SB203580, около 30 нМ SDF-1α.

[0237] При получении клеточной популяции, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, гемопоэтические клетки-предшественники можно культивировать с помощью адгезивной культуры

или суспензионной культуры. В некоторых вариантах осуществления сосуд/чашка для культивирования покрыты DLL1 или DLL4, или слитым белком DLL4 или DLL1 и Fc или т.п. DLL1 или DLL4 может представлять собой рекомбинантный человеческий (rh)-DLL1 или rh-DLL4. В некоторых вариантах осуществления сосуд/чашка для культивирования покрыты химерой rh-DLL4/Fc (Sino Biological) и RetroNectin (Takara Bio Inc). В случае адгезивной культуры можно использовать сосуд для культивирования с покрытием, и/или гемопоэтические клетки-предшественники можно культивировать совместно с питающими клетками и/или т.п. Примеры питающих клеток для совместного культивирования включают линию стромальных клеток костного мозга, клетки OP9 (доступны от Riken BioResource Center). Клетки OP9 могут предпочтительно представлять собой клетки OP-DLl, которые постоянно экспрессируют DIII (Holmes R I and Zuniga-Pflucker JC. Cold Spring Harb Protoc. 2009(2)). В некоторых вариантах осуществления, в которых клетки OP9 используются в качестве питающих клеток, Dlll или слитый белок Dlll и Fc или т.п., приготовленные отдельно, могут быть добавлены в среду для проведения совместного культивирования. В некоторых вариантах осуществления Dllll может включать белки, кодируемые геном, имеющим нуклеотидную последовательность с номером доступа в NCBI NM#005618 в случае человеческих или с номером доступа в NCBI NM#007865 в случае мышиных; и встречающиеся в природе мутанты, обладающие высокой идентичностью последовательностей (например, имеющие идентичность последовательностей не менее чем 90%) с этими белками и обладающие эквивалентной функцией. В случаях, когда питающие клетки используют для получения клеточной популяции, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, питающие клетки могут быть соответствующим образом заменены в ходе культивирования. Замена питающих клеток может быть осуществлена путем переноса культивируемых испытуемых клеток на предварительно высеянные питающие клетки. Замена может производиться каждые пять дней, каждые четыре дня, каждые три дня или каждые два дня.

[0238] В некоторых вариантах осуществления температурные условия культивирования для культивирования основной массы HP-клеток для получения клеточной популяции, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, составляют от около 37°C до около 42°C и от около 37°C до около 39°C. C. В некоторых вариантах осуществления культивирование может быть проведено в условиях с низким содержанием кислорода. Примеры условий с низким содержанием кислорода включают уровни 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, а также концентрации кислорода ниже данных уровней. Период культивирования может быть соответствующим образом определен специалистами в данной области техники путем мониторинга количества различных типов клеток, включая дважды положительные по CD4/CD8 клетки и/или т.п. Примеры периода культивирования включают не менее 10 дней, не менее 12 дней, не менее 14 дней, не менее 16 дней, не менее 18 дней, не менее 20 дней, не менее 21 дня, не менее 23 дней, не менее 25 дней, не менее 28 дней, не менее 30 дней, не менее 35 дней или не менее 42 дней. В некоторых других вариантах осуществления дважды положительные по CD4/CD8 клетки, полученные в результате культивирования, представляют собой популяцию клеток, которая также содержит другие виды клеток (основная масса DP-клеток).

[0239] В случаях, когда выделяют популяцию клеток определенного типа (например, CD4-/CD8+ клеток) из популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки, выделение можно проводить с использованием любого индекса, включая, но не ограничиваясь ими, CD4, CD8, CD3 и CD45 в зависимости от типа выделяемых клеток. Способом выделения может быть способ, хорошо известный специалистам в данной области техники, например, способ, в котором клетки метят определенным антителом (например, антителом к CD4, CD8, CD3 или CD45), а затем выделяют с использованием проточного

цитометра или способ, в котором клетки очищают с использованием аффинной колонки или т.п., к которой иммобилизован желаемый антиген.

Стадия индукции CD56+/CD3- клеток из популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки

[0240] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки представляют собой CD56+/CD3- иммунные клетки.

[0241] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки получают способом, включающим стадию культивирования популяции клеток, включающей дважды положительные по CD4/CD8 клетки или основную массу DP-клеток, в среде с добавлением витамина С. В некоторых вариантах осуществления среда для индукции NK используется для получения CD56+/CD3- клеток.

[0242] В некоторых вариантах осуществления среду готовят путем добавления витамина С к базальной среде, которую используют для культивирования клеток животных. Примеры базальной среды включают среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), среду 199, минимальную необходимую среду Игла (EMEM), среду αMEM, среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM), среду Хэма F12, среду RPMI 1640, среду Фишера и нейробазальную среду. (Life Technologies) и смеси двух или более из этих сред. В некоторых вариантах осуществления среда содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления среда не содержит сыворотки. При необходимости базальная среда может также содержать одно или более веществ, таких как альбумин, человеческий инсулин, человеческий трансферрин, селен или селенит натрия, жирные кислоты, микроэлементы, 2-меркаптоэтанол, тиолглицерин, липиды, аминокислоты, глутамин, заменимые аминокислоты, витамины, факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики, антиоксиданты, пировиноградная кислота, буферы, неорганические соли, цитокины.

[0243] В некоторых вариантах осуществления среда, используемая для получения CD56-положительных NK-клеток, дополнительно содержит антитело к CD3 (UCHT1) и цитокины. Примеры подходящих цитокинов включают IL-2 и IL-7.

[0244] Антитело к CD3 не ограничено, если оно специфически распознает CD3. В некоторых вариантах осуществления концентрация антитела к CD3 в среде для индукции NK составляет от около 10 нг/мл до 1000 нг/мл, например, 10 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл, 500 нг/мл, 600 нг/мл, 700 нг/мл, 800 нг/мл, 900 нг/мл или 1000 нг/мл.

[0245] В некоторых вариантах осуществления витамин С используют для получения CD56-положительных К-клеток в тех же условиях, которые описаны выше.

[0246] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 в среде для индукции NK для получения CD56-положительных NK-клеток составляет от около 1 ед/мл до 1000 ед/мл, например, около 1 ед/мл, 5 ед/мл, 10 ед/мл, 20 ед/мл, 30 ед/мл, 40 ед/мл, 50 ед/мл, 60 ед/мл, 70 ед/мл, 80 ед/мл, 90 ед/мл, 100 ед/мл, 500 ед/мл или 1000 ед/мл. В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 в среде для индукции NK для получения CD56-положительных NK-клеток составляет от около 1 нг/мл до 100 нг/мл, например, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл или 100 нг/мл.

[0247] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-7 в среде для индукции NK для получения CD56-положительных NK-клеток составляет от около 1 нг/мл до 100 нг/мл, например, 1 нг/мл, 5 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл, 30 нг/мл, 40 нг/мл, 50 нг/мл, 60 нг/мл, 70 нг/мл, 80 нг/мл, 90 нг/мл или 100 нг/мл.

[0248] В некоторых вариантах осуществления температурные условия культивирования для культивирования популяции, содержащей дважды положительные по CD4/CD8 клетки для получения CD56-положительных NK-клеток, составляют от около 37°C до около 42°C или от около 37 до около 39°C. Период культивирования может быть надлежащим образом определен специалистами в данной области техники путем мониторинга количества CD56-положительных NK-клеток и/или т.п. Количество дней культивирования не ограничено, пока можно получить положительные по CD56 NK-клетки. Примеры периода культивирования включают по меньшей мере не менее 1 дня, не менее 2 дней, не менее 3 дней, не менее 4 дней, не менее 5 дней, не менее 6 дней или не менее 7 дней.

[0249] В некоторых вариантах осуществления полученные CD56+ NK-клетки могут быть выделены перед дальнейшим применением. В некоторых других вариантах осуществления полученные положительные по CD56 NK-клетки можно использовать в качестве клеточной популяции, которая также содержит другие виды клеток, включая Т-клетки (основная масса NK-клеток).

[0250] В некоторых вариантах осуществления основная масса NK-клеток может включать 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90% или более 90% NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления основная масса NK-клеток включает около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления основная масса NK-клеток включает около 75% CD56+/CD3- NK-клеток и около 25% CD56+/CD3+ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления основная масса NK-клеток может также включать В-клетки и моноциты.

[0251] В случаях, когда выделяют CD56+ NK-клетки, способом выделения может быть способ, хорошо известным специалистам в данной области техники, например, способ, в котором клетки метят антителом к CD56 и антителом к CD3, а затем выделяют с использованием проточного цитометра (флуоресцентно-активированная сортировка клеток) или способом, в котором клетки очищают с использованием аффинной колонки или т.п., к которой иммобилизован желаемый антиген.

[0252] В некоторых вариантах осуществления положительные по CD56 NK-клетки представляют собой CD56+/CD3+ клетки. В некоторых вариантах осуществления положительные по CD56 NK-клетки представляют собой CD56+/CD3- клетки.

Получение CAR-NK-клеток

[0253] В некоторых вариантах осуществления изобретения NK-клетки сконструированы таким образом, чтобы они включали один или более трансгенов. Например, NK-клетки могут быть генетически модифицированы для экспрессии нацеленных на опухоль химерных антигенных рецепторов (CAR), что позволяет получать противоопухолевые эффекторные клетки. В одном примере NK-клетка или iPS NK-клетка может быть сконструирована для экспрессии CAR. В некоторых вариантах осуществления клетка-предшественник NK-клетки сконструирована для экспрессии CAR. Например, в некоторых вариантах осуществления iPS-клетка сконструирована для экспрессии CAR. В некоторых вариантах осуществления клетки в основной массе HP-клеток сконструированы для экспрессии CAR. В некоторых вариантах осуществления изобретения NK-клетка сконструирована для экспрессии CAR. Более того, в некоторых вариантах осуществления изобретения эти трансгенные рецепторы могут быть нацелены на опухолеассоциированные антигены, которые не являются производными белка. В определенных вариантах

осуществления NK-клетки или iPS NK-клетки модифицируют так, чтобы они включали по меньшей мере один CAR. В некоторых вариантах осуществления один CAR нацелен на два или более антигенов.

[0254] В некоторых вариантах осуществления iNK-клетки включают рецептор, который является химерным, неприродным и сконструированным. В некоторых вариантах осуществления химерный антигенный рецептор (CAR) имеет один, два, три, четыре или более компонентов, и в некоторых вариантах осуществления один или более компонентов способствуют нацеливанию или связыванию лимфоцита с одной или более раковыми клетками, содержащими опухолевый антиген.

[0255] В некоторых вариантах осуществления CAR обычно содержит по меньшей мере один трансмембранный полипептид, включающий по меньшей мере один внеклеточный лиганд-связывающий домен, и один трансмембранный полипептид, включающий по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен; таким образом, полипептиды объединяются вместе, образуя химерный антигенный рецептор.

[0256] Термин «внеклеточный лиганд-связывающий домен» в контексте данного документа, определяется как олиго- или полипептид, способный связывать лиганд. Предпочтительно, домен будет способен взаимодействовать с молекулой клеточной поверхности. Например, внеклеточный лиганд-связывающий домен может быть выбран для распознавания лиганда, который действует как маркер клеточной поверхности на клетках-мишенях, связанных с конкретным болезненным состоянием.

[0257] В частности, внеклеточный лиганд-связывающий домен может содержать антигенсвязывающий домен, полученный из антитела против антигена-мишени.

[0258] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки или iPS NK-клетки могут быть генетически модифицированы для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный лиганд-связывающий домен, нацеленный на опухолевый антиген, выбранный из одного или более из следующих: CD44, CD19, CD20, CD22, CD23, CD30, CD89, CD123, CS-1, ROR1, мезотелина, c-Met, PSMA, Her2, GD-2, CEA, MAGE A3 TCR, EGFR, HER2/ERBB2/neu, EPCAM, EphA2, CEA, BCMA. В некоторых вариантах осуществления опухолевый антиген представляет собой CD19.

[0259] В некоторых вариантах осуществления внеклеточный лиганд-связывающий домен представляет собой фрагмент одноцепочечного антитела (scFv), содержащий вариабельный фрагмент легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей моноклонального антитела, специфичного к целевому антигену, соединенные гибким линкером.

[0260] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит трансмембранный домен. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен дополнительно содержит стебельную область между внеклеточным лиганд-связывающим доменом и трансмембранным доменом. В контексте данного документа термин «стеблевая область», как правило, означает любой олиго- или полипептид, функция которого заключается в связывании трансмембранного домена с внеклеточным лиганд-связывающим доменом. В частности, стеблевая область используется для обеспечения большей гибкости и доступности внеклеточного лиганд-связывающего домена. Стеблевая область может содержать до 300 аминокислот, от 10 до 100 аминокислот и/или от 25 до 50 аминокислот. Стеблевая область может быть получена из всех или части встречающихся в природе молекул, например, из всей или части внеклеточной области CD8, CD4 или CD28, или из всей или части константной области антитела. Альтернативно, стеблевая область может представлять собой синтетическую последовательность, которая соответствует встречающейся в природе

последовательности стебля, или может быть полностью синтетической последовательностью стебля. В предпочтительном варианте осуществления указанная стеблевая область является частью альфа-цепи CD8 человека.

[0261] В некоторых вариантах осуществления CAR содержит домен, передающий сигнал, или внутриклеточный сигнальный домен, который способствует внутриклеточной передаче сигнала после связывания внеклеточного лиганд-связывающего домена с мишенью, что приводит к активации iPS NK-клеток и иммунному ответу. Термин «домен, передающий сигнал» относится к части белка, которая передает сигнал эффекторной сигнальной функции и направляет клетку на выполнение специализированной функции. В некоторых вариантах осуществления iPS NK-клетки имеют CAR, который включает домен, передающий сигнал.

[0262] В некоторых вариантах осуществления iPS NK-клетки подвергаются генетической модификации для экспрессии комплекса IL-15Rα/IL-15.

[0263] В некоторых вариантах осуществления трансмембранные полипептиды обладают способностью экспрессироваться на поверхности иммунной клетки, например, на iPS NK-клетках, и взаимодействовать друг с другом для направления клеточного ответа иммунной клетки против заданной клетки-мишени. Различные трансмембранные полипептиды CAR, содержащие внеклеточный домен, связывающий лиганд, и/или домен, передающий сигнал, взаимодействуют друг с другом, чтобы принять участие в сигнальной трансдукции после связывания с лигандом-мишенью и вызвать иммунный ответ. Трансмембранный домен может быть получен либо из природного, либо из синтетического источника. Трансмембранный домен может быть получен из любого мембраносвязанного или трансмембранного белка.

[0264] В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация NK-клеток для экспрессии CAR может включать стадии: (1) синтеза гена, соответствующего конкретному CAR; (2) подготовки вектора, содержащего ген, соответствующий CAR; и (3) трансдукции CD56+ NK-клеток вектором, содержащим ген CAR.

[0265] Экспрессионные векторы, кодирующие CAR, могут быть введены в виде одной или более молекул ДНК или конструкций, где может присутствовать по меньшей мере один маркер, позволяющий отбирать клетки-хозяева, содержащие конструкцию(-и).

[0266] Конструкции могут быть получены обычными способами, при этом гены и регуляторные области могут быть выделены соответствующим образом, лигированы, клонированы в подходящем клонирующем хозяине, проанализированы путем рестрикции или секвенирования или другими удобными способами. В частности, с помощью ПЦР могут быть выделены отдельные фрагменты, включающие всю функциональную единицу или ее части, где одна или более мутаций могут быть введены с использованием «репарации праймеров», лигирования, мутагенеза in vitro и т.д., в зависимости от ситуации. После завершения и демонстрации наличия соответствующих последовательностей конструкция(-и) может (могут) быть введена(-ы) в CTL любым удобным способом. Конструкции могут быть интегрированы и упакованы в нереплицирующиеся дефектные вирусные геномы, такие как аденовирус, аденоассоциированный вирус (AAV) или вирус простого герпеса (HSV) или другие, включая ретровирусные векторы или лентивирусные векторы, для инфицирования или трансдукции в клетки. При желании конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы конструкция может быть введена путем слияния, электропорации, биолиза, трансфекции, липофекции и т.п. Клетки-хозяева можно выращивать и размножать в культуре до введения конструкции(-ий) с последующей соответствующей обработкой для

введения конструкции(-ий) и интеграции конструкции(-ий). Затем клетки размножают и подвергают скринингу с помощью маркера, присутствующего в конструкции. Различные маркеры, которые могут быть успешно использованы, включают hprt, устойчивость к неомицину, тимидинкиназу, устойчивость к гигромицину и т. д.

[0267] В некоторых случаях может иметься сайт-мишень для гомологичной рекомбинации, когда желательно, чтобы конструкция была интегрирована в конкретный локус. Например, может нокаутировать эндогенный ген и заменить его (в том же локусе или в другом месте) геном, кодируемым конструкцией, с использованием материалов и способов, известных в данной области техники для гомологичной рекомбинации. Для гомологичной рекомбинации можно использовать либо OMEGA, либо О-векторы.

[0268] Конструкции могут быть введены в виде одной молекулы ДНК, кодирующей по меньшей мере CAR и необязательно другой ген, или различных молекул ДНК, имеющих один или более генов. Другие гены включают, например, гены, кодирующие терапевтические молекулы или саморазрушающиеся гены. Конструкции можно вводить одновременно или последовательно, каждую с одинаковыми или разными маркерами.

[0269] Векторы, содержащие полезные элементы, такие как бактериальные или дрожжевые точки начала репликации, селектируемые и/или амплифицируемые маркеры, промоторные/энхансерные элементы для экспрессии в прокариотах или эукариотах ит. д., которые можно использовать для подготовки запасов ДНК-конструкций для проведения трансфекции, хорошо известны в данной области техники, и многие из них являются коммерчески доступными.

Способы применения

[0270] Клетки по изобретению можно использовать для лечения рака, вирусных инфекций или аутоиммунных заболеваний у нуждающихся в этом пациентов. В другом варианте осуществления указанная выделенная клетка по изобретению может быть использована при производстве лекарственного средства для лечения рака, вирусных инфекций или аутоиммунных заболеваний у нуждающегося в этом пациента.

[0271] Данное изобретение относится к способам лечения нуждающихся в этом пациентов, причем способ включает по меньшей мере один из следующих стадий: (a) обеспечение клеток химерного антигенного рецептора по изобретению и (b) введение клеток указанному пациенту.

[0272] Указанное лечение может носить облегчающий, излечивающий или профилактический характер. Оно может быть либо частью аутологичной иммунотерапии, либо частью аллогенной иммунотерапии. Под аутологичным подразумевается, что клетки, клеточная линия или популяция клеток, используемые для лечения пациентов, происходят от указанного пациента или от донора, совместимого с человеческим лейкоцитарным антигеном (HLA). Под аллогенным подразумевается, что клетки или популяция клеток, используемых для лечения пациентов, происходят не от указанного пациента, а от донора.

[0273] В некоторых вариантах осуществления описанные клетки являются аллогенными. В некоторых вариантах осуществления описанные клетки являются аутологичными.

[0274] Лечение может быть использовано для лечения пациентов с диагнозом рак, вирусная инфекция, аутоиммунные заболевания или болезнь «трансплантат против хозяина» (БТПХ). К видам рака, которые можно лечить, относятся опухоли, которые не васкуляризированы или еще не в значительной степени васкуляризированы, а также васкуляризированные опухоли. Такие виды рака могут включать несолидные опухоли (такие как гематологические опухоли, например, лейкозы и лимфомы) или могут включать солидные опухоли. Виды рака, подлежащие лечению с помощью CAR по изобретению, включают, но не

ограничиваются ими, карциному, бластому и саркому, а также некоторые лейкозы или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Также включены опухоли/раковые заболевания у взрослых и опухоли/раковые заболевания у детей.

[0275] В некоторых вариантах осуществления лечение проводится в комбинации с одним или более видами противораковой терапии, выбранными из группы, состоящей из терапии антителами, химиотерапии, терапии цитокинами, терапии дендритными клетками, генной терапии, гормональной терапии, лазерной светотерапии и лучевой терапии.

[0276] В некоторых вариантах осуществления указанное лечение можно назначать пациентам, проходящим иммуносупрессивное лечение.

[0277] В дополнительном варианте осуществления клеточные композиции вводятся пациенту в комбинации с одним или более дополнительными видами терапии. Например, в некоторых вариантах осуществления клеточные композиции вводят пациенту в сочетании (например, до, одновременно или после) трансплантации костного мозга, абляционной Т-клеточной терапии с применением химиотерапевтических средств, таких как флударабин, дистанционная лучевая терапия (XRT), циклофосфамид или антитела, такие как OKT3 или CAM PATH. В другом варианте осуществления клеточные композиции по данному изобретению вводят после В-клетчной абляционной терапии, например, средствами, которые вступают в реакцию с CD20, например, ритуксаном. Например, в одном варианте осуществления субъекты могут подвергаться стандартному лечению высокодозной химиотерапией с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных вариантах осуществления после трансплантации субъекты получают инфузию размноженных иммунных клеток по настоящему изобретению. В дополнительном варианте осуществления размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства. Указанные модифицированные клетки, полученные любым из описанных в данном документе способов, могут быть использованы в конкретном аспекте изобретения для лечения от отторжения «хозяин против трансплантата» (HvG) и болезни «трансплантат против хозяина» (GvHD) нуждающихся в этом пациентов; поэтому в объем настоящего изобретения входит способ лечения от отторжения «хозяин против трансплантата» (HvG) и болезни «трансплантат против хозяина» (GvHD) нуждающихся в этом пациентов, включающий лечение указанного пациента путем введения указанному пациенту эффективного количества модифицированных клеток, содержащих инактивированные гены TCR альфа и/или TCR бета.

Введение клеток

[0278] В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть введены в организм-хозяин, например, млекопитающему в самых разных формах. В определенных вариантах осуществления клетки могут быть введены в место расположения опухоли, хотя в альтернативных вариантах осуществления изобретения клетки нацеливают на раковую опухоль или модифицируют для нацеливания на раковую опухоль. Количество используемых клеток будет зависеть от ряда обстоятельств, цели введения, продолжительности жизни клеток, применяемого протокола, например, количества введений, способности клеток к размножению, стабильности рекомбинантной конструкции и т.п. Клетки можно применять в виде дисперсии, как правило, путем инъекции в представляющее интерес место или рядом с ним. Клетки могут находиться в физиологически приемлемой среде. В одном примере NK-клетки или iPS NK-клетки по настоящему изобретению могут экспрессировать один или более CAR, TCR или любой другой сконструированный белковый или полипептидный домен, такой как высокоаффинный CD16. В некоторых вариантах

осуществления клетки инкапсулируют для ингибирования иммунного распознавания и размещают в месте локализации опухоли.

[0279] Клетки могут быть введены желаемым образом. В зависимости от желаемого ответа, способа введения, продолжительности жизни клеток, количества присутствующих клеток могут применяться различные протоколы. Количество введений будет зависеть, по меньшей мере частично, от описанных выше факторов.

[0280] Введение клеток или популяции клеток по настоящему изобретению можно осуществлять любым удобным способом, включая аэрозольную ингаляцию, инъекцию, прием внутрь, переливание, имплантацию или трансплантацию. Композиции, описанные в данном документе, можно вводить пациенту подкожно, внутрикожно, внутриопухолево, интранодально, интрамедуллярно, внутримышечно, путем внутривенной или внутрилимфатической инъекции или внутрибрюшинно. В одном варианте осуществления клеточные композиции по настоящему изобретению предпочтительно вводят путем внутривенной инъекции.

Системы экспрессии на основе нуклеиновых кислот

[0281] В некоторых вариантах осуществления NK-клетки или iPS NK-клетки по изобретению сконструированы для экспрессии одного или более CAR, TCR или любого другого сконструированного белкового или полипептидного домена, такого как высокоаффинный CD16 или CD19. Рекомбинантные методы создания экспрессионных векторов, содержащих эти полипептиды, хорошо известны в данной области техники и в целом описаны ниже.

Векторы

[0282] Термин «вектор» используется для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты носителя, в которую может быть вставлена последовательность нуклеиновой кислоты для введения в клетку, где она может реплицироваться. Последовательность нуклеиновой кислоты может быть «экзогенной», что означает, что она является чужеродной для клетки, в которую вводится вектор, или что данная последовательность является гомологичной последовательности в клетке, но находится в положении внутри нуклеиновой кислоты клетки-хозяина, в котором последовательность обычно не обнаруживается. Векторы включают плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, YAC). Специалист в данной области должен быть хорошо подготовлен для конструирования вектора с помощью стандартных рекомбинантных методов (см., например, Maniatis et al., 1988 и Ausubel et al., 1994, оба включены в данный документ посредством ссылки).

[0283] Термин «экспрессионный вектор» относится к любому типу генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК, способную к транскрипции. В некоторых случаях молекулы РНК затем транслируются в белок, полипептид или пептид. В других случаях эти последовательности не транслируются, например, при продукции антисмысловых молекул или рибозимов. Экспрессионные векторы могут содержать множество «регулирующих последовательностей», которые относятся к последовательностям нуклеиновых кислот, необходимым для транскрипции и, возможно, трансляции функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной клетке-хозяине. В дополнение к регулирующим последовательностям, которые регулируют транскрипцию и трансляцию, векторы и экспрессионный векторы могут содержать последовательности нуклеиновых кислот, которые также выполняют другие функции и описаны ниже.

Промоутеры и энхансеры

[0284] «Промотор» представляет собой регулирующую последовательность, которая представляет собой область последовательности нуклеиновой кислоты, в которой происходит регуляция инициации и скорости транскрипции. Он может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции, чтобы инициировать специфическую транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты. Фразы «функционально расположенный», «функционально связанный», «под контролем» и «под транскрипционным контролем» означают, что промотор находится в правильном функциональном положении и/или ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, чтобы контролировать инициацию транскрипции и/или экспрессию этой последовательности.

[0285] Промотор обычно содержит последовательность, которая служит для позиционирования сайта инициации синтеза РНК. Наиболее известным примером этого является ТАТА-бокс, но в некоторых промоторах, не имеющих ТАТА-бокса, таких как, например, промотор гена терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы млекопитающих и промотор поздних генов SV40, дискретный элемент перекрывает сам сайт инициации, что помогает зафиксировать место инициации. Дополнительные промоторные элементы регулируют частоту инициации транскрипции. Как правило, они расположены в области на 30–110 п. о. выше сайта инициации, хотя было продемонстрировано, что ряд промоторов также содержит функциональные элементы ниже сайта инициации. Чтобы поставить кодирующую последовательность «под контроль» промотора, необходимо расположить 5'-конец сайта инициации транскрипции рамки считывания транскрипции «ниже» (т.е. на 3'-конце) выбранного промотора. Расположенный «выше» промотор стимулирует транскрипцию ДНК и способствует экспрессии кодируемой РНК.

[0286] Интервал между элементами промотора часто бывает изменчивым, так что функция промотора сохраняется, когда элементы инвертируются или перемещаются относительно друг друга. В промоторе ТК интервал между элементами промотора можно увеличить до 50 п. о., прежде чем активность начнет снижаться. В зависимости от промотора оказывается, что отдельные элементы могут функционировать либо совместно, либо независимо для активации транскрипции. Промотор может использоваться или не использоваться в сочетании с «энхансером», который относится к цис-действующей регуляторной последовательности, участвующей в активации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты.

[0287] Промотор может быть естественным образом ассоциирован с последовательностью нуклеиновой кислоты, которую можно получить путем выделения 5 основных некодирующих последовательностей, расположенных выше кодирующего сегмента и/или экзона. Такой промотор можно назвать «эндогенным». Аналогично, энхансер может быть естественным образом ассоциирован с последовательностью нуклеиновой кислоты, расположенной либо ниже, либо выше этой последовательности. В качестве альтернативы, определенные преимущества будут получены путем помещения кодирующего сегмента нуклеиновой кислоты под контроль рекомбинантного или гетерологичного промотора, который относится к промотору, который обычно не связан с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Рекомбинантный или гетерологичный энхансер также относится к энхансеру, обычно не связанному с последовательностью нуклеиновой кислоты в ее естественном окружении. Такие промоторы или энхансеры могут включать промоторы или энхансеры других генов, промоторы или энхансеры, выделенные из любого другого вируса, прокариотической или эукариотической клетки, а также не «встречающиеся в природе» промоторы или энхансеры, т.е. содержащие различные элементы различных транскрипционных регуляторных областей, и/или мутации, изменяющие экспрессию. Например, промоторы,

которые наиболее часто используются при конструировании рекомбинантной ДНК, включают системы промоторов лактамазы (пенициллиназы), лактозы и триптофана (trp). В дополнение к получению последовательностей нуклеиновых кислот промоторов и энхансеров синтетическим путем, последовательности могут быть получены с использованием технологий рекомбинантного клонирования и/или амплификации нуклеиновых кислот, включая ПЦР™, в связи с раскрытыми в данном документе композициями (см. патенты США № 4,683,202 и 5,928,906, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки). Кроме того, предполагается также использование регулирующих последовательностей, которые регулируют транскрипцию и/или экспрессию последовательностей в неядерных органеллах, таких как митохондрии, хлоропласты и т.п.

[0288] Естественно, будет важно использовать промотор и/или энхансер, который эффективно направляет экспрессию сегмента ДНК в органелле, типе клеток, ткани, органе или организме, выбранных для экспрессии. Специалистам в области молекулярной биологии, как правило, известно применение промоторов, энхансеров и комбинаций типов клеток для экспрессии белка (см., например, Sambrook et al. 1989, включенный в данный документ посредством ссылки). Применяемые промоторы могут быть конститутивными, тканеспецифичными, индуцируемыми и/или применимыми в соответствующих условиях для направления высокого уровня экспрессии введенного сегмента ДНК, что является преимуществом при крупномасштабном производстве рекомбинантных белков и/или пептидов. Промотор может быть гетерологичным или эндогенным.

[0289] Кроме того, для управления экспрессией также можно использовать любую комбинацию промотора/энхансера. Использование системы цитоплазматической экспрессии T3, T7 или SP6 является другим возможным вариантом осуществления. Эукариотические клетки могут поддерживать цитоплазматическую транскрипцию с определенных бактериальных промоторов при наличии соответствующей бактериальной полимеразы, либо в составе комплекса доставки, либо в качестве дополнительной генетической экспрессионной конструкции.

[0290] Идентичность тканеспецифических промоторов или элементов, а также анализы для характеристики их активности хорошо известны специалистам в данной области техники.

[0291] Для эффективной трансляции кодирующих последовательностей также может потребоваться специфический сигнал инициации. Эти сигналы включают инициирующий кодон ATG или соседние последовательности. Возможно, потребуется предоставить экзогенные сигналы регуляции трансляции, включая кодон инициации ATG. Специалист в данной области техники легко сможет это определить и предоставить необходимые сигналы.

[0292] В определенных вариантах осуществления использование элементов внутренних сайтов посадки рибосом (IRES) используется для создания мультигенных или полицистронных сообщений, и они могут быть использованы в изобретении.

[0293] Векторы могут включать сайт множественного клонирования (MCS), который представляет собой область нуклеиновой кислоты, содержащую несколько сайтов рестрикционных ферментов, любой из которых можно использовать в сочетании со стандартной рекомбинантной технологией для расщепления вектора. «Расщепление рестрикционными ферментами » относится к каталитическому расщеплению молекулы нуклеиновой кислоты ферментом, который функционирует только в определенных местах молекулы нуклеиновой кислоты. Многие из этих рестрикционных ферментов являются коммерчески доступными. Использование таких ферментов широко известно специалистам в данной области техники. Часто вектор линеаризуют или фрагментируют с использованием рестрикционного фермента, который делает

надрез в MCS, чтобы позволить лигировать экзогенные последовательности с вектором. «Лигирование» относится к процессу образования фосфодиэфирных связей между двумя фрагментами нуклеиновой кислоты, которые могут быть или не быть смежными друг с другом. Методы, включающие рестрикционные ферменты и реакции лигирования, хорошо известны специалистам в области рекомбинантных технологий.

[0294] Также могут быть использованы сайты сплайсинга, сигналы терминации, точки начала репликации и селектируемые маркеры.

Плазмидные векторы

[0295] В определенных вариантах осуществления предполагается использование плазмидного вектора для трансформации клетки-хозяина. Как правило, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, полученные из видов, совместимых с клеткой-хозяином, используются в связи с этими хозяевами. Вектор обычно несет сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечивать фенотипический отбор в трансформированных клетках. В качестве неограничивающего примера E.coli часто трансформируют с использованием производных pBR322, плазмиды, полученной из вида E.coli. pBR322 содержит гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину и, таким образом, предоставляет простые средства для идентификации трансформированных клеток. Плазмида pBR или другая микробная плазмида или фаг также должны содержать или быть модифицированными для содержания, например, промоторов, которые могут быть использованы микробным организмом для экспрессии его собственных белков.

[0296] Кроме того, фаговые векторы, содержащие репликон и регулирующие последовательности, которые совместимы с микроорганизмом-хозяином, могут быть использованы в качестве трансформирующих векторов в связи с этими хозяевами. Например, фаг лямбда GEM.TM. 11, можно использовать для создания рекомбинантного фагового вектора, который можно использовать для трансформации клеток-хозяев, таких как, например, E. coli LE392.

[0297] Другие применимые плазмидные векторы включают векторы pIN (Inouye et al., 1985); и векторы pGEX для применения в создании растворимых слитых белков глутатион-S-трансферазы (GST) для последующей очистки и разделения или расщепления. Другими подходящими слитыми белками являются белки с галактозидазой, убиквитином и т.п.

[0298] Бактериальные клетки-хозяева, например E.coli, включающие экспрессионный вектор, выращивают в любой из ряда подходящих сред, например, LB. Экспрессия рекомбинантного белка в определенных векторах может быть индуцирована, как это будет понятно специалистам в данной области техники, путем введения клетки-хозяина в контакт со средством, специфичным для определенных промоторов, например, путем добавления IPTG в среды или перевода инкубации на более высокую температуру. После культивирования бактерий в течение дополнительного периода, как правило, от 2 до 24 часов, клетки собирают путем центрифугирования и промывают для удаления остаточной среды.

Вирусные векторы

[0299] Способность некоторых вирусов инфицировать клетки или проникать в клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, а также интегрироваться в геном клетки-хозяина и стабильно и эффективно экспрессировать вирусные гены сделала их привлекательными кандидатами для переноса чужеродных нуклеиновых кислот в клетки (например, клетки млекопитающих). Компоненты по настоящему изобретению могут представлять собой вирусный вектор, который кодирует один или более CAR, TCR или любой другой сконструированный белковый или полипептидный домен, такой как высокоаффинный CD16

по настоящему изобретению. Ниже описаны неограничивающие примеры вирусных векторов, которые можно использовать для доставки нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Аденовирусные векторы

[0300] Конкретный способ доставки нуклеиновой кислоты включает применение аденовирусного экспрессионного вектора. Хотя известно, что аденовирусные векторы обладают низкой способностью к интеграции в геномную ДНК, эта особенность уравновешивается высокой эффективностью переноса генов, обеспечиваемой этими векторами. Подразумевается, что «аденовирусный экспрессионный вектор» включает те конструкции, которые содержат последовательности аденовируса, достаточные для (a) поддержки упаковки конструкции и (b) для конечной экспрессии ткане- или клеточно-специфичной конструкции, которая была клонирована в нем. Знание генетической организации аденовируса, линейного двухцепочечного ДНК-вируса длиной 36 т.п.н., позволяет замещать большие фрагменты аденовирусной ДНК чужеродными последовательностями до 7 т.п.н. (Grunhaus and Horwitz, 1992).

Векторы AAV

[0301] Нуклеиновая кислота может быть введена в клетку посредством трансфекции с помощью аденовируса. Сообщалось о повышении эффективности трансфекции в клеточных системах с использованием систем, связанных с аденовирусом (Kelleher and Vos, 1994; Cotten et al., 1992; Curiel, 1994). Аденоассоциированный вирус (AAV) представляет собой привлекательную векторную систему для применения в клетках по настоящему изобретению, поскольку он имеет высокую частоту интеграции и может инфицировать неделящиеся клетки, что делает его полезным для доставки генов в клетки млекопитающих, например, в культуре тканей (Muzyczka, 1992) или in vivo. AAV имеет широкий спектр хозяев для заражения (Tratschin et al., 1984; Laughlin et al., 1986; Lebkowski et al., 1988; McLaughlin et al., 1988). Подробности, касающиеся создания и применения векторов rAAV, описаны в патентах США № 5 139 941 и 4 797 368, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки.

Ретровирусные векторы

[0302] Ретровирусы применимы в качестве векторов для доставки благодаря их способности интегрировать свои гены в геном хозяина, переносить большое количество чужеродного генетического материала, заражать широкий спектр видов и типов клеток и быть упакованными в специальные клеточные линии (Miller, 1992).

[0303] Чтобы сконструировать ретровирусный вектор, нуклеиновую кислоту (например, кодирующую желаемую последовательность) встраивают в вирусный геном вместо определенных вирусных последовательностей, чтобы получить вирус, дефектный по репликации. Для получения вирионов создается линия упаковочных клеток, содержащая гены gag, pol и env, но не содержащая LTR и компонентов упаковки (Mann et al., 1983). Когда рекомбинантную плазмиду, содержащую кДНК, вместе с LTR ретровируса и упаковочными последовательностями, вводят в специальную клеточную линию (например, путем осаждения фосфатом кальция), упаковочная последовательность позволяет упаковывать РНК-транскрипт рекомбинантной плазмиды в вирусные частицы, которые затем секретируются в питательную среду (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann et al., 1983). Среду, содержащую рекомбинантные ретровирусы, затем собирают, необязательно концентрируют и используют для переноса генов. Ретровирусные векторы способны инфицировать широкий спектр типов клеток. Однако для интеграции и стабильной экспрессии требуется деление клеток-хозяев (Paskind et al., 1975).

[0304] Лентивирусы представляют собой сложные ретровирусы, которые, помимо общих ретровирусных генов gag, pol и env, содержат другие гены с регуляторной или структурной функцией.

Лентивирусные векторы хорошо известны в данной области техники (см., например, Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; патенты США № 6 013 516 и 5 994 136). Некоторые примеры лентивирусов включают вирусы иммунодефицита человека: ВИЧ-1, ВИЧ-2 и вирус иммунодефицита обезьян: SIV. Лентивирусные векторы были созданы путем множественной аттенуации генов вирулентности ВИЧ, например, гены env, vif, vpr, vpu и nef были удалены, что делает вектор биологически безопасным.

[0305] Рекомбинантные лентивирусные векторы способны инфицировать неделящиеся клетки и могут использоваться для переноса генов как in vivo, так и ex vivo, а также для экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот. Например, рекомбинантный лентивирус, способный заражать неделящуюся клетку, когда подходящая клетка-хозяин трансфицируется двумя или более векторами, несущими функции упаковки, а именно gag, pol и env, а также rev и tat, описан в патенте США № 5 994 136, который включен в данный документ посредством ссылки. Можно нацелить рекомбинантный вирус путем связывания оболочечного белка с антителом или конкретным лигандом для нацеливания на рецептор определенного типа клеток. Если, например, вставить в вирусный вектор представляющую интерес последовательность (включая регуляторную область) вместе с другим геном, который кодирует лиганд для рецептора на конкретной клетке-мишени то вектор становится специфичным для данной мишени.

Комбинированная терапия

[0306] В определенных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению для клинических аспектов комбинируют с другими средствами, эффективными при лечении гиперпролиферативного заболевания, такими как противораковые средства. «Противораковое» средство способно негативно влиять на рак у субъекта, например, за счет уничтожения раковых клеток, индуцирования апоптоза в раковых клетках, снижения скорости роста раковых клеток, снижения частоты появления или количества метастазов, уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, снижения кровоснабжения опухоли или раковых клеток, стимулирования иммунного ответа против раковых клеток или опухоли, предотвращения или ингибирования прогрессирования рака или увеличения продолжительности жизни страдающего раком субъекта. В более общем смысле эти другие композиции могут обеспечиваться в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения или ингибирования пролиферации клетки. Данный процесс может включать приведение раковых клеток в контакт с экспрессионной конструкцией и средством(-ами) или несколькими факторами одновременно. Это может быть достигнуто путем приведения клетки в контакт с одной композицией или фармакологическим составом, включающим оба средства, или приведения клетки в контакт с двумя различными композициями или составами одновременно, причем одна композиция включает экспрессирующую конструкцию, а другая включает второе средство.

[0307] Резистентность опухолевых клеток к химио- и радиотерапевтическим средствам представляет серьезную проблему в клинической онкологии. Одной из целей текущих исследований рака является поиск способов повышения эффективности химио- и лучевой терапии путем их сочетания с другими методами лечения. В контексте настоящего изобретения предполагается, что клеточную терапию можно применять аналогичным образом в сочетании с химиотерапевтическим, радиотерапевтическим или иммунотерапевтическим вмешательством, а также со средствами, регулирующими апоптоз или клеточный цикл.

[0308] В альтернативном варианте терапия может проводиться до или после лечения другим средством с интервалами, варьирующимися от минут до недель. В вариантах осуществления, в которых другое средство и настоящее изобретение применяются к человеку по отдельности, как правило, необходимо

обеспечить, чтобы между каждой доставкой не проходило значительного периода времени, что позволит средству и терапии по изобретению оказывать благоприятное комбинированное воздействие на клетку. В таких случаях предполагается, что можно осуществлять приведение в контакт с клеткой обоими способами с интервалом около 12-24 часов и, более предпочтительно, с интервалом около 6-12 часов. Однако в некоторых ситуациях может быть желательно значительно увеличить период лечения, когда между соответствующими введениями проходит от нескольких дней (2, 3, 4, 5, 6 или 7) до нескольких недель (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

[0309] В некоторых вариантах осуществления циклы лечения повторяют по мере необходимости. Также предполагается, что различные стандартные методы лечения, а также хирургическое вмешательство могут применяться в сочетании с клеточной терапией по изобретению.

Химиотерапия

[0310] К методам лечения рака также относятся различные комбинированные методы лечения, включающие как применение химиотерапии, так и облучения. К комбинированным химиотерапевтическим препаратам относятся, например, абраксан, алтретамин, доцетаксел, герцептин, метотрексат, новантрон, золадекс, цисплатин (CDDP), карбоплатин, прокарбазин, мехлоретамин, циклофосфамид, камптотецин, ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, нитрозуреа, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, блеомицин, пликомицин, митомицин, этопозид (VP16), тамоксифен, ралоксифен, средства, связывающие рецепторы эстрогена, таксол, гемцитабиен, навельбин, ингибиторы фарнезил-протеинтансферазы, трансплатин, 5-фторурацил, винкристин, винбластин и метотрексат, или любой аналог или производный вариант вышеперечисленного, а также их комбинации.

[0311] В конкретных вариантах осуществления химиотерапия для индивидуума применяется в сочетании с препаратом по изобретению, например, до, во время и/или после введения препарата по изобретению.

Лучевая терапия

[0312] Другие факторы, вызывающие повреждение ДНК и широко используемые, включают так называемые гамма-лучи, рентгеновские лучи и/или направленную доставку радиоизотопов к опухолевым клеткам. Предусматриваются и другие формы факторов, повреждающих ДНК, такие как микроволны и УФ-облучение. Наиболее вероятно, что все эти факторы влияют на широкий спектр повреждений ДНК, предшественников ДНК, на репликацию и репарацию ДНК, а также на сборку и поддержание хромосом. Диапазон доз для рентгеновских лучей колеблется от суточных доз от 50 до 200 рентген в течение длительных периодов времени (от 3 до 4 недель) до разовых доз от 2000 до 6000 рентген. Диапазоны дозировок радиоизотопов широко варьируются и зависят от периода полураспада изотопа, активности и типа испускаемого излучения и поглощения опухолевыми клетками.

[0313] Термины «вступивший в контакт» и «подвергшийся воздействию» применительно к клетке используются в данном документе для описания процесса, с помощью которого терапевтическая конструкция и химиотерапевтическое или радиотерапевтическое средство доставляются в клетку-мишень или помещаются в непосредственное соседство с клеткой-мишенью. Для достижения клеточной гибели или стаза оба средства доставляются в клетку в комбинированном количестве, эффективном для уничтожения клетки или предотвращения ее деления.

Иммунотерапия

[0314] Иммунотерапевтические средства обычно основаны на применении иммунных эффекторных клеток и молекул для нацеливания и уничтожения раковых клеток. Иммунный эффектор может представлять собой, например, антитело, специфичное к какому-либо маркеру на поверхности опухолевой клетки. Само по

себе антитело может служить эффектором терапии или оно может привлекать другие клетки для фактического уничтожения клеток. Антитело также может быть конъюгировано с лекарственным средством или токсином (химиотерапевтическим, радионуклидом, цепью рицина А, холерным токсином, коклюшным токсином и т.д.) и служить только в качестве нацеливающего средства. В качестве альтернативы эффектор может представлять собой лимфоцит, несущий поверхностную молекулу, которая напрямую или опосредовано взаимодействует с опухолевой клеткой-мишенью. Различные эффекторные клетки включают цитотоксические Т-клетки и NK-клетки.

[0315] Таким образом, иммунотерапия, отличная от описанной в данном документе терапии по изобретению, может применяться как часть комбинированной терапии в сочетании с клеточной терапией по настоящему изобретению. Ниже рассматривается общий подход к комбинированной терапии. Как правило, опухолевая клетка должна нести какой-либо маркер, поддающийся нацеливанию, т. е. отсутствующий на большинстве других клеток. Существует множество онкомаркеров, и любой из них может подходить для нацеливания в контексте настоящего изобретения. Общие опухолевые маркеры включают PD-1, PD-L1, CTLA4, карциноэмбриональный антиген, простатспецифический антиген, антиген, ассоциированный с опухолью мочевыводящих путей, фетальный антиген, тирозиназу (p97), gp68, TAG-72, HMFG, сиалиловый антиген Льюиса, MucA, MucB, PLAP, рецептор эстрогена, рецептор ламинина, erb B и p155.

Гены

[0316] В еще одном варианте осуществления вторичное лечение представляет собой генную терапию, при которой терапевтический полинуклеотид вводят до, после или одновременно с клиническими вариантами осуществления настоящего изобретения. Изобретение охватывает множество продуктов экспрессии, включая индукторы клеточной пролиферации, ингибиторы клеточной пролиферации или регуляторы запрограммированной гибели клеток.

Хирургическое вмешательство

[0317] Приблизительно 60% больных раком будут подвергаться хирургическому вмешательству того или иного типа, включая профилактические, диагностические или стадирующие, лечебные и паллиативные хирургические вмешательства. Хирургическое вмешательство с целью излечения представляет собой лечение рака, которое можно использовать в сочетании с другими видами лечения, такими как лечение по настоящему изобретению, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, генная терапия, иммунотерапия и/или альтернативные методы лечения.

[0318] Хирургическое вмешательство с целью излечения включает резекцию, при которой вся или часть раковой ткани физически удаляется, иссекается и/или уничтожается. Резекция опухоли относится к физическому удалению по меньшей мере части опухоли. В дополнение к резекции опухоли хирургическое лечение включает лазерную хирургию, криохирургию, электрохирургию и операцию под микроскопическим контролем (операция по методу Мооса). Кроме того, предполагается, что настоящее изобретение можно использовать в сочетании с удалением поверхностных раковых образований, предраковых состояний или случайных количеств нормальной ткани.

[0319] При иссечении части всех раковых клеток, ткани или опухоли в организме может образоваться полость. Лечение может осуществляться путем перфузии, прямой инъекции или местного нанесения на участок дополнительного противоракового средства. Такое лечение можно повторять, например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или каждые 1, 2, 3, 4 и 5 недель, или каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Эти средства также могут иметь разную дозировку.

ПРИМЕРЫ

[0320] Другие признаками объекты и преимущества настоящего изобретения очевидны из приведенных ниже примеров. Однако следует понимать, что примеры, хотя и демонстрируют варианты осуществления настоящего изобретения, приводятся только в качестве иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники из примеров.

Пример 1. Дифференцировка iPS-клеток в основную массу HP-клеток

[0321] Штамм FfI-01s04, штамм iPS-клеток, был получен из мононуклеарных клеток периферической крови здорового индивидуума. Клетки FfI-01s04, диспергированные в полной среде StemFit, были высеяны в количестве 6 x 10^5 клеток/лунку в 6-луночный планшет с ультранизкой адгезией в условиях низкого уровня кислорода (5% O_2) («день 0»). Полная среда StemFit включала 10 мкМ CHIR99021 и 50 мкМ Y-27632. На следующий день (т.е. день 1) клетки FfI-01s04 диспергировали в среду для дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников (HPC), содержащую BMP4 (50 нг/мл), VEGF (50 нг/мл), bFGF (50 нг/мл) и 2-фосфат аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл). Среда для индукции HPC включала StemPro34, добавленные человеческим инсулином (10 мкг/мл), человеческим трансферрином (5,5 мкг/мл), селенитом натрия (6,7 нг/мл), L-глутамином (2 мМ) и α-монотиоглицерином (0,4 мМ). В день 2 в культуральную среду (т.е. среду дифференцировки HPC, содержащую клетки) добавляли SB431542 (в концентрации 6 мкМ в среде), и клетки культивировали в течение 2 дней. В день 4 клетки повторно диспергировали в другую среду, содержащую VEGF (50 нг/мл), bFGF (50 нг/мл), SCF (50 нг/мл) и 2-фосфат аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл), и культивировали в течение последующих 3 дней. В день 7, клетки помещали в другую среду, содержащую VEGF (50 нг/мл), bFGF (50 нг/мл), SCF (50 нг/мл), 2-фосфат аскорбиновой кислоты (50 мкг/мл), TPO (30 нг/мл) и Flt3L (10 нг/мл), и культивировали в этой среде в течение последующих 7 дней. Среду заменяли каждые 2-3 дня в течение этого 7-дневного периода культивирования.

Пример 2. Дифференцировка основной массы HP-клеток в популяцию, состоящую из CD4/CD8 клеток

В день 14 популяцию клеток, полученную в примере 1 без выделения клеток («основная масса HP-клеток»), высевали в чашки диаметром 15 см в количестве 3,12 x 10^6 клеток/чашку и культивировали при 37°C при уровне O_2 5%. Следует отметить, что можно применять различные плотности высевания, а вышеприведенная плотность высевания является одним из вариантов осуществления. На каждую чашку диаметром 15 см наносили химеру rh-DLL4/Fc (Sino Biological) и ретронектин (Takara Bio Inc). Среду заменяли каждые 2-3 дня в течение этого периода культивирования. MEMα (Thermo Fisher Scientific (Gibco)), дополненная 15% ФБС, 4 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 55 мкМ 2-меркаптоэтанола, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты 2-фосфата, 10 мкг/мл человеческого инсулина, 5,5 мкг/мл человеческого трансферрина, 6,7 нг/мл селенита натрия, 50 нг/мл SCF, 50 нг/мл IL-7, 50 нг/мл Flt3L, 100 нг/мл TPO, 15 мкМ SB203580, 30 нМ SDF-1α использовали в качестве среды для культивирования этих клеток. В день 21 клетки были перенесены в новые чаши диаметром 15 см, покрытые hDLL4/RetroNectin. В день 28 клетки были дополнительно перенесены в новые чаши диаметром 15 см, покрытые hDLL4/RetroNectin. В день 35 были собраны все клетки, включая CD4/CD8 клетки, среди прочих («основная масса DP-клеток»).

Пример 3. Дифференцировка основной массы DP-клеток в основную массу NK клеток

[0322] В день 35, основную массу DP-клеток, т.е. клетки, полученные в примере 2 без выделения клеток, высевали в 48-луночный планшет в количестве 1 x 10^6 клеток/лунку и культивировали при уровне CO_2 5% при температуре 37°C в течение трех дней. В качестве культуральной среды использовали среду MEMα, дополненную 15% ФБС, 4 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 нг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл 2-фосфата аскорбиновой кислоты, 10 мкг/мл человеческого инсулина, 5,5 мкг/мл человеческого трансферрина, 6,7 нг/мл селенита натрия, 500 нг/м1 антитела к CD3 (UCHT1), 10 нг/мл IL-2 и 10 нг/мл IL-7. В день 38, клетки диспергировали в другую среду MEMα, дополненную 15% ФБС, 4 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 100 нг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл 2-фосфата аскорбиновой кислоты, 10 мкг/мл человеческого инсулина, 5,5 мкг/мл человеческого трансферрина, 6,7 нг/мл селенита натрия, 10 нг/мл IL-2 и 10 нг/мл IL-7. В день 42 были собраны все клетки, включая NK-клетки («основная масса NK-клеток»).

Пример 4. Анализ методом проточной цитометрии

[0323] Затем основную массу NK-клеток окрашивали набором антител, приведенных в **таблице 1**, и анализировали методом проточной цитометрии. Как показано на ФИГ. 1, часть CD3-отрицательных NK-клеток экспрессировала CD56 («CD56-положительные иммунные клетки»). **ФИГ. 1**. CD56-положительные и CD3-отрицательные иммунные клетки представляют собой естественные клетки-киллеры (NK-клетки). Таким образом, CD56-положительные и CD3-отрицательные иммунные клетки были получены из основной массы HP клеток, которые были получены из iPS-клеток (штамм FfI-01s04). Клетку, экспрессирующую CD56, полученную вышеописанным способом, иногда называют iPS NK-клеткой. Антитела, использованные для проточной цитометрии, представлены в таблице 1.

Таблица 1:

Антитело к CD3	CD3 BioLegend APC/Cy7
Антитело к CD56	CD56 Biolegend PE

Пример 5. Анализ секвенирования РНК одиночных клеток (scRNAseq)

[0324] Для идентификации различных типов клеток в основной популяции NK-клеток (т.е. клеток, полученных в примере 3) была применена нелинейная методика уменьшения размерности (метод равномерного приближения и проекции (UMAP) на основе секвенирования РНК одиночных клеток (scRNAseq)).

[0325] Десять тысяч клеток из основной массы NK-клеток были подвергнуты секвенированию РНК одиночных клеток на приборе Ilumina NextSeq 500 в Genewiz. С помощью алгоритма SingleR и ручной маркировки кластеров события были классифицированы по четырем широким клеточным популяциям — моноциты, B-клетки, NK-клетки и T-клетки в образцах МКПК. В качестве контроля для анализа данных был использован набор данных МКПК, находящийся в свободном доступе от 10X Genomics.

[0326] Как показано на **ФИГ. 2**, около 75% клеток в основной массе NK-клеток были идентифицированы как NK-клетки, а около 25% клеток в основной массе NK-клеток были идентифицированы как T-клетки. Таким образом, основная масса NK-клеток включала как NK-клетки, так и T-клетки на основании профилирования мРНК с помощью секвенирования РНК одиночных клеток.

Пример 6. Получение CAR-NK-клеток

[0327] NK-клетки были дополнительно модифицированы для экспрессии одного или более CAR. Модификация NK-клеток включает стадии: (1) синтеза гена анти-CD19 CAR и гена IL-15Rα/IL-15; (2) подготовки ретровирусного вектора, содержащего ген анти-CD19 CAR и гены IL-15Rα/IL-15; и (3) трансдукции NK-клеток ретровирусным вектором, содержащим ген анти-CD19 CAR и гены IL-15Rα/IL-15.

Получение CAR/IL15-NK-клеток

[0328] Ген анти-CD19 CAR был получен путем синтеза олигопептидов, сконструированных так, чтобы они располагались с N-конца, как показано **таблице 2**.

Таблица 2:

Последовательность с N-конца	Гены	Количество аминоксилот
1	Лидерная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина	22
2	Вариабельный домен в легкой цепи антитела к CD19 (FMC60)	104
3	Линкер GGGGS	15
4	Вариабельный домен в тяжелой цепи антитела к CD19 (FMC60)	120
5	Последовательность, полученная из CD8 (содержащая трансмембранный домен)	83
6	Внутриклеточный домен 4-1BB	47
7	Внутриклеточный домен CD3 дзета	112

[0329] Анти-CD19 CAR был сконструирован в соответствии с WO2014/153270, полностью включенным в данный документ посредством ссылки.

Получение гена IL-15Rα/IL-15

[0330] Ген IL-15Rα/IL-15 был получен путем синтеза олигопептидов, сконструированных так, чтобы они располагались с N-конца. IL-15Rα/IL-15 конструировали в соответствии с публикациями Mortier et al., 2006, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 281, No 3, pages 1612-1619, January 20, 2006; Chertova et al., *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 288, No. 25, Pages 18093-18103, June 21, 2013; и Rowley et al., *Eur J Immunol*, 2009 February; 39(2):491-506, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Таблица 4:

Последовательность с N-конца	Гены	Количество аминоксилот
1	Лидерная последовательность человеческого IL-2	23
2	С-концевая последовательность человеческого IL-15	114

3	Линкер GGGGS	24
4	С-концевая последовательность человеческого IL-15RA	239

Получение ретровирусного вектора, содержащего ген анти-CD19 CAR

[0331] Ген анти-CD19 CAR был включен в сайт множественного клонирования ретровирусного вектора pMY. Ретровирусный вектор был создан с использованием клеток FRY-RD18 для получения ретровирусного вектора.

Получение ретровирусного вектора, содержащего ген IL-15Rα/IL-15

[0332] Ген IL-15Rα/IL-15 был включен в сайт множественного клонирования другого ретровирусного вектора pMY. Ретровирусный вектор был создан с использованием клетки FRY-RD18 для получения ретровирусного вектора.

Трансдукция гена анти-CD19 CAR и гена IL-15Rα/IL-15 в iPS NK-клетку

[0333] iPS NK-клетки трансдуцировали ретровирусными векторами, содержащими ген анти-CD19 CAR, и ретровирусными векторами, содержащими ген IL-15Rα/IL-15, с получением экспрессирующих iPS NK-клеток анти-CD19 CAR («iNK-CAR19»).

Пример 7. Противоопухолевая активность iNK-CAR19 in vivo

[0334] Экспрессирующие люциферазу клетки Nalm6 (ATCC; раковые клетки) (5×10^5 клеток) трансплантировали мышам линии NOD/Shi-scid, IL-2R гамма-нулевым («мышам линии NSG») через хвостовую вену. Мыши NSG, самцы, в возрасте 4-5 недель были получены из лаборатории Jackson Laboratory. Через четыре дня после трансплантации клеток Nalm6, iNK-CAR19 (1x 10^7 клеток), диспергированные в 0,2 мл ФСБ или только 0,2 мл ФСБ без клеток, вводили через хвостовую вену мышам линии NSG, которым трансплантировали Nalm6. После введения клеток iNK-CAR19 или ФСБ мышам вводили люциферин через хвостовую вену. Активность люциферазы измеряли с использованием системы визуализации IVIS (PerkinElmer) в течение более 70 дней.

[0335] **На фиг. 3** показана противоопухолевая эффективность необработанных (обработанных только буфером) и обработанных клетками iNK-CAR19 мышей линии NSG, которым трансплантировали Nalm6. Через три дня люминесценция была обнаружена у всех мышей, обработанных буфером D-PBS. Напротив, люминесценция не была обнаружена у других мышей (обработанных либо первичными Т-клетками CAR, либо клетками iNK-CAR) до 28 дней после введения, а также люминесценция не была обнаружена у одной мыши, обработанной клетками iNK-CAR19, даже через 70 дней после обработки. Таким образом, клетки iNK-CAR19 явно продемонстрировали повышенную токсичность в отношении раковых клеток Nalm6.

ЭКВИВАЛЕНТЫ И ОБЪЕМ

[0336] Специалистам в данной области будет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, существование многочисленных эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Объем настоящего изобретения не ограничивается приведенным выше описанием, а скорее изложен в следующей формуле изобретения.

Формула изобретения

1. Способ получения NK-клеток из плюрипотентных стволовых клеток, включающий:

(A) обеспечение основной популяции клеток, содержащей гемопоэтические клетки-предшественники (HPC) (основная масса HP-клеток), полученные из плюрипотентных стволовых клеток,

(B) культивирование основной массы HP-клеток в одной или более культуральных средах для получения CD56+/CD3- клеток,

при этом способ не включает стадию выделения клеток.

2. Способ по п. 1, причем способ не включает стадию выделения клеток на стадиях (A) и (B).

3. Способ по любому из пп. 1 или 2, в котором основная масса HP-клеток на стадии (A) содержит CD34+ клетки.

4. Способ по п. 3 в котором 20% или более клеток в основной массе HP-клеток представляют собой CD34+ клетки.

5. Способ по п. 4, в котором от 20% до 90% основной массы HP-клеток представляют собой CD34+ клетки.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадия (B) включает

(i) культивирование основной массы HP-клеток в среде для индукции CD4/CD8 для получения промежуточной гетерогенной популяции клеток, содержащей CD4-/CD8- клетки, CD4-/CD8+ клетки, CD4+/CD8- клетки и CD4+/CD8+ клетки; и

(ii) культивирование промежуточной гетерогенной популяции клеток в среде для индукции NK для получения CD56+/CD3- клеток.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, причем способ не включает стадию выделения CD4+/CD8+ клеток.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадия (A) включает культивирование плюрипотентных стволовых клеток в среде для индукции HPC для получения основной массы HP-клеток.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором плюрипотентные стволовые клетки представляют собой индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC).

10. Способ по п. 8 или п. 9, в котором среда для индукции HPC содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из костного морфогенетического белка 4 (BMP4), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF), аскорбиновой кислоты, лиганда Flt3 (Flt3L), тромбопоэтина (TPO) и ингибитора TGFβ.

11. Способ по п. 10, в котором среда для индукции HPC содержит BMP4 в концентрации от 5 нг/мл до 500 нг/мл.

12. Способ по п. 11, в котором BMP4 находится в концентрации 50 нг/мл.

13. Способ по любому из пп. 10–12, в котором основная клеточная среда содержит VEGF в концентрации от 5 нг/мл до 500 нг/мл.

14. Способ по п. 13, в котором VEGF находится в концентрации около 50 нг/мл.

15. Способ по любому из пп. 10–14, в котором среда для индукции HPC содержит bFGF в концентрации от 5 нг/мл до 500 нг/мл.

16. Способ по п. 15, в котором bFGF находится в концентрации 50 нг/мл.

17. Способ по любому из пп. 10–16, в котором основная клеточная среда содержит аскорбиновую кислоту в концентрации от 5 мкг/мл до 500 мкг/мл.

18. Способ по п. 17, в котором аскорбиновая кислота находится в концентрации 50 мкг/мл.

19. Способ по любому из пп. 10–18, в котором среда для индукции HPC содержит Flt3L в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

20. Способ по п. 19, в котором Flt3L находится в концентрации 50 нг/мл.

21. Способ по любому из пп. 10–20, в котором среда для индукции HPC содержит TPO в концентрации от 1 нг/мл до 200 нг/мл.

22. Способ по п. 21, в котором TPO находится в концентрации 100 нг/мл.

23. Способ по любому из пп. 6–22, в котором среда для индукции CD4/CD8 содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из аскорбиновой кислоты, фактора стволовых клеток (SCF), IL-7, Flt3L, тромбопоэтина (TPO), ингибитора p38 и SDF-1.

24. Способ по п. 23, в котором среда для индукции CD4/CD8 содержит аскорбиновую кислоту в концентрации от 5 мкг/мл до 500 мкг/мл.

25. Способ по п. 24, в котором аскорбиновая кислота находится в концентрации 50 мкг.

26. Способ по любому из пп. 23–25, в котором среда для индукции CD4/CD8 содержит SCF в концентрации от 5 нг/мл до 100 нг/мл.

27. Способ по п. 26, в котором SCF находится в концентрации 50 нг/мл.

28. Способ по любому из пп. 23–27, в котором среда для индукции CD4/CD8 содержит IL-7 в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

29. Способ по п. 28, в котором IL-7 находится в концентрации 50 нг/мл.

30. Способ по любому из пп. 23–29, в котором среда для индукции CD4/CD8 содержит Flt3L в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

31. Способ по п. 30, в котором Flt3L находится в концентрации 50 нг/мл Flt3L.

32. Способ по любому из пп. 23–31, в котором среда для индукции CD4/CD8 содержит TPO в концентрации от 1 нг/мл до 200 нг/мл.

33. Способ по п. 32, в котором TPO находится в концентрации 100 нг/мл.

34. Способ по любому из пп. 23–33, в котором среда для индукции CD4/CD8 содержит ингибитор p38 в концентрации от 0,5 мкМ до 100 мкМ.

35. Способ по п. 34, в котором ингибиторов p38 представляет собой SB203580.

36. Способ по п. 35, в котором SB203580 находится в концентрации 15 мкМ.

37. Способ по любому из пп. 23–36, в котором среда для индукции CD4/CD8 содержит ингибитор SDF-1 в концентрации от 10 нг/мл до около 100 нг/мл.

38. Способ по п. 37, в котором ингибитор SDF-1 находится в концентрации 30 нМ.

39. Способ по любому из пп. 6–38, в котором среда для индукции NK содержит по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из активатора CD3, IL-2 и IL7.

40. Способ по п. 39, в котором среда для индукции NK содержит IL-2 в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

41. Способ по п. 40, в котором IL-2 находится в концентрации 10 нг/мл.

42. Способ по любому из пп. 39–41, в котором вторая среда для индукции содержит IL-7 в концентрации от 1 нг/мл до 100 нг/мл.

43. Способ по п. 42, в котором IL-7 находится в концентрации 10 нг/мл.

44. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором каждую из стадий культивирования выполняют при уровне кислорода около 5%.

45. Способ по любому из пп. 1–43, в котором каждую из стадий культивирования выполняют при уровне кислорода более 14%.

46. Способ по любому из пп. 1–43, в котором каждую из стадий культивирования выполняют при атмосферном уровне кислорода.

47. Способ по любому из пп. 1–43, в котором каждую из стадий культивирования выполняют при уровне кислорода менее 5%.

48. Способ по любому из пп. 8–47, в котором культивирование плюрипотентных стволовых клеток в основной клеточной среде для получения основной массы HP-клеток длится более 10 дней.

49. Способ по п. 48, в котором культивирование плюрипотентных стволовых клеток в основной клеточной среде для получения основной массы HP-клеток длится от 11 до 15 дней.

50. Способ п. 49, в котором культивирование плюрипотентных стволовых клеток в основной клеточной среде для получения основной массы HP-клеток длится 14 дней.

51. Способ по любому из пп. 9–50, в котором iPSC получают из мононуклеарных клеток периферической крови.

52. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором по меньшей мере около 50%, 55%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% или более полученных клеток представляют собой CD56+/CD3- клетки без проведения стадии обогащения.

53. Способ по п. 52, в котором менее чем около 25% полученных клеток представляют собой CD3+ клетки.

54. Способ по п. 52 или п. 53, в котором процент полученных клеток определяют с помощью проточной цитометрии.

55. Способ по п. 52 или п. 53, в котором процент полученных клеток определяют с помощью секвенирования РНК одиночных клеток (scRNAseq).

56. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий стадию выделения CD56+/CD3- клеток.

57. Способ по п. 56, в котором CD56+/CD3- клетки выделяют с помощью флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) или магнитной сортировки.

58. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором CD56+/CD3- иммунные клетки представляют собой NK-клетки.

59. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором CD56+/CD3- клетки генетически модифицируют для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

60. Способ по п. 59, в котором выделенные CD56+/CD3- клетки генетически модифицируют для экспрессии одного или более химерных антигенных рецепторов (CAR).

61. Способ по п. 60, в котором антиген представляет собой CD19.

62. Способ по любому из пп. 59–61, в котором клетки дополнительно генетически модифицируют для экспрессии комплекса IL-15Rα/IL-15.

63. Способ получения CD56+/CD3- иммунных клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), включающий следующие стадии:

(1) культивирование iPSC в среде для индукции HPC, содержащей по меньшей мере одно соединение, выбранное из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF) и аскорбиновой кислоты, для получения гетерогенной популяции клеток, содержащей гемопоэтические клетки-предшественники (HPC) (основная масса HP-клеток);

(2) культивирование основной массы HP-клеток, полученной на стадии (1), в среде для индукции CD4/CD8, содержащей одно или более из аскорбиновой кислоты, ингибитора p38 и SDF-1, для получения промежуточной гетерогенной популяции клеток; и

(3) культивирование промежуточной гетерогенной популяции клеток со стадии (2) в среде для индукции NK, содержащей по меньшей мере одно соединение, выбранное из группы, состоящей из активатора CD3, IL-2 и IL-7.

64. Популяция NK-клеток, полученная с применением способа по любому из предшествующих пунктов.

65. Популяция неотсортированных клеток, содержащая полученные из плюрипотентных стволовых клеток CD56+/CD3-клетки в доле не менее 60% от общего количества полученных из плюрипотентных стволовых клеток CD56+ иммунных клеток.

66. Популяция неотсортированных клеток по п. 65, в которой менее 25% клеток представляют собой CD3+ клетки.

67. Популяция неотсортированных клеток по п. 65 или п. 66, в которой менее 5% клеток представляют собой моноциты.

68. Популяция неотсортированных клеток по п. 65 или п. 66, в которой менее 5% клеток представляют собой B-клетки.

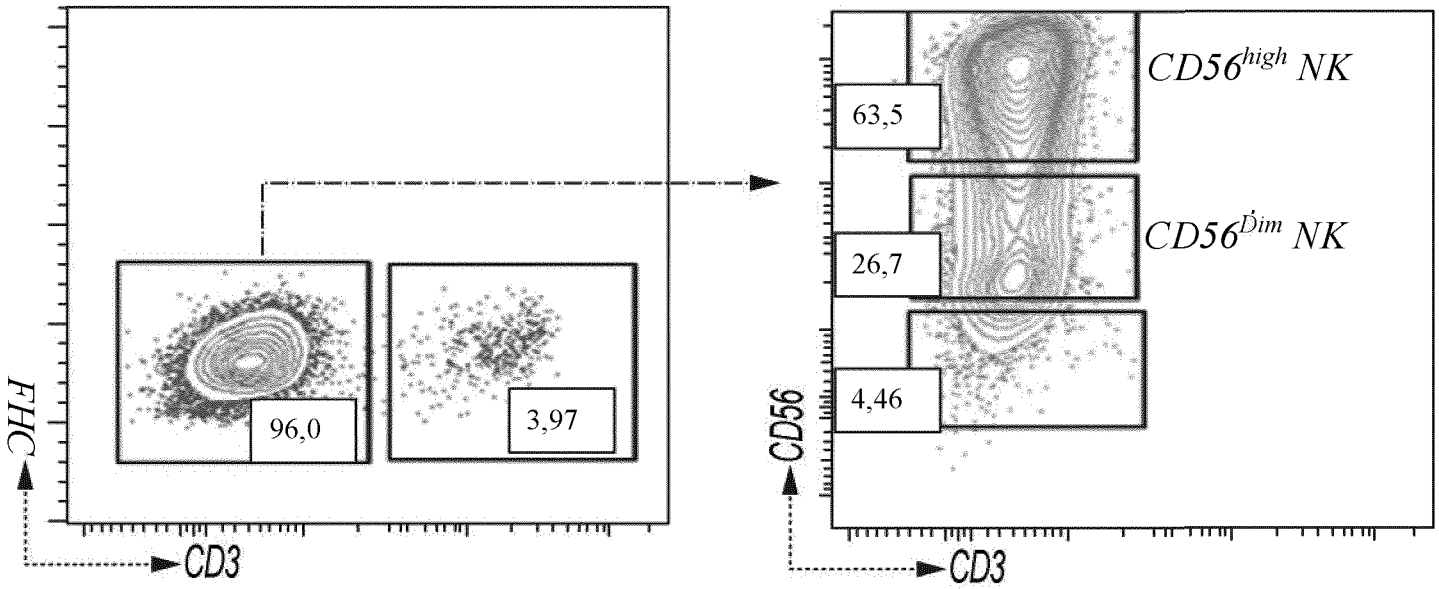
69. Популяция неотсортированных клеток по любому из пп. 65–68, в которой процент клеток определяют с помощью проточной цитометрии.

70. Популяция неотсортированных клеток по пп. 65–68, в которой процент клеток определяют с помощью секвенирования РНК одиночных клеток (scRNAseq).

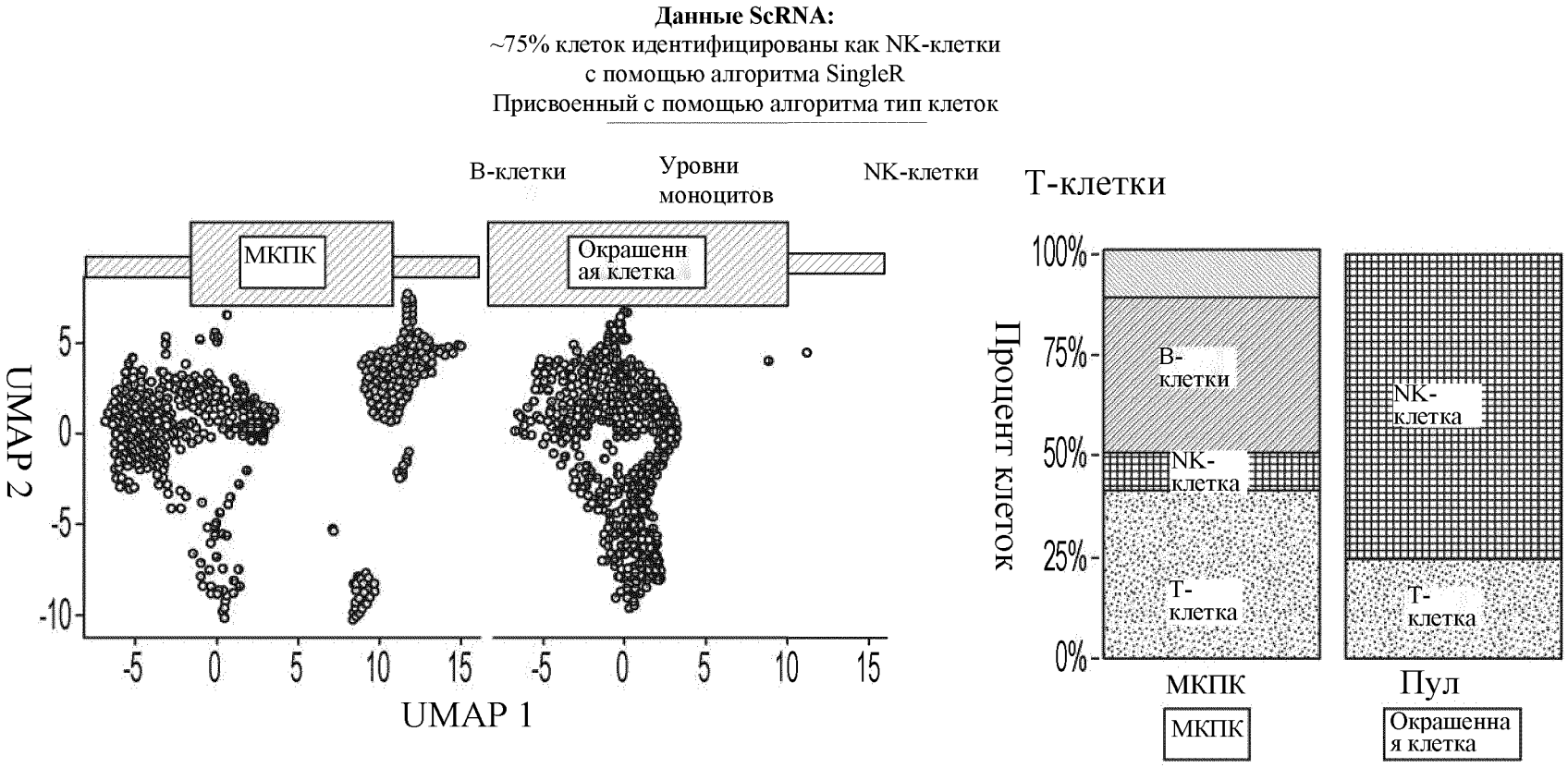
71. Способ лечения субъекта, нуждающегося в клеточной терапии, включающий введение субъекту NK-клеток по любому из предшествующих пунктов.

72. Способ по п. 68, причем субъект болен раком.

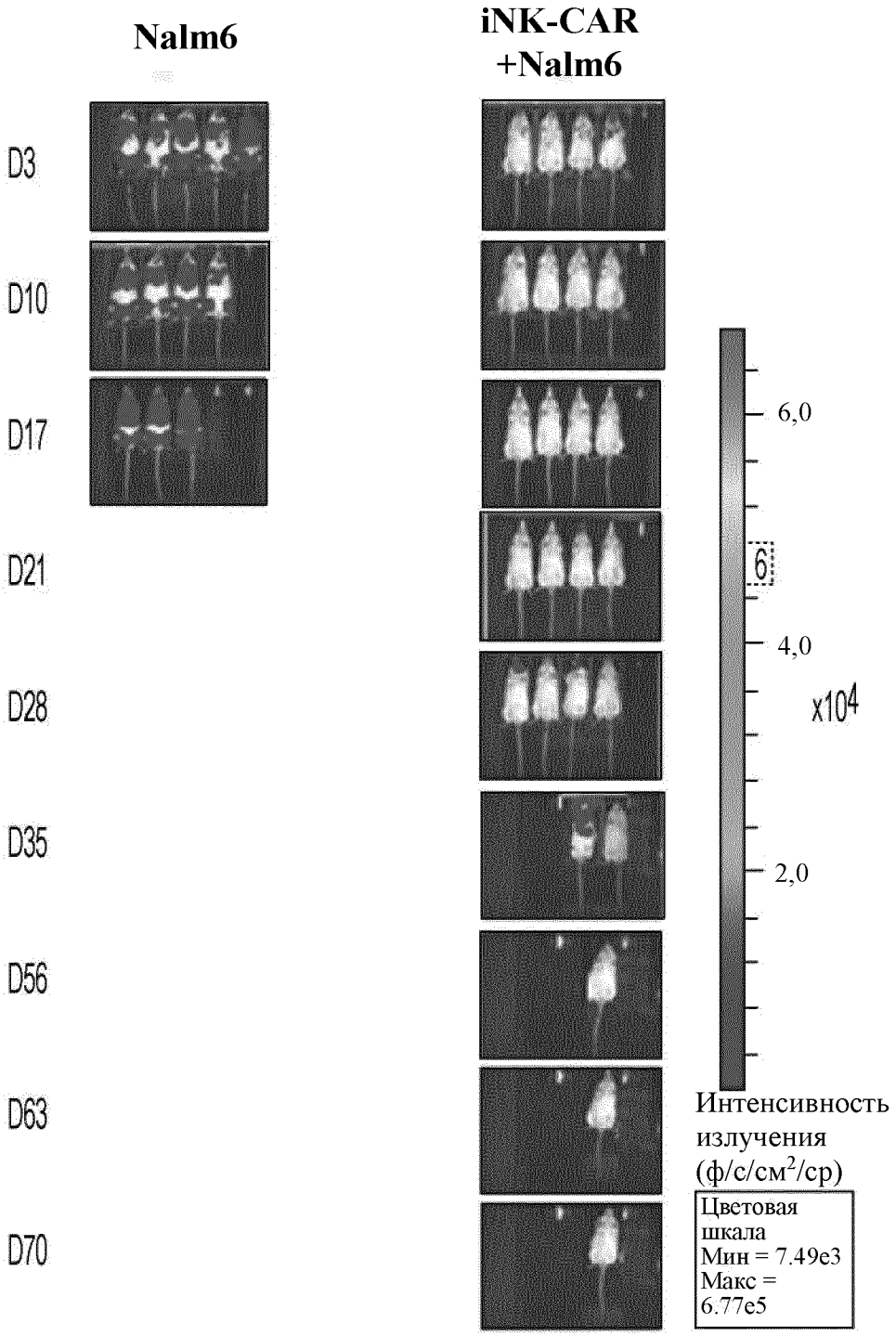
73. Способ по п. 69, причем рак представляет собой лейкоз или лимфому.



Фиг. 1


Данные ScRNA:
~75% клеток идентифицированы как NK-клетки
с помощью алгоритма SingleR
Присвоенный с помощью алгоритма тип клеток
В-клетки
Уровни моноцитов
NK-клетки
Т-клетки
МКПК
Окрашенная клетка
UMAP 2
UMAP 1
5
0
-5
-10
-5
0
5
10
15
Процент клеток
100%
75%
50%
25%
0%
В-клетки
NK-клетка
Т-клетка
МКПК
Пул
МКПК
Окрашенная клетка

Фиг. 2


Nalm6
iNK-CAR
+Nalm6
D3
D10
D17
D21
D28
D35
D56
D63
D70
6,0
6
4,0
x10^4
2,0
Интенсивность
излучения
(ф/с/см²/ср)
Цветовая
шкала
Мин = 7.49e3
Макс =
6.77e5

Фиг. 3