

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292713** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.01.20

(51) Int. Cl. *A61K 35/30* (2015.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.25

(54) **ГИПОИММУНОГЕННЫЕ НЕЙРАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ И СОСТОЯНИЙ**

(31) **62/994,750**

(72) Изобретатель:
Шрепфер Соня, Рамос-Зейес Ребека
(US)

(32) **2020.03.25**

(33) **US**

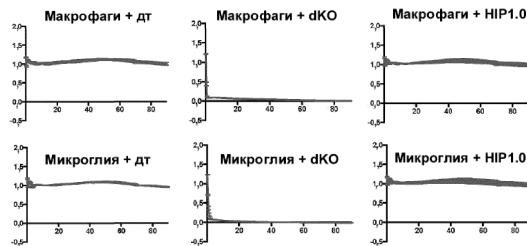
(86) **PCT/US2021/024228**

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

(87) **WO 2021/195426 2021.09.30**

(71) Заявитель:
САНА БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(US)

(57) В изобретении описаны клетки, включая нейральные клетки, которые избегают иммунного распознавания, такого как микроглиальный ответ, и соответствующие способы их применения и создания. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки имеют сниженные уровни или сниженную активность лейкоцитарных антигенов человека ГКГС I и/или ГКГС II и, в некоторых случаях, экзогенно экспрессируют CD47. В некоторых вариантах осуществления эти клетки получены из плюрипотентных стволовых клеток, которые избегают иммунного распознавания субъектом-реципиентом.



202292713

A1

A1

202292713

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575798EA/081

ГИПОИММУНОГЕННЫЕ НЕЙРАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ И СОСТОЯНИЙ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по 35 U.S.C. § 119(e) по предварительной заявке США № 62/994750, поданной 25 марта 2020, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Неврологические расстройства включают многочисленные поражения, такие как острое поражение головного мозга, такое как инсульт, травма головы и церебральный паралич; повреждение спинного мозга; нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона; и большое количество функциональных нарушений центральной нервной системы, таких как депрессия, эпилепсия и шизофрения. Известно, что инсульт является основной причиной инвалидности среди взрослых и третьей причиной смертности по всему миру.

[0003] Существует достаточное количество данных, полученных как для животных моделей, так и для пациентов-людей, подтверждающих, что трансплантация нейральных клеток является научно реализуемым и клинически перспективным подходом к лечению неврологических расстройств и состояний.

[0004] Остается потребность в новых подходах, композициях и способах получения клеточных терапевтических средств, которые могут избегать выявления иммунной системой реципиента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном документе предложен способ ингибирования микроглиального фагоцитоза популяции нейральных клеток, вводимых пациенту, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции нейральных клеток, содержащих экзогенный полипептид CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или ГКГС класса II.

[0006] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток имеет сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I или ГКГС класса II. В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток имеет сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[0007] В некоторых вариантах осуществления введение включает прививание популяции нейральных клеток в центральную или периферическую нервную систему пациента. Во многих вариантах осуществления прививание включает инъекцию популяции нейральных клеток пациенту. В многочисленных вариантах осуществления прививание включает нарушение гематоэнцефалического барьера пациента.

[0008] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочную выживаемость после нарушения гематоэнцефалического

барьера пациента. В различных вариантах осуществления популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочное функционирование после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

[0009] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния. Во многих вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния. В некоторых вариантах осуществления нарушение гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии происходит в результате инфекции или инсульта.

[0010] В ряде вариантов осуществления популяция нейральных клеток выживает и/или функционирует в организме пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или более после введения.

[0011] В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент перед ведением популяции нейральных клеток. Во многих вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент после ведения популяции нейральных клеток. В определенных вариантах осуществления пациенту необходим сниженный уровень иммуносупрессии или практически не нужна иммуносупрессия.

[0012] В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

[0013] В нескольких вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника. В различных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника. Во многих вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

[0014] В определенных вариантах осуществления микроглиальный фагоцитоз связан с неврологическим расстройством или состоянием.

[0015] В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкодистрофий, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкодистрофий, болезни исчезающего белого вещества, адренолейкодистрофии, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метакроматической лейкодистрофии, церебрального паралича,

перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения. В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера. В определенных вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий рассеянный склероз. Во многих вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

[0016] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток экспрессирует CD47 на более высоком уровне, чем в немодифицированной плюрипотентной клетке или немодифицированной нейральной клетке.

[0017] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток экспрессирует суицидальный ген, который активируется триггером, который вызывает гибель нейральной клетки.

[0018] В данном документе предложен способ ингибирования микроглиального фагоцитоза популяции нейральных клеток, вводимых пациенту, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции нейральных клеток, содержащих экзогенный полипептид CD47 и имеющих сниженную экспрессию B2M и/или СРТА.

[0019] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток имеет сниженную экспрессию B2M или СРТА. В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток имеет сниженную экспрессию B2M и СРТА.

[0020] В некоторых вариантах осуществления введение включает прививание популяции нейральных клеток в центральную или периферическую нервную систему пациента. В многочисленных вариантах осуществления прививание включает инъекцию популяции нейральных клеток пациенту. Во многих вариантах осуществления прививание включает нарушение гематоэнцефалического барьера пациента.

[0021] Во многих вариантах осуществления популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочную выживаемость после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента. В многочисленных вариантах осуществления популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочное функционирование после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

[0022] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

[0023] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния. В других вариантах осуществления нарушение гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии происходит в результате инфекции или инсульта.

[0024] Во многих вариантах осуществления популяция нейральных клеток выживает и/или функционирует в организме пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или более после введения.

[0025] В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент перед ведением популяции нейральных клеток. В определенных вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент после ведения популяции нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления пациенту необходим сниженный уровень иммуносупрессии или практически не нужна иммуносупрессия.

[0026] В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров. В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника. В различных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника. В определенных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

[0027] В некоторых вариантах осуществления микроглиальный фагоцитоз связан с неврологическим расстройством или состоянием.

[0028] В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкодиistroфий, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкодиistroфий, болезни исчезающего белого вещества, аденолейкодиistroфии, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метахроматической лейкодиistroфии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового

кровообращения. В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера. Во многих вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий рассеянный склероз. В различных вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

[0029] В нескольких вариантах осуществления популяция нейральных клеток экспрессирует CD47 на более высоком уровне, чем в родительской плюрипотентной клетке (например, немодифицированной плюрипотентной стволовой клетке) или немодифицированной нейральной клетке. В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток экспрессирует суицидальный ген, который активируется триггером, который вызывает гибель нейральной клетки.

[0030] Во многих вариантах осуществления популяция нейральных клеток представляет собой глиальные клетки-предшественники.

[0031] В данном документе предложен *in-vitro* способ получения терапевтически эффективного количества человеческих нейральных клеток из популяции человеческих плюрипотентных стволовых клеток, включающий этапы а) генетической модификации человеческих плюрипотентных стволовых клеток с целью i) снижения экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС класса I и/или человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС класса II в человеческих плюрипотентных стволовых клетках и ii) сверхэкспрессии экзогенного полипептида CD47 в человеческих плюрипотентных стволовых клетках, б) дифференцировки человеческих плюрипотентных стволовых клеток в нейральные клетки; и с) анализа нейральных клеток в отношении фенотипа гипои иммуногенности и/или одного или более специфических к нейральным клеткам маркеров, генной экспрессии или профиля генной экспрессии.

[0032] В некоторых вариантах осуществления этап а) дополнительно включает генетическую модификацию человеческих плюрипотентных стволовых клеток с целью снижения экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[0033] В некоторых вариантах осуществления этап а) дополнительно включает генетическую модификацию человеческих плюрипотентных стволовых клеток с целью снижения экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[0034] В некоторых вариантах осуществления человеческие плюрипотентные стволовые клетки с этапа а) ii) экспрессируют CD47 на уровне, более высоком, чем в популяции человеческих плюрипотентных стволовых клеток до этапа а).

[0035] В некоторых вариантах осуществления человеческие нейральные клетки с этапа б) или с) экспрессируют CD47 на уровне, более высоком, чем в немодифицированной нейральной клетке или нейрональной клетке, генетически не модифицированной с помощью этапа а).

[0036] В некоторых вариантах осуществления человеческие нейральные клетки с этапа б) или с) имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса II по сравнению с

немодифицированной человеческой нейральной клеткой или нейрональной клеткой, генетически не модифицированной с помощью этапа а).

[0037] В некоторых вариантах осуществления этап а) дополнительно включает iii) экспрессию суицидального гена в человеческих плюрипотентных стволовых клетках.

[0038] В некоторых вариантах осуществления анализ человеческих нейральных клеток на этапе с) включает анализ фенотипа гипоиммуногенности методами Elispot, ELISA, FACS, ПЦР или масс-цитометрии (CYTOF).

[0039] Предложена выделенная нейральная клетка, содержащая экзогенный полипептид CD47 и имеющая сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем клетка избегает иммунного распознавания при введении пациенту.

[0040] В некоторых вариантах осуществления выделенная нейрональная клетка дополнительно имеет сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[0041] В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров. В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника. Во многих вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника. В многочисленных вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника. В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой церебральную эндотелиальную клетку. В различных вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой дофаминовый нейрон.

[0042] В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка избегает иммунного распознавания *in vitro*. Во многих вариантах осуществления выделенная нейральная клетка избегает иммунного распознавания при прививании в центральную или периферическую нервную систему пациента.

[0043] В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз *in vitro*. Во многих вариантах осуществления выделенная нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз при прививании в центральную нервную систему пациента.

[0044] В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка имеет сниженную экспрессию B2M и/или СРТА.

[0045] В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка содержит один или более трансгенов CD47.

[0046] В некоторых вариантах осуществления экспрессию одного или более трансгенов CD47 контролируют конститутивные промоторы. В определенных вариантах

осуществления экспрессию одного или более трансгенов CD47 контролируют нейронально-специфические промоторы.

[0047] В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая популяцию любых из выделенных нейральных клеток по представленной технологии.

[0048] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0049] Также в данном документе предложен способ лечения неврологического расстройства или состояния у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции нейральных клеток, содержащих экзогенный полипептид CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I, причем популяция нейральных клеток проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз после введения.

[0050] В некоторых вариантах осуществления введение включает прививание популяции нейральных клеток в центральную или периферическую нервную систему пациента. В некоторых вариантах осуществления прививание включает инъекцию популяции нейральных клеток пациенту. В различных вариантах осуществления прививание включает нарушение гематоэнцефалического барьера пациента.

[0051] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочную выживаемость после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента. Во многих вариантах осуществления популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочное функционирование после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

[0052] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния. Во многих вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

[0053] В некоторых вариантах осуществления нарушение гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии происходит в результате инфекции или инсульта.

[0054] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток выживает и/или функционирует в организме пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или более после введения.

[0055] В некоторых вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент до, во время и/или после введения популяции нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления пациенту необходим сниженный уровень

иммуносупрессии или практически не нужна иммуносупрессия.

[0056] В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров. В различных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника. В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника. В определенных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

[0057] Во многих вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкодиistroфий, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкодиistroфий, болезни исчезающего белого вещества, аденолейкодиistroфии, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метахроматической лейкодиistroфии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения. В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера. Во многих вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий рассеянный склероз. В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

[0058] В данном документе предложена нейральная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0059] В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров. В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника. Во многих вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-

предшественника. В различных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

[0060] В данном документе предложена церебральная эндотелиальная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем церебральная эндотелиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз. В некоторых вариантах осуществления клетка формирует сосудистую систему при введении в головной мозг пациента.

[0061] В данном документе предложена микроглиальная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем микроглиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0062] В данном документе предложен олигодендроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем олигодендроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0063] В данном документе предложена шванновская клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем шванновская клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0064] В данном документе предложен астроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем астроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0065] В данном документе предложена эпендимная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем эпендимная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0066] В данном документе предложен нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз. В некоторых

вариантах осуществления нейрон представляет собой дофаминовый нейрон.

[0067] В данном документе предложен дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0068] В данном документе предложена выделенная нейральная клетка, содержащая экзогенный полипептид CD24 и имеющая сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса II, причем выделенная нейральная клетка избегает иммунного распознавания при введении пациенту.

[0069] В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров. В некоторых вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника. В различных вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника. Во многих вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника. Во многих вариантах осуществления выделенная нейральная клетка представляет собой церебральную эндотелиальную клетку.

[0070] В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка избегает иммунного распознавания *in vitro*. В определенных вариантах осуществления нейральная клетка избегает иммунного распознавания при прививании в центральную или периферическую нервную систему пациента. В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз *in vitro*. Во многих вариантах осуществления нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз при прививании в центральную нервную систему пациента.

[0071] В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка имеет сниженную экспрессию B2M и/или СПТА. Во многих вариантах осуществления нейральная клетка содержит один или более трансгенов CD24. В некоторых вариантах осуществления экспрессию одного или более трансгенов CD47 контролируют конститутивные промоторы. В определенных вариантах осуществления экспрессию одного или более трансгенов CD47 контролируют нейронально-специфические промоторы.

[0072] Также предложена композиция, содержащая популяцию любых из выделенных нейральных клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0073] В данном документе предложен способ лечения неврологического расстройства или состояния у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции нейральных клеток, содержащих экзогенный полипептид CD24 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или ГКГС класса II.

[0074] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает снижение экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

[0075] В некоторых вариантах осуществления введение включает прививание популяции нейральных клеток в центральную или периферическую нервную систему пациента. В определенных вариантах осуществления прививание включает инъекцию популяции нейральных клеток пациенту. В некоторых вариантах осуществления прививание включает нарушение гематоэнцефалического барьера пациента.

[0076] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента. В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

[0077] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

[0078] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

[0079] В некоторых вариантах осуществления нарушение гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии происходит в результате инфекции или инсульта.

[0080] В некоторых вариантах осуществления популяция нейральных клеток выживает и/или функционирует в организме пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или более после введения.

[0081] В различных вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент перед введением популяции нейральных клеток. В определенных вариантах осуществления пациенту не вводят иммуносупрессивный агент после введения популяции нейральных клеток. Во многих вариантах осуществления пациенту необходим сниженный уровень иммуносупрессии или практически не нужна иммуносупрессия. В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров. В различных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника. Во многих вариантах

осуществления нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника. В многочисленных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

[0082] В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкодиistroфий, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкодиistroфий, болезни исчезающего белого вещества, аденолейкодиistroфии, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метакроматической лейкодиistroфии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения. В различных вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера. В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий рассеянный склероз. Во многих вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

[0083] Предложена нейральная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0084] В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров. В различных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника. Во многих вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника. В многочисленных вариантах осуществления нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

[0085] Предложена церебральная эндотелиальная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем церебральная

эндотелиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0086] В некоторых вариантах осуществления клетка формирует сосудистую систему при введении в головной мозг пациента.

[0087] Предложена микроглиальная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем микроглиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0088] Предложен олигодендроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем олигодендроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0089] Предложена шванновская клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем шванновская клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0090] Предложен астроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем астроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0091] Предложена эпендимная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем эпендимная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0092] Предложен нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0093] В некоторых вариантах осуществления нейрон представляет собой дофаминовый нейрон.

[0094] Предложен дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейрон проходит,

демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0095] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей выделенную нейральную клетку, содержащую экзогенный полипептид CD47 и имеющую сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем клетка избегает иммунного распознавания при введении пациенту.

[0096] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей нейральную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0097] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей церебральную эндотелиальную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем церебральная эндотелиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0098] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей микроглиальную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем микроглиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[0099] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей олигодендроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD47 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем олигодендроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00100] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей шванновскую клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем шванновская клетка проходит, демонстрирует или стимулирует

сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00101] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей астроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD47 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем астроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00102] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей эпендимную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем эпендимная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00103] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD47 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00104] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD47 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00105] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей выделенную нейральную клетку, содержащую экзогенный полипептид CD24 и имеющую сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса II, причем выделенная нейральная клетка избегает иммунного распознавания при введении пациенту.

[00106] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей нейральную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00107] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей церебральную эндотелиальную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем церебральная эндотелиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00108] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей микроглиальную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем микроглиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00109] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей олигодендроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD24 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем олигодендроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00110] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей шванновскую клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем шванновская клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00111] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей астроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD24 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем астроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00112] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей эпендимную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем эпендимная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует

сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00113] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD24 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00114] В данном документе предложено применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD24 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СПТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00115] В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкодистрофий, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкодистрофий, болезни исчезающего белого вещества, аденолейкодистрофии, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метахроматической лейкодистрофии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения.

[00116] В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера. Во многих вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий рассеянный склероз. В некоторых вариантах осуществления неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

[00117] В данном документе предложен дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, причем дофаминовый нейрон экспрессирует экзогенный полипептид CD47, при этом дофаминовый нейрон имеет сниженные уровни экспрессии B2M и СПТА и при этом дофаминовый нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00118] В данном документе предложен дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, причем дофаминовый нейрон экспрессирует экзогенный полипептид CD24, при этом дофаминовый нейрон имеет сниженные уровни экспрессии B2M и СПТА и при этом дофаминовый нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

[00119] В данном документе предложена глиальная клетка-предшественник, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, причем глиальная клетка-предшественник экспрессирует экзогенный полипептид CD47, при этом глиальная клетка-предшественник имеет сниженные уровни экспрессии B2M и СПТА и при этом глиальная клетка-предшественник проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз или избегает микроглиального фагоцитоза.

[00120] В данном документе предложена глиальная клетка-предшественник, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, причем глиальная клетка-предшественник экспрессирует экзогенный полипептид CD24, при этом глиальная клетка-предшественник имеет сниженные уровни экспрессии B2M и СПТА и при этом глиальная клетка-предшественник проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз или избегает микроглиального фагоцитоза.

[00121] Подробные описания гипоиммуногенных клеток, способов их получения и способов их применения можно найти в WO2016183041, поданной 9 мая 2015 г., и WO2018132783, поданной 14 января 2018 г., описания которых, включая перечни последовательностей, графические материалы и примеры, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00122] На Фиг. 1 показаны человеческие ЭК дикого типа (дт), ЭК с двойным нокаутом (B2M-/-СПТА-/-) и ЭК с двойным нокаутом/CD47Tg (B2M-/-СПТА-/- CD47 tg; dKO/CD47Tg). ЭК культивировали совместно с аллогенными человеческими макрофагами или микроглией, чтобы посмотреть на эффект экспрессии CD47 на ингибирование микроглии. CD47 защищал клетки dKO от уничтожения макрофагами. CD47 также, по-видимому, защищает клетки dKO/CD47Tg от микроглиального фагоцитоза.

[00123] На Фиг. 2 показано сравнение иммунного ответа после трансплантации аллогенных полученных из *miPSC* эндотелиальных клеток (например, ЭК дикого типа или ЭК dKO/CD47Tg) в головной мозг и мышцы, определяемого с помощью *Elispot* IFN-гамма. Инъекции клеток дт в головной мозг индуцировали ответ Т-клеток. Инъекция клеток dKO/CD47Tg, по-видимому, не индуцировала системный ответ Т-клеток (который наблюдали в других органах).

[00124] На Фиг. 3 показано сравнение иммунного ответа после трансплантации аллогенных полученных из *miPSC* эндотелиальных клеток (например, ЭК дикого типа или ЭК dKO/CD47Tg) в головной мозг и мышцы, определяемого по донор-специфическим антителам (DSA). Инъекции клеток дт в головной мозг индуцировали ответ донор-специфических антител. Инъекции клеток dKO/CD47Tg не индуцировали выработку DSA

(которую наблюдали в других органах).

[00125] На Фиг. 4 проиллюстрирована биолюминесцентная визуализация ЭК дикого типа, трансплантированных в полосатое тело головного мозга здоровых аллогенных мышей BALB/c. Полученные из мышинных iPSC эндотелиальные клетки трансплантировали в полосатое тело здоровых аллогенных мышей BALB/c. У 4 из 5 животных наблюдалось отторжение ЭК дт в течение 19 дней.

[00126] На Фиг. 5 проиллюстрирована биолюминесцентная визуализация эндотелиальных клеток (ЭК), полученных из iPSC мышей дикого типа, трансплантированных в полосатое тело головного мозга здоровых бежевых мышей SCID с ослабленным иммунитетом. Клетки дт выявляли у бежевых иммунокомпетентных мышей scid от дня 0 (д0) до дня 11 (д11).

[00127] На Фиг. 6 проиллюстрирована биолюминесцентная визуализация ЭК dKO/CD47Tg (B2M-/-C11TA-/- CD47 tg), трансплантированных в полосатое тело головного мозга здоровых аллогенных мышей BALB/c. Эндотелиальные клетки, полученные из мышинных iPSC, трансплантировали в полосатое тело здоровых аллогенных мышей BALB/c.

[00128] На Фиг. 7 проиллюстрирована биолюминесцентная визуализация ЭК dKO/CD47Tg (B2M-/-C11TA-/- CD47 tg), трансплантированных в полосатое тело головного мозга здоровых бежевых мышей SCID с ослабленным иммунитетом. Эндотелиальные клетки, полученные из miPSC, трансплантировали в полосатое тело здоровых бежевых мышей scid.

[00129] На Фиг. 8А и Фиг. 8В проиллюстрирована разница в уничтожении клеток dKO микроглией и макрофагами. На Фиг. 8А показан эффект на человеческие или мышинные клетки dKO (B2M-/-C11TA-/-), которые культивировали совместно с аллогенными человеческими макрофагами, человеческой микроглией или мышинной микроглией. В этих экспериментах оценивали эффект отсутствия CD47 на опосредованное макрофагами и микроглией уничтожение. Аллогенные макрофаги и микроглия выявляли и уничтожали клетки dKO. На Фиг. 8В показан эффект на человеческие или мышинные клетки dKO (B2M-/-C11TA-/-), которые культивировали совместно с ксеногенными (межвидовыми) человеческими макрофагами, человеческой микроглией или мышинной микроглией, чтобы оценить эффект на опосредованное макрофагами и микроглией уничтожение. Ксеногенная микроглия не выявляла и не уничтожала клетки dKO. В частности, человеческая микроглия не уничтожала мышинные клетки dKO, а мышинная микроглия не уничтожала человеческие клетки dKO.

[00130] На Фиг. 9 приведен набор репрезентативных графиков FACS, иллюстрирующих экспрессию Nanog, Oct4 и Sox 2 в iPSC дикого типа, dKO/CD47Tg iPSC («1-B4 bulk CD47») и dKO iPSC («1-B4 dKO»), как описано в примере 6. Экспрессия Nanog, Oct4 и Sox 2 в плюрипотентных контрольных клетках (клетках HEK293) также проиллюстрирована на графиках.

[00131] На Фиг. 10 приведен набор репрезентативных графиков FACS,

иллюстрирующих экспрессию FoxA2, Otx2, Nkx6.1, Nkx2.1, Nkx2.2, Sox1 и Pax6 в дофаминовых клетках-предшественниках, дифференцированных из iPSC дикого типа, dKO/CD47Tg iPSC («1-B4 bulk CD47») или dKO iPSC («1-B4 dKO»), как описано в примере 6. Экспрессия маркеров в соответствующих контрольных iPSC также проиллюстрирована на графиках.

[00132] На Фиг. 11 приведен набор репрезентативных графиков FACS, иллюстрирующих экспрессию CD47 в iPSC дикого типа, dKO/CD47Tg iPSC, дофаминовых клетках-предшественниках, дифференцированных из таких iPSC дикого типа, и дофаминовых клетках-предшественниках, дифференцированных из таких dKO/CD47Tg iPSC, как описано в примере 6. Кратность изменения уровней CD47 приведена на фигуре.

[00133] На Фиг. 12A и Фиг. 12B приведены гистограммы экспрессии генов белка forkhead-бокса A2 (FoxA2), транскрипционного фактора 1 гомеобокса LIM (LMX1A) и (белка, родственного ядерному рецептору 1) Nurr1 в дофаминовых нейронах и созревающих нейронах, дифференцированных из iPSC дикого типа и dKO/CD47Tg, как описано в примере 6.

[00134] На Фиг. 13 проиллюстрирована иммунофлуоресцентная визуализация созревающих нейронов, дифференцированных из iPSC дикого типа и dKO/CD47Tg, как описано в примере 6. Клетки окрашивали с целью выявления FoxA2, тирозингидроксилазы (TH), гипофизарного гомеобокса (Pitx3), engrailed-1 (EN1) и VarH-подобного белка гомеобокса 1 (Varh1). Ядра выявляли, используя окрашивание ДАФИ.

[00135] Другие цели, преимущества и варианты осуществления представленной технологии станут очевидны из нижеследующего подробного описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Введение

[00136] Представленная технология относится к нейральным клеткам, полученным из стволовых клеток, и их применению для лечения неврологических расстройств и состояний. Также в представленной технологии используют методы получения типов нейральных клеток из других не являющихся нейральными типов клеток, включая, но не ограничиваясь этим, плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) и т. п.

[00137] Чтобы преодолеть проблему иммунного отторжения субъектом-реципиентом клеточных и/или тканевых трансплантатов, авторы изобретения разработали и раскрыли в данном документе нейральную клетку (включая клетки-прекурсоры и клетки-предшественники), которая является иммунорезистентной. Такие нейральные клетки не отторгаются иммунной системой субъекта-реципиента. Во многих случаях нейральные клетки избегают макрофагального фагоцитоза и/или микроглиального фагоцитоза после трансплантации субъекту-реципиенту. Во многочисленных случаях гипои иммуногенные нейральные клетки приживаются в нервной системе субъекта-реципиента, такой как центральная и периферическая нервная система, и не устраняются

посредством фагоцитоза макрофагами или микроглией, ими обоими.

[00138] В некоторых вариантах осуществления нейральные гипоиммуногенные клетки по представленной технологии не подвержены отторжению клетками врожденного иммунитета. В различных вариантах осуществления нейральные гипоиммуногенные клетки не восприимчивы к опосредованному NK-клетками лизису. Во многих вариантах осуществления нейральные гипоиммуногенные клетки не восприимчивы к поглощению макрофагами. Во многих вариантах осуществления нейральные гипоиммуногенные клетки не восприимчивы к поглощению микроглией. В некоторых вариантах осуществления нейральные гипоиммуногенные клетки остаются привитыми в организме субъекта-реципиента после повреждения или нарушения гематоэнцефалического барьера пациента. В некоторых вариантах осуществления нейральные гипоиммуногенные клетки применимы как источник универсально совместимых клеток или тканей (например, универсальных донорных клеток или тканей), которые можно трансплантировать субъекту-реципиенту с необходимостью в небольшом количестве иммуносупрессивного агента или без необходимости в нем. Такие нейральные гипоиммуногенные клетки сохраняют клеточно-специфические характеристики и признаки после трансплантации.

[00139] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложены стволовые клетки или дифференцированные из них нейральные клетки, которые избегают иммунного распознавания и отторжения после введения несовместимому по ГКГС аллогенному реципиенту. В некоторых случаях нейральные клетки, полученные из стволовых клеток по представленной технологии избегают иммунного распознавания при введении (например, трансплантации или прививании) несовместимому по ГКГС аллогенному реципиенту. Другими словами, стволовые клетки и нейральные клетки, полученные из таких стволовых клеток, являются гипоиммуногенными. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные стволовые клетки и нейральные клетки по представленной технологии имеют сниженную иммуногенность (например, по меньшей мере на 2,5%-99% меньшую иммуногенность) по сравнению с соответствующими клетками дикого типа. В некоторых случаях у гипоиммуногенных стволовых клеток отсутствует иммуногенность по сравнению с соответствующими клетками дикого типа. Таким образом, нейральные клетки, дифференцированные из таких стволовых клеток являются пригодными как универсальные донорные клетки для трансплантации или прививания пациенту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления такие клетки являются неиммуногенными для пациента-человека.

Определения

[00140] В контексте представленной технологии будут использоваться следующие термины, которые определены, как указано ниже.

[00141] Используемый в данном документе для характеристики клетки термин «гипоиммуногенная» в общем случае означает, что такая клетка менее подвержена иммунному отторжению субъектом, которому трансплантированы такие клетки. Например, по отношению к неизменной или немодифицированной клетке дикого типа

такая гипоиммуногенная клетка может быть на около 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более менее подверженной иммунному отторжению субъектом, которому трансплантированы такие клетки. В некоторых вариантах осуществления используют технологии редактирования генома для модуляции экспрессии генов ГКГС I и ГКГС II и, таким образом, создают гипоиммуногенную клетку. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка избегает иммунного отторжения в организме несовместимого по ГКГС аллогенного реципиента. В некоторых случаях дифференцированные клетки, полученные из гипоиммуногенных стволовых клеток, избегают иммунного отторжения при введении (например, трансплантации или прививании) несовместимому по ГКГС аллогенному реципиенту. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка защищена от опосредованного Т-клетками отторжения со стороны адаптивного иммунитета и/или отторжения клетками врожденного иммунитета.

[00142] Гипоиммуногенность клетки можно определить путем оценки иммуногенности клетки, например, способности клетки вызывать адаптивный и врожденный иммунные ответы. Такой иммунный ответ можно оценить с помощью анализов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления в анализе иммунного ответа оценивают эффект гипоиммуногенной клетки на пролиферацию Т-клеток, активацию Т-клеток, уничтожение Т-клетками, пролиферацию НК-клеток, активацию НК-клеток и активность макрофагов. В некоторых случаях гипоиммуногенные клетки и их производные меньше подвергаются уничтожению Т-клетками и/или НК-клетками после введения субъекту. В некоторых случаях клетки и их производные демонстрируют сниженное поглощение макрофагами по сравнению с немодифицированными клетками или клетками дикого типа. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка вызывает сниженный или ослабленный иммунный ответ у субъекта-реципиента по сравнению с соответствующей немодифицированной клеткой дикого типа. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенная клетка является неиммуногенной или не способна вызывать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00143] В контексте данного документа термины «иммуносупрессивный фактор», или «иммунорегуляторный фактор», или «толерогенный фактор» включают факторы гипоиммуности, ингибиторы комплемента и другие факторы, которые модулируют или влияют на возможность распознавания клетки иммунной системой субъекта-хозяина или реципиента после введения, трансплантации или прививания.

[00144] В контексте данного документа термин «безопасный локус» относится к локусу гена, который обеспечивает безопасную экспрессию трансгена или экзогенного гена. Типовые «безопасные» локусы включают ген CCR5, ген CXCR4, ген PPP1R12C (также известный как AAVS1), ген альбумина, локус SHS231, ген CLYBL и ген Rosa (например, ROSA26). В целях настоящего изобретения термин «ген» включает область ДНК, кодирующую генный продукт, а также все области ДНК, которые регулируют

выработку генного продукта, независимо от того, являются ли такие регуляторные последовательности смежными с кодирующими и/или транскрибируемыми последовательностями. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничивается этим, промоторные последовательности, терминаторы, последовательности регуляции трансляции, такие как сайты связывания рибосом и внутренние сайты посадки рибосом, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, точки начала репликации, сайты прикрепления к матриксу и контрольные области локуса.

[00145] «Генная экспрессия» относится к преобразованию информации, содержащейся в гене, в генный продукт. Генный продукт может представлять собой продукт прямой транскрипции гена (например, мРНК, тРНК, рРНК, антисмысловую РНК, рибозим, структурную РНК или любой другой тип РНК) или белок, полученный посредством трансляции мРНК. Генные продукты также включают РНК, модифицированные такими процессами, как кэпирование, полиаденилирование, метилирование и редактирование, и белки, модифицированные, например, за счет метилирования, ацетилирования, фосфорилирования, убиквитинирования, АДФ-рибозилирования, миристиолирования и гликозилирования.

[00146] «Модуляция» генной экспрессии относится к изменению уровня экспрессии гена. Модуляция экспрессии может включать, но не ограничивается этим, активацию гена и репрессию гена. Модуляция также может быть полной, т. е. при которой экспрессия гена полностью инактивирована или активирована до уровней дикого типа или ниже; или она может быть частичной, когда экспрессия гена частично снижена или частично активирована до некоторой доли уровней дикого типа.

[00147] Термины «функционально связанный» или «функциональным образом связанный» используют взаимозаменяемо в связи с взаимным размещением двух или более компонентов (таких как элементы последовательности), при котором компоненты расположены так, что оба компонента функционируют нормально и обеспечивают возможность того, что по меньшей мере один из компонентов может опосредовать функцию, выполняемую по меньшей мере одним из других компонентов. В качестве иллюстрации, транскрипционная регуляторная последовательность, такая как промотор, функционально связана с кодирующей последовательностью, если транскрипционная регуляторная последовательность контролирует уровень транскрипции кодирующей последовательности в ответ на присутствие или отсутствие одного или более транскрипционных регуляторных факторов. Транскрипционная регуляторная последовательность обычно функционально связана в цис-положении с кодирующей последовательностью, но не обязательно должна непосредственно граничить с ней. Например, энхансер представляет собой транскрипционную регуляторную последовательность, которая функционально связана с кодирующей последовательностью, даже если они не являются смежными.

[00148] «Вектор» или «конструкция» способны переносить последовательности генов в клетки-мишени. Как правило, «векторная конструкция», «экспрессионный вектор»

и «вектор для переноса гена» означают любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную управлять экспрессией представляющего интерес гена, которая может переносить последовательности генов в клетки-мишени. Таким образом, этот термин включает клонирующие и экспрессионные носители, а также интегрирующиеся векторы. Способы внесения векторов или конструкций в клетки известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются этим, липид-опосредованный перенос (т. е. липосомы, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, прямую инъекцию, слияние клеток, бомбардировку частицами, соосаждение фосфатом кальция, опосредованный ДЭАЭ-декстраном перенос и опосредованный вирусным вектором перенос.

[00149] В контексте данного документа «плюрипотентные стволовые клетки» обладают потенциалом к дифференцировке в любой из трех зародышевых слоев: энтодерму (например, слизистую оболочку желудка, желудочно-кишечный тракт, легкие и т. д.), мезодерму (например, мышцы, кости, кровь, ткани мочеполовой системы и т. д.) или эктодерму (например, эпидермальные ткани и ткани нервной системы). В контексте данного документа термин «плюрипотентные стволовые клетки» также включает «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки», или «iPSC», или тип плюрипотентных стволовых клеток, полученных из неплюрипотентных клеток. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку получают или создают из клетки, которая не является плюрипотентной клеткой. Другими словами плюрипотентные стволовые клетки могут представлять собой прямое или не прямое потомство неплюрипотентной клетки. Примеры родительских клеток включают соматические клетки, которые были перепрограммированы для индукции плюрипотентного недифференцированного фенотипа различными способами. Такие «iPS» или «iPSC» клетки можно создавать посредством индукции экспрессии определенных регуляторных генов или посредством экзогенного применения определенных белков. Способы индукции iPSC клеток известны в данной области техники и дополнительно описаны ниже. (Смотрите, например, Zhou et al., *Stem Cells* 27 (11): 2667-74 (2009); Huangfu et al., *Nature Biotechnol.* 26 (7): 795 (2008); Woltjen et al., *Nature* 458 (7239): 766-770 (2009); и Zhou et al., *Cell Stem Cell* 8:381-384 (2009); каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки). Генерация индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) описана ниже. В контексте данного документа «hiPSC» представляет собой человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

[00150] Под «HLA» или «лейкоцитарным антигеном человека» подразумевается генный комплекс, кодирующий белки главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) у человека. Эти белки клеточной поверхности, составляющие комплекс HLA, отвечают за регуляцию иммунного ответа на антигены. У людей существует два ГКГС, класс I и класс II, «HLA-I» и «HLA-II». HLA-I включает три белка, HLA-A, HLA-B и HLA-C, которые презентуют пептиды внутри клетки, а антигены, презентуемые комплексом HLA-I,

привлекают киллерные Т-клетки (также известные как CD8⁺ Т-клетки или цитотоксические Т-клетки). Белки HLA-I связаны с микроглобулином β -2 (B2M). HLA-II включает пять белков, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR, которые презентуют антигены за пределами клетки Т-лимфоцитам. Это стимулирует CD4⁺ клетки (также известные как Т-хелперные клетки). Следует понимать, что использование терминов «ГКГС» или «HLA» не подразумевает ограничения, поскольку это зависит от того, получены гены от человека (HLA) или мыши (ГКГС). Таким образом, в отношении клеток млекопитающих эти термины можно взаимозаменяемо использовать в данном документе.

[00151] В контексте данного документа термины «прививание», «введение», «внесение», «имплантация» и «трансплантация», а также их грамматические вариации, используются взаимозаменяемо в контексте помещения клеток (например, описанных в данном документе клеток) в организм субъекта методом или путем, который приводит к по меньшей мере частичной локализации внесенных клеток в необходимом участке. Клетки можно имплантировать непосредственно в необходимый участок или, в альтернативном варианте, вводить любым подходящим путем, который приводит к доставке в необходимый участок организма субъекта, при этом по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от нескольких часов, например двадцать четыре часа, до нескольких дней и даже до нескольких лет. В некоторых вариантах осуществления клетки также можно вводить (например, инъектировать) в место, отличное от необходимого участка, например, в головной мозг или подкожно, например, в капсуле, чтобы сохранить имплантированные клетки в месте имплантации и избежать миграции имплантированных клеток.

[00152] В контексте данного документа термин «лечение» включает введение субъекту эффективного количества описанных в данном документе клеток так, чтобы у субъекта наблюдалось ослабление по меньшей мере одного симптома заболевания (расстройства или состояния) или улучшение в заболевании, например, благоприятные или необходимые клинические результаты. В целях этой технологии благоприятные или необходимые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, облегчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), выявляемые или невыявляемые. Лечение может относиться к продлению выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения. Таким образом, специалист в данной области техники понимает, что лечение может улучшить болезненное состояние, но может не обеспечивать полное излечение заболевания. В некоторых вариантах осуществления происходит облегчение одного или более симптомов заболевания или расстройства по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей

мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50% после лечения заболевания. В целях этой технологии благоприятные или необходимые клинические результаты лечения заболевания включают, но не ограничиваются этим, облегчение одного или более симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизацию (т. е. отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение заболевания. Применимо к выделенной клетке этот термин включает подвергание клетки процессу или условиям любого типа или проведение с клеткой манипуляций или процедур любого типа. Применимо к субъекту этот термин относится к введению индивиду клетки или популяции клеток, в которых целевая полинуклеотидная последовательность (например, B2M) была изменена *ex vivo* в соответствии со способами, описанными в данном документе. Индивид, как правило, болен или травмирован, или подвержен повышенному риску заболеть по сравнению со среднестатистическим членом популяции, и нуждается в таком уходе, лечении или терапии.

[00153] В контексте данного документа термин «неврологическое расстройство» или «неврологическое состояние» определяется как расстройство или состояние, которое поражает центральную нервную систему, периферическую нервную систему или их обе, включая любые их клетки или ткани. В отношении способов, клеток и композиций по изобретению, неврологическое расстройство или состояние может представлять собой любое неврологическое расстройство или состояние, включая любое из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, любое нарушение мозгового кровообращения, любое неврологическое расстройство или состояние у взрослых, любое неврологическое расстройство или состояние у детей, любое наследственное неврологическое расстройство или состояние, наследственную лейкодистрофию, врожденную дисмиелинизацию, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, метаболическую лейкодистрофию, болезнь исчезающего белого вещества, адренолейкодистрофию, болезнь Канавана, любую лизосомную болезнь накопления, болезнь Тея-Сакса, болезнь Сандхоффа, болезнь Краббе, болезнь Баттена, метахроматическую лейкодистрофию, церебральный паралич, перивентрикулярную лейкомаляцию, спастическую диплегию недоношенных, возрастную потерю белого вещества, подкорковую деменцию, любую сосудистую лейкоэнцефалопатию, подкорковый инсульт, диабетическую лейкоэнцефалопатию, гипертензивную лейкоэнцефалопатию, повреждение спинного мозга, аутоиммунную демиелинизацию, прогрессирующий рассеянный склероз, поперечный миелит, воспалительную демиелинизацию, токсичность, вызванную облучением, любое нейродегенеративное заболевание, болезнь Хантингтона, БАС, лобно-височную деменцию и т. п.

[00154] В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления представленная технология предусматривает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей любым способом, известным специалисту в данной области

техники, например, используя системы на основе нуклеаз, такие как система на основе эффекторной нуклеазы TAL (TALEN) или цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). Следует понимать, что хотя примеры способов, в которых используют CRISPR/Cas (например, Cas9 и Cas12a) и TALEN, подробно описаны в данном документе, представленная технология не ограничена применением этих способов/систем. В рамках данного документа можно использовать другие способы нацеливания, например B2M, для снижения или устранения экспрессии в клетках-мишенях, известные специалистам в данной области техники.

[00155] Способы по представленной технологии можно использовать для изменения целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Представленная технология предусматривает изменение целевых полинуклеотидных последовательностей в клетке в любых целях. В некоторых вариантах осуществления целевую полинуклеотидную последовательность в клетке изменяют для получения сконструированной клетки. В контексте данного документа термин «сконструированная клетка» или «модифицированная клетка» относится к клетке с результирующим генотипом, который отличается от ее исходного генотипа. В некоторых случаях «сконструированная клетка» демонстрирует измененный фенотип, например, когда нормально функционирующий ген изменен с использованием систем CRISPR/Cas по представленной технологии. В других случаях «сконструированная клетка» демонстрирует фенотип дикого типа, например, когда систему CRISPR/Cas по представленной технологии используют для коррекции мутантного генотипа. В некоторых вариантах осуществления целевую полинуклеотидную последовательность в клетке изменяют для коррекции или исправления генетической мутации (например, для восстановления нормального фенотипа клетки). В некоторых вариантах осуществления целевую полинуклеотидную последовательность в клетке изменяют, чтобы индуцировать генетическую мутацию (например, чтобы нарушить функцию гена или геномного элемента).

[00156] В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой индел. В контексте данного документа «индел» относится к мутации в результате вставки, делеции или их комбинации. Как известно специалистам в данной области техники, индел в кодирующей области геномной последовательности приводит к мутации со сдвигом рамки, если длина индела не кратна трем. В некоторых вариантах осуществления изменение представляет собой точечную мутацию. В контексте данного документа «точечная мутация» относится к замене с замещением одного из нуклеотидов. Систему CRISPR/Cas можно использовать для индукции индела любой длины или точечной мутации в целевой полинуклеотидной последовательности.

[00157] В контексте данного документа «нокаут» включает делецию всей или части целевой полинуклеотидной последовательности так, чтобы это препятствовало функции целевой полинуклеотидной последовательности. Например, нокаут можно обеспечить путем изменения целевой полинуклеотидной последовательности путем индукции индела

в целевой полинуклеотидной последовательности в функциональном домене целевой полинуклеотидной последовательности (например, ДНК-связывающем домене). Специалисты в данной области техники без проблем поймут, как использовать системы CRISPR/Cas для нокаута целевой полинуклеотидной последовательности или ее части, на основании подробной информации, описанной в данном документе.

[00158] В некоторых вариантах осуществления изменение приводит к нокауту целевой полинуклеотидной последовательности или ее части. В ряде применений может быть полезен нокаут целевой полинуклеотидной последовательности или ее части с помощью системы CRISPR/Cas. Например, нокаут целевой полинуклеотидной последовательности в клетке можно проводить *in vitro* в исследовательских целях. В *ex vivo* целях нокаут целевой полинуклеотидной последовательности в клетке может быть полезен для лечения или предотвращения расстройства, связанного с экспрессией целевой полинуклеотидной последовательности (например, за счет нокаута мутантной аллели в клетке *ex vivo* и введения этих клеток, содержащих нокаутированную мутантную аллель субъекту).

[00159] Под «нокином» в данном документе подразумевается процесс, который добавляет генетическую функцию в клетке-хозяине. Это вызывает повышение уровней генного продукта с нокином, например РНК или кодируемого белка. Как понятно специалистам в данной области техники, это можно осуществлять несколькими способами, включая добавление одной или более дополнительных копий гена в клетку-хозяина или изменение регуляторного компонента эндогенного гена, повышающего экспрессию белка. Это можно осуществлять посредством модификации промотора, добавления другого промотора, добавления энхансера или модификации других экспрессионных последовательностей генов.

[00160] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе изменение или модификация приводят к снижению экспрессии целевой или выбранной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе изменение или модификация приводят к снижению экспрессии целевой или выбранной полипептидной последовательности.

[00161] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе изменение или модификация приводят к повышению экспрессии целевой или выбранной полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе изменение или модификация приводят к повышению экспрессии целевой или выбранной полинуклеотидной последовательности.

[00162] Термины «снижение», «уменьшенный», «уменьшение» и «сниженный» используют в данном документе, как правило, для обозначения снижения на статистически значимую величину. Однако, во избежание сомнений, «снижение», «уменьшенный», «уменьшение», «сниженный» означает снижение по меньшей мере на 10% по сравнению с эталонным уровнем или эталонной клеткой, например, снижение по меньшей мере на около 20%, или по меньшей мере на около 30%, или по меньшей мере на

около 40%, или по меньшей мере на около 50%, или по меньшей мере на около 60%, или по меньшей мере на около 70%, или по меньшей мере на около 80%, или по меньшей мере на около 90%, или до и включая снижение на 100% (т. е. до отсутствия уровня по сравнению с эталонным образцом), или любое снижение на 10-100% по сравнению с эталонным уровнем или эталонной клеткой.

[00163] Термины «увеличенный», «увеличивать», «усиливать» или «активировать» используют в данном документе в общем случае для обозначения увеличения на статически значимую величину; во избежание каких-либо сомнений, термины «увеличенный», «увеличивать», «усиливать» или «активировать» означают увеличение по меньшей мере на 10% по сравнению с эталонным уровнем, например увеличение по меньшей мере на около 20%, или по меньшей мере на около 30%, или по меньшей мере на около 40%, или по меньшей мере на около 50%, или по меньшей мере на около 60%, или по меньшей мере на около 70%, или по меньшей мере на около 80%, или по меньшей мере на около 90%, или до и включая увеличение на 100%, или любое увеличение на 10-100% по сравнению с эталонным уровнем, или по меньшей мере в около 2 раза, или по меньшей мере в около 3 раза, или по меньшей мере в около 4 раза, или по меньшей мере в около 5 раз, или по меньшей мере в около 10 раз, или любое увеличение в 2-10 раз или более по сравнению с эталонным уровнем.

[00164] В контексте данного документа подразумевается, что термин «экзогенный» обозначает, что указанная молекула или указанный полипептид вносят в представляющую интерес клетку. Полипептид можно вносить, например, посредством внесения кодирующей нуклеиновой кислоты в генетический материал клеток, например посредством интеграции в хромосому, или в виде нехромосомного генетического материала, такого как плазида или экспрессионный вектор. Следовательно, этот термин в отношении экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты относится к внесению кодирующей нуклеиновой кислоты в экспрессируемой форме в клетку. Экзогенная молекула включает молекулу, конструкцию, фактор и т. п., которые обычно не присутствуют в клетке, но могут быть внесены в клетку одним или более генетическими, биохимическими или другими способами. «Нормальное присутствие в клетке» определяется с учетом конкретного этапа развития и условий окружающей клетки среды. Таким образом, например, молекула, присутствующая только во время эмбрионального развития нейронов, является экзогенной молекулой по отношению к взрослой нейронной клетке. Экзогенная молекула может включать, например, функционирующую версию эндогенной молекулы с нарушением функции или версию с нарушением функции нормально функционирующей эндогенной молекулы. Экзогенная молекула или фактор могут представлять собой, помимо прочего, малую молекулу, такую как получаемая в результате комбинаторного химического процесса, или макромолекулу, такую как белок, нуклеиновая кислота, углевод, липид, гликопротеин, липопротеин, полисахарид, любое модифицированное производное вышеуказанных молекул или любой комплекс, содержащий одну или более вышеуказанных молекул. Нуклеиновые кислоты включают

ДНК и РНК, могут быть одноцепочечными или двухцепочечными; могут быть линейными, разветвленными или кольцевыми; и могут иметь любую длину. Нуклеиновые кислоты включают те, которые способны образовывать двойные спирали, а также нуклеиновые кислоты, образующие тройные спирали. Смотрите, например, патенты США №№ 5176996 и 5422251. Белки включают, но не ограничиваются этим, ДНК-связывающие белки, транскрипционные факторы, факторы ремоделирования хроматина, метилированные ДНК-связывающие белки, полимеразы, метилазы, деметилазы, ацетилазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, интегразы, рекомбиназы, лигазы, топоизомеразы, гиразы и геликазы.

[00165] Термин «эндогенный» относится к указанным молекуле или полипептиду, которые присутствуют в клетке. Аналогично, этот термин в отношении экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты относится к экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты, содержащейся внутри клетки, а не внесенной экзогенно.

[00166] Термин процент «идентичности» в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов относится к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые имеют определенный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, по определению с помощью одного из алгоритмов сравнения последовательностей, описанных ниже (например, BLASTP и BLASTN или другие алгоритмы, доступные специалистам), или визуального осмотра. В зависимости от применения процент «идентичности» может относиться к области сравниваемой последовательности, например, протяжению функционального домена, или, в альтернативном варианте, относится ко всей длине двух сравниваемых последовательностей. При сравнении последовательностей, как правило, одна последовательность служит эталонной последовательностью, с которой сравнивают исследуемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей исследуемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, при необходимости указывают координаты подпоследовательности и указывают программные параметры алгоритма для работы с последовательностями. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для исследуемой(ых) последовательности(ей) в сравнении с эталонной последовательностью на основании указанных программных параметров.

[00167] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритма выравнивания областей гомологии по Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), метода поиска сходства по Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) или визуального осмотра (в общем случае смотрите Ausubel et al., ниже).

[00168] Одним из примеров алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в Altschul et al, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализа BLAST находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации.

[00169] Термины «субъект» и «индивид» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к животному, например человеку, от которого можно получать клетки и/или в отношении которого применяют лечение, включая профилактическое лечение, клетками, описанными в данном документе. В случае лечения тех инфекций, состояний или болезненных состояний, которые являются специфическими для конкретного животного, такого как человек, термин «субъект» относится к этому конкретному животному. Термины «отличные от человека животные» и «отличные от человека млекопитающие», взаимозаменяемо используемые в данном документе, включают млекопитающих, таких как крысы, мыши, кролики, овцы, кошки, собаки, коровы, свиньи и отличные от человека приматы. Термин «субъект» также охватывает любое позвоночное животное, включая, но не ограничиваясь этим, млекопитающих, рептилий, земноводных и рыб. При этом субъект преимущественно представляет собой млекопитающее, такое как человек или другие млекопитающие, такие как одомашненное млекопитающее, например собака, кошка, лошадь и т. п., или сельскохозяйственное млекопитающее, например, корова, овца, свинья и т. п.

[00170] Следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключать любой необязательный элемент. Следовательно, подразумевается, что данное утверждение служит в качестве предварительного основания для использования такой исключительной терминологии, как «единственно», «только» и т. п. в связи с указанием элементов формулы изобретения или использования «отрицательного» ограничения. Как станет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения этого описания, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в данном документе, имеет дискретные компоненты и признаки, которые легко отделить от признаков или объединить с признаками любого из других нескольких вариантов осуществления, не выходя за рамки объема или сущности представленной технологии. Любой изложенный способ можно выполнять в порядке изложения событий или в любом другом логически возможном порядке. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в данном документе, также можно использовать при практической реализации или тестировании технологии, далее описаны репрезентативные иллюстративные способы и материалы.

[00171] Перед тем как продолжить описание представленной технологии, необходимо принять во внимание, что данная технология не ограничена конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена для описания только некоторых вариантов осуществления и не

подразумевает ограничения, поскольку объем представленной технологии ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

[00172] Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится представленная технология. В случае, когда приведен диапазон значений, следует понимать, что представленная технология охватывает каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в представленную технологию за исключением любого явным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба этих включенных предела, также включены в представленную технологию. Определенные диапазоны представлены в данном документе числовыми значениями, которым предшествует термин «около». В контексте данного документа термин «около» означает точное число, которому он предшествует, а также числа, которые близки или приблизительно соответствуют числу, которому предшествует этот термин. При определении того, является ли число близким или приблизительным к конкретно указанному числу, близкое или приблизительное неуказанное число может представлять собой число, которое в данном контексте является по существу эквивалентным конкретно указанному числу.

[00173] Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в этом описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны для включенные посредством ссылки. Кроме того, каждая цитируемая публикация, патент или патентная заявка включены в данный документ посредством ссылки в отношении раскрытия и описания предмета, в связи с которым эти публикации процитированы. Цитирование любой публикации соответствует ее раскрытию до даты подачи заявки и ее не следует воспринимать как признание того, что представленная технология не имеет права датировать такую публикацию более ранним числом в силу предыдущей технологии. Более того, даты приведенных публикаций могут отличаться от фактических дат публикаций, что может потребовать независимого подтверждения.

Подробное описание вариантов осуществления

Гипоиммуногенные нейральные клетки, полученные из плюрипотентных стволовых клеток

[00174] В данном документе предложены гипоиммуногенные нейральные клетки и нейральные клетки-предшественники, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейроны, нейрональные клетки-предшественники, дофаминергические нейроны,

дофаминергические нейрональные клетки-предшественники, глиальные клетки, глиальные клетки-предшественники, эпендимные клетки, эпендимные клетки-предшественники, астроциты, клетки-предшественники астроцитов, микроглиальные клетки, микроглиальные клетки-предшественники, олигодендроциты, клетки-предшественники олигодендроцитов, шванновские клетки и шванновские клетки-предшественники. Специалисту в данной области техники понятно, что нейральные клетки охватывают все и каждый тип клеток нервной системы, включая клетки каждой нейральной линии дифференцировки. Смотрите, например, Ma et al., *Cur Opin Neurobio*, 2018, 50:7-16 в отношении подробного описания типовых линий дифференцировки нейральных клеток в головном мозге млекопитающих.

[00175] В некоторых вариантах осуществления любые гипои иммуногенные нейральные клетки, описанные в данном документе, избегают микроглиального фагоцитоза. Микроглия представляет собой тип нейроглии (глиальных клеток), локализованных по всему головному и спинному мозгу. Как резидентные макрофаг-подобные клетки, они могут действовать как первая и главная форма активной иммунной защиты в центральной нервной системе (ЦНС). Известно, что SIRP α ингибирует микроглиальную фагоцитарную активность, так как поглощение миелина повышается, когда микроглиальный SIRP α заблокирован антителами или нокаутирован SIRP α -кшПНК (Gitik et al., *J Neuroinflammation*. 2011 Mar 15; 8:24). Считается, что это ингибирующее свойство SIRP α является критически важным для поддержания целостности миелина в нормальных условиях или после незначительного повреждения головного мозга. Однако ингибирующее свойство SIRP α может быть нежелательным при массивных повреждениях или дегенерации головного мозга, когда важен быстрый клиренс поврежденного миелина. Взаимодействие между CD47 на миелине и SIRP α играет роль в этом пути (смотрите, например, Gitik et al., 2011). Клетки, описанные в данном документе, можно применять для прививания субъекту-реципиенту без индукции нейровоспалительного ответа, такого как микроглиальный ответ, на трансплантированные клетки.

[00176] В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки избегают иммунного распознавания и иммунных ответов при введении субъекту. Эти клетки могут избегать уничтожения иммунными клетками *in vitro* и *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления эти клетки избегают уничтожения макрофагами, микроглиальными клетками и НК-клетками. В некоторых вариантах осуществления эти клетки игнорируются иммунными клетками иммунной системы субъекта, включая нейровоспалительную систему. В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки не способны рекрутировать и/или активировать микроглиальные клетки к месту трансплантации или прививания. В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки не способны стимулировать или индуцировать пролиферацию микроглиальных клеток в месте трансплантации или прививания. В некоторых вариантах осуществления микроглиальные клетки субъекта-реципиента не инфильтрируют место трансплантации или прививания, содержащее нейральные клетки.

[00177] Способы определения того, избегает ли нейральная клетка иммунного распознавания, включают, но не ограничиваются этим, анализ Elispot IFN- γ , анализ уничтожения микроглией, животные модели прививания клеток, анализ высвобождения цитокинов, ELISA, анализы уничтожения с использованием биолюминесцентной визуализации или анализ высвобождения хрома, или анализ Xcelligence®, реакцию смешанной культуры лимфоцитов, иммунофлуоресцентный анализ и т. д.

[00178] Гипоиммуногенные нейральные клетки получают из плюрипотентных стволовых клеток, включая, но не ограничиваясь этим, плюрипотентные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, которые избегают иммунного распознавания или иммунного ответа субъекта-реципиента. Такие гипоиммуногенные нейральные клетки могут избегать фагоцитоза нейроиммунными клетками в организме. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки избегают опосредованного микроглией уничтожения их самих после введения субъекту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки избегают опосредованного макрофагами уничтожения их самих после введения субъекту-реципиенту. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I. В других вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса II. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и II. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и демонстрировала повышенную экспрессию CD47. В некоторых случаях клетка сверхэкспрессирует CD47 за счет наличия в ней одного или более трансгенов CD47. В некоторых вариантах осуществления плюрипотентную стволовую клетку модифицируют так, чтобы она демонстрировала сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и демонстрировала повышенную экспрессию CD24. В некоторых случаях клетка сверхэкспрессирует CD24 за счет наличия в ней одного или более трансгенов CD24. Такие плюрипотентные стволовые клетки являются гипоиммуногенными плюрипотентными клетками.

[00179] Любые плюрипотентные стволовые клетки по представленной технологии можно дифференцировать в нейральные клетки. В некоторых вариантах осуществления нейральная клетка демонстрирует сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II. В некоторых случаях экспрессия лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II снижена по сравнению с немодифицированными нейральными клетками или клетками дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки демонстрируют повышенную экспрессию

CD47 или CD24. В некоторых случаях экспрессия CD47 повышена по сравнению с немодифицированными нейральными клетками или клетками дикого типа. Способы снижения уровней лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и повышения экспрессии CD47 и CD24 описаны в данном документе.

[00180] Нейральные клетки и их предшественников можно использовать для лечения различных неврологических расстройств и состояний.

[00181] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, глиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для улучшения состояния при инсульте или его лечения. В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки и/или их предшественников вводят субъекту, который пережил инсульт.

[00182] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки и/или их предшественников, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, глиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для облегчения симптома или эффекта бокового амиотрофического склероза (БАС). В некоторых вариантах осуществления нейроны, глиальные клетки и/или их предшественников вводят субъекту с БАС.

[00183] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки и/или их предшественников, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, глиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для облегчения симптома или эффекта внутримозгового кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки и/или их предшественников вводят субъекту, который пережил внутримозговое кровоизлияние.

[00184] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки и/или их предшественников, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, глиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для облегчения симптома или эффекта болезни Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления дофаминергические нейроны и/или их предшественников вводят субъекту с болезнью

Паркинсона.

[00185] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки и/или их предшественников, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, норадренергические нейроны, ГАМК-эргические интернейроны, глиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники, норадренергические нейрональные предшественники, ГАМК-эргические интернейрональные предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для облегчения симптома или эффекта эпилептического припадка. В некоторых вариантах осуществления норадренергические нейроны, ГАМК-эргические интернейроны и/или их предшественников вводят субъекту, который пережил эпилептический припадок.

[00186] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки и/или их предшественников, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, двигательные нейроны, интернейроны, олигодендроциты, микроглиальные клетки, шванновские клетки, лиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники, предшественники двигательных нейронов, предшественники интернейронов, предшественники олигодендроцитов, предшественники микроглии, шванновские клетки-предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для облегчения симптома или эффекта повреждения спинного мозга. В некоторых вариантах осуществления двигательные нейроны, интернейроны, шванновские клетки, олигодендроциты, микроглию и/или их предшественников вводят субъекту, который пережил повреждение спинного мозга.

[00187] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки и/или их предшественников, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, двигательные нейроны, интернейроны, олигодендроциты, микроглиальные клетки, шванновские клетки, лиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники, предшественники двигательных нейронов, предшественники интернейронов, предшественники олигодендроцитов, предшественники микроглии, шванновские клетки-предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для облегчения симптома или эффекта болезни Пелицеуса-Мерцбахера. В некоторых вариантах осуществления олигодендроциты и/или предшественников олигодендроцитов вводят субъекту с болезнью Пелицеуса-Мерцбахера.

[00188] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки и/или их предшественников, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, двигательные нейроны,

интернейроны, олигодендроциты, микроглиальные клетки, шванновские клетки, лиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники, предшественники двигательных нейронов, предшественники интернейронов, предшественники олигодендроцитов, предшественники микроглии, шванновские клетки-предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для облегчения симптома или эффекта прогрессирующего рассеянного склероза. В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки и/или нейральных предшественников вводят субъекту с прогрессирующим рассеянным склерозом.

[00189] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные нейральные клетки и/или их предшественников, включая, но не ограничиваясь этим, церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминовые нейроны, двигательные нейроны, интернейроны, олигодендроциты, микроглиальные клетки, шванновские клетки, лиальные клетки, церебральные эндотелиальные клетки-предшественники, нейрональные предшественники, дофаминовые нейрональные предшественники, предшественники двигательных нейронов, предшественники интернейронов, предшественники олигодендроцитов, предшественники микроглии, шванновские клетки-предшественники и глиальные клетки-предшественники, описанные в данном документе, вводят субъекту для облегчения симптома или эффекта болезни Хантингтона. В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки и/или нейральных предшественников вводят субъекту с болезнью Хантингтона.

Способы дифференцировки для создания нейральных клеток

[00190] В данном документе предложены разные типы нейральных клеток, дифференцированных из гипоиммунных плюрипотентных стволовых клеток, включая гипоиммунные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Эти типы нейральных клеток применимы для последующей трансплантации или прививанию нуждающимся в этом субъектам. Как понятно специалистам в данной области техники, способы дифференцировки зависят от необходимого типа клеток с использованием известных технологий.

[00191] В некоторых вариантах осуществления дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток, таких как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, осуществляют посредством воздействия на клетки или приведения клеток в контакт со специфическими факторами, которые, как известно, позволяют получать конкретные линии дифференцировки клеток, так, чтобы направить их дифференцировку на конкретные, необходимые линии и/или тип клеток, представляющие интерес. В некоторых вариантах осуществления окончательно дифференцированные нейральные клетки демонстрируют специализированные фенотипические характеристики или признаки. В определенных вариантах осуществления плюрипотентные стволовые клетки дифференцируют в нейроэктодермальные клетки, нейрональные клетки, нейроэндокринные клетки, дофаминергические нейроны, холинергические нейроны,

серотонинергические нейроны, глутаматергические нейроны, ГАМК-эргические нейроны, адренергические, норадренергические нейроны, симпатические нейроны, парасимпатические нейроны, симпатические периферические нейроны, глиальные клетки, их предшественников или их прекурсоров. В некоторых случаях глиальные клетки включают микроглиальные (например, амeboидные, разветвленные, активированные фагоцитарные и активированные нефагоцитарные) клетки или макроглиальные клетки (клетки центральной нервной системы: астроциты, олигодендроциты, эпендимные клетки и радиальную глию; и клетки периферической нервной системы: шванновские клетки и сателлитные клетки), их прекурсоров и предшественников любых из вышеперечисленных клеток.

[00192] Протоколы по созданию разных типов нейральных клеток описаны в заявке РСТ № WO2010144696, патентах США №№ 9057053; 9376664; и 10233422. Дополнительные описания способов дифференцировки гипои иммуногенных плюрипотентных клеток можно найти, например, в Deuse et al., *Nature Biotechnology*, 2019, 37, 252-258 и Han et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(21), 10441-10446.

1. Создание церебральных эндотелиальных клеток

[00193] В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки (ЭК), их прекурсоров и предшественников дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток (например, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток) на поверхности путем культивирования клеток в среде, содержащей один или более факторов, которые способствуют созданию церебральных ЭК или нейральных клеток. В некоторых случаях среда содержит один или более из следующих факторов: CHIR-99021, VEGF, основной FGF и Y-27632. В некоторых случаях среда содержит добавку, предназначенную для стимуляции выживаемости и функциональности нейральных клеток.

[00194] В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки (ЭК), их прекурсоров и предшественников дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток на поверхности путем культивирования клеток в некondиционированной или кондиционированной среде. В некоторых случаях среда содержит факторы или малые молекулы, которые стимулируют или облегчают дифференцировку. В некоторых вариантах осуществления среда содержит один или более факторов или малых молекул, выбранных из группы, состоящей из VEGFR, FGF, SDF-1, CHIR-99021, Y-27632, SB 431542, и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления поверхность для дифференцировки содержит один или более белков внеклеточного матрикса. Поверхность может быть покрыта одним или более белками внеклеточного матрикса. Клетки можно дифференцировать в суспензии, а затем помещать в форму гелевой матрицы, такой как матригель, желатин или фибрин/тромбин, чтобы способствовать выживаемости клеток. В некоторых случаях дифференцировку анализируют, как известно в данной области техники, в общем случае путем оценки присутствия клеточно-специфических маркеров.

[00195] В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки экспрессируют или секретируют фактор, выбранный из группы, состоящей из CD31, VE кадгерина и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления церебральные эндотелиальные клетки экспрессируют или секретируют один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из CD31, CD34, CD45, CD117 (c-kit), CD146, CXCR4, VEGF, SDF-1, PDGF, GLUT-1, PECAM-1, eNOS, клаудина-5, окклюдина, ZO-1, р-гликопротеина, фактора фон Виллебранда, VE-кадгерина, рецептора липопротеинов низкой плотности LDLR, белка 1, связанного с рецептором липопротеинов низкой плотности LRP1, инсулинового рецептора INSR, лептинового рецептора LEPR, молекулы адгезии базальных клеток BCAM, рецептора трансферрина TFRC, рецептора, специфического к конечному продукту гликирования, AGER, рецептора поглощения ретинола STRA6, малой субъединицы 1 транспортера крупных нейтральных аминокислот SLC7A5, транспортера возбуждающих аминокислот 3 SLC1A1, натрий-сопряженного транспортера нейтральных аминокислот 5 SLC38A5, члена 1 семейства 16 транспортеров растворенных веществ SLC16A1, АТФ-зависимой транслоказы ABCB1, транспортера АТФ-ABCC2-связывающей кассеты ABCG2, белка 1, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC1, канальчатого мультиспецифического транспортера органических анионов 1 ABCC2, белка 4, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC4, и белка 5, связанного с множественной лекарственной резистентностью, ABCC5.

[00196] В некоторых вариантах осуществления церебральные ЭК характеризуются одним или более признаками, выбранными из группы, состоящей из высокой экспрессии плотных соединений, высокого электрического сопротивления, низкой фенестрации, небольшого периваскулярного пространства, высокой распространенности рецепторов инсулина и трансферрина и большого числа митохондрий.

[00197] В некоторых вариантах осуществления церебральные ЭК отбирают или очищают, используя стратегию положительного отбора. В некоторых случаях церебральные ЭК сортируют против маркера эндотелиальных клеток, такого как, но не ограничиваясь этим, CD31. Другими словами, выделяют CD31-положительные церебральные ЭК. В некоторых вариантах осуществления церебральные ЭК отбирают или очищают, используя стратегию отрицательного отбора. В некоторых вариантах осуществления недифференцированные плюрипотентные стволовые клетки удаляют посредством отбора в отношении клеток, которые экспрессируют маркер плюрипотентности, включая, но не ограничиваясь этим, TRA-1-60 и SSEA-1.

2. Создание нейронов, включая дофаминовые нейроны

[00198] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе гипоиммунные клетки представляют собой дофаминовые нейроны и включают нейрональные стволовые клетки, нейрональные клетки-предшественники, незрелые дофаминовые нейроны и зрелые дофаминовые нейроны, которые были дифференцированы из плюрипотентных стволовых клеток, таких как индуцированные

плюрипотентные стволовые клетки.

[00199] Дофаминовые нейроны (также называемые дофаминергическими нейронами) включают нейрональные клетки, которые экспрессируют тирозингидроксилазу (TH), ограничивающий скорость фермент для синтеза дофамина. В некоторых вариантах осуществления дофаминовые нейроны секретируют нейротрансмиттер дофамин и имеют низкую или отсутствующую экспрессию дофамингидроксилазы. Дофаминовый (DA) нейрон может экспрессировать один или более следующих маркеров: нейрон-специфическую энолазу (NSE), 1-ароматическую аминокислотную декарбоксилазу, везикулярный транспортер моноаминов 2, транспортер дофамина, Nurr1 и рецептор дофамина-2 (D2-рецептор).

[00200] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные DA нейроны, их прекурсоры и предшественники дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток путем культивирования стволовых клеток в среде, содержащий один или более факторов или добавок. Применимые факторы и добавки, которые способствуют дифференцировке, росту, размножению, сохранению и/или созреванию DA нейронов, включают, но не ограничиваются этим, Wntl, FGF2, FGF8, FGF8a, белок «ежик соник» (SHH), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), трансформирующий фактор роста α (TGF- α), TGF- β , интерлейкин 1 бета, нейротрофический фактор линии глиальных клеток (GDNF), ингибитор GSK-3 (например, CHIR-99021), ингибитор TGF- β (например, SB-431542), добавку B-27, дорсоморфин, пурморфамин, ноггин, ретиноевую кислоту, cAMP, аскорбиновую кислоту, нейротурин, заменитель сыворотки крови KnockOut, N-ацетилцистеин, лиганд c-kit, их модифицированные формы, их миметики, их аналоги и их варианты. В некоторых вариантах осуществления DA нейроны дифференцируют в присутствии одного или более факторов, которые активируют или ингибируют путь WNT, путь NOTCH, путь SHH, путь BMP, путь FGF и т. п.

[00201] Протоколы дифференцировки для создания DA нейронов и их предшественников и их подробные описания приведены, например, в WO2020/018615; патентах США №№ 9968637 и 7674620; Kim et al, Nature, 2002, 418,50-56; Bjorklund et al, PNAS, 2002, 99(4), 2344-2349; Grow et al., Stem Cells Transl Med. 2016, 5(9): 1133-44, и Cho et al, PNAS, 2008, 105:3392-3397, раскрытие которых в полном объеме, включая подробное описание примеров, способов, фигур и результатов, включено в данный документ посредством ссылки.

[00202] В некоторых вариантах осуществления популяцию гипоиммуногенных DA нейронов выделяют из отличных от нейрональных клеток. В некоторых вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных DA нейронов размножают перед введением. В определенных вариантах осуществления выделенную популяцию гипоиммуногенных DA нейронов размножают и криоконсервируют перед введением.

[00203] Чтобы охарактеризовать и пронаблюдать дифференцировку DA и оценить фенотип DA, можно оценивать экспрессию любого количества молекулярных и генетических маркеров. Например, наличие генетических маркеров можно определять

различными методами, известными специалистам в данной области техники. Экспрессию молекулярных маркеров можно определять с помощью количественных методов, таких как, но не ограничиваясь этим, анализы на основе кПЦР, иммуноанализы, иммуногистохимические анализы, иммуноблоттинг и т. п. Типовые маркеры для DA нейронов включают, но не ограничиваются этим, TH, бета-тубулин, спаренный бокс-белок (Pax6), белок-энхансер гена инсулина (Isl1), нестин, диаминобензидин (DAB), активируемый протеином G внутренний выпрямляющий калиевый канал 2 (GIRK2), белок, ассоциированный с микротрубочками 2 (MAP-2), Nurr1, транспортер дофамина (DAT), белок forkhead-бокса A2 (FOXA2), FOX3, даблкортин и транскрипционный фактор гомеобокса LIM 1-бета (LMX1B) и т. п. В некоторых вариантах осуществления DA нейроны экспрессируют один или более маркеров, выбранных из корина, FOXA2, TuJ1, NURR1 и любой их комбинации.

[00204] В некоторых вариантах осуществления DA нейроны оценивают в соответствии с электрофизиологической активностью клеток. Электрофизиологию клеток можно оценивать, используя анализы, известные специалистам в данной области техники. Например, цельноклеточный и перфорированный пэтч-кламп, анализы для выявления электрофизиологической активности клеток, анализы для измерения величины и длительности потенциала действия клеток и функциональные анализы для выявления выработки дофамина DA клетками.

[00205] В некоторых вариантах осуществления дифференцировка DA нейронов характеризуется спонтанными ритмическими потенциалами действия и высокочастотными потенциалами действия с адаптацией частоты повторения пиков после подачи деполяризующего тока. В других вариантах осуществления дифференцировка DA характеризуется выработкой дофамина. Вырабатываемый уровень дофамина рассчитывают путем измерения ширины потенциала действия в точке, в которой он достигает половины максимальной амплитуды (пиковая полумаксимальная ширина).

[00206] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные DA нейроны вводят пациенту, например пациенту-человеку, для лечения нейродегенеративного заболевания или состояния. В некоторых случаях нейродегенеративное заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Хантингтона и рассеянного склероза. В других вариантах осуществления DA нейроны используют для лечения или облегчения одного или более симптомов нейропсихического расстройства, такого как синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ), синдром Туретта (СТ), шизофрения, психоз и депрессия. В других вариантах осуществления DA нейроны используют для лечения пациента с дефективными DA нейронами.

[00207] В некоторых вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны трансплантируют внутривенно или путем инъекции в определенные участки тела пациента. В некоторых вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны трансплантируют в черное вещество (в частности, в компактную область или вблизи нее), вентральную область покрышки (ВОП), хвостатое ядро, скорлупу, прилежащее ядро,

субталамическое ядро или любую их комбинацию головного мозга для замещения DA нейронов, дегенерация которых привела к болезни Паркинсона. Дифференцированные DA клетки можно вводить в целевой участок в виде клеточной суспензии. В альтернативном варианте дифференцированные DA клетки можно заключать в поддерживающую матрицу или каркас, если они содержатся в таком устройстве доставки. В некоторых вариантах осуществления каркас является биоразлагаемым. В других вариантах осуществления каркас не является биоразлагаемым. Каркас может содержать природные или синтетические (искусственные) материалы.

[00208] Доставку DA нейронов можно осуществлять, используя подходящий носитель, такой как, но не ограничиваясь этим, липосомы, микрочастицы или микрокапсулы. В других вариантах осуществления дифференцированные DA нейроны вводят в фармацевтической композиции, содержащей изотонический эксципиент. Фармацевтическую композицию изготавливают в условиях, которые являются в достаточной степени стерильными для введения человеку. В некоторых вариантах осуществления DA нейроны, дифференцированные из гипоиммуногенных iPSC, предоставлены в форме фармацевтической композиции. Общие принципы терапевтических составов и композиций клеток можно найти в *Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy*, G. Morstyn & W. Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996, и *Hematopoietic Stem Cell Therapy*, E. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

[00209] Полезные описания различных типов нейрональных клеток, полученных из стволовых клеток, и способов их создания можно найти, например, в Kirkeby et al., *Cell Rep*, 2012, 1:703-714; Kriks et al., *Nature*, 2011, 480:547-551; Doi et al., *Stem Cell Reports*, 2014, 2, 337-50; Perrier et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101, 12543-12548; Chambers et al., *Nat Biotechnol*, 2009, 27, 275-280; Wang et al., *Stem Cell Reports*, 2018, 11(1):171-182; Lorenz Studer, "Chapter 8 - Strategies for Bringing Stem Cell-Derived Dopamine Neurons to the clinic-The NYSTEM Trial" в *Progress in Brain Research*, 2017, том 230, стр. 191-212; Liu et al., *Nat Protoc*, 2013, 8:1670-1679; Upadhyaya et al., *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 38, 2D.7.1-2D.7.47; публикации заявки США № 20160115448 и патентах США №№ 8252586; 8273570; 9487752 и 10093897, содержание которых в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[00210] Помимо DA нейронов, другие нейроны, их прекурсоров и предшественников дифференцируют из плюрипотентных стволовых клеток путем культивирования клеток в среде, содержащей один или более факторов, выбранных из группы, состоящей из GDNF, BDNF, GM-CSF, B27, основного FGF, основного EGF, NGF, CNTF, ингибитора SMAD, антагониста Wnt, активатора сигнализации SHH и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления ингибитор SMAD выбран из группы, состоящей из SB431542, LDN-193189, ноггина PD169316, SB203580, LY364947, A77-01, A-83-01, BMP4, GW788388, GW6604, SB-505124, лерделимумаба, метелимумаба, GC-I008,

AP-12009, AP-110I4, LY550410, LY580276, LY364947, LY2109761, SB-505124, E-616452 (ингибитора ALK RepSox), SD-208, SMI6, NPC-30345, K 26894, SB-203580, SD-093, активина-M108A, P144, растворимого TBR2-Fc, DMH-1, дорсоморфина дигидрохлорида и их производных. В некоторых вариантах осуществления антагонист Wnt выбран из группы, состоящей из XAV939, DKK1, DKK-2, DKK-3, Dkk-4, SFRP-1, SFRP-2, SFRP-5, SFRP-3, SFRP-4, WIF-1, Soggy, IWP-2, IWR1, ICG-001, KY0211, Wnt-059, LGK974, IWP-L6 и их производных. В некоторых вариантах осуществления активатор сигнализации SHH выбран из группы, состоящей из агониста Smoothened (SAG), аналога SAG, SHH, C25-SHH, C24-SHH, пурморфамин, Hg--Ag и их производных. В некоторых вариантах осуществления среда для дифференцировки содержит добавку или присадку для индукции нейрональной дифференцировки. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии добавки или присадки для индукции клеток вентральной пластинки. В некоторых вариантах осуществления добавка или присадка включает ингибитор BMP LDN193189, ингибитор ALK-5 A83-01, агонист Smoothened пурморфамин, FGF8, ингибитор GSK3 CHIR99021, нейротрофический фактор линии глиальных клеток, GDNF, аскорбиновую кислоту, нейротрофический фактор головного мозга BDNF, дибутириладенозиновый циклический монофосфат dbcAMP, ингибитор ROCK Y-27632 и т. п.

[00211] В некоторых вариантах осуществления нейроны и предшественники, описанные в данном документе, экспрессируют один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из субъединицы 1 типа ионотропного рецептора глутамата NMDA GRIN1, глутаматдекарбоксилазы 1 GAD1, гамма-аминомасляной кислоты ГАМК или GABA, тирозингидроксилазы TH, транскрипционного фактора гомеобокса LIM 1-альфа LMX1A, белка Forkhead-бокса O1 FOXO1, белка Forkhead-бокса A2 FOXA2, белка Forkhead-бокса O4 FOXO4, FOXG1, 2',3'-циклический нуклеотид 3'-фосфодиэстеразы CNP, основного белка миелина MBP, бета-цепи тубулина 3 TUB3, бета-цепи тубулина 3 NEUN, члена 6 семейства 1 транспортеров растворенных веществ SLC1A6, SST, PV, кальбиндина, RAX, LHX6, LHX8, DLX1, DLX2, DLX5, DLX6, SOX6, MAFB, NPAS1, ASCL1, SIX6, OLIG2, NKX2.1, NKX2.2, NKX6.2, VGLUT1, MAP2, STIP2, SATB2, TBR1, DLX2, ASCL1, ChAT, NGFI-B, c-fos, CRF, RAX, POMC, гипокретина, NADPH, NGF, Ach, VACHT, PAX6, EMX2p75 и любой их комбинации.

3. Создание глиальных клеток

[00212] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе нейральные клетки включают глиальные клетки, такие как, но не ограничиваясь этим, микроглию, астроциты, олигодендроциты, эпендимные клетки и шванновские клетки, глиальные прекурсоры и глиальные предшественники, которые получают посредством дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в терапевтически эффективные глиальные клетки и т. п.

[00213] В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки, их прекурсоров и предшественников создают путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток

в среде, содержащей один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из ретиноевой кислоты, IL-34, M-CSF, лиганда FLT3, GM-CSF, CCL2, ингибитора TGF-бета, ингибитора сигнализации BMP, активатора сигнализации SHH, FGF, тромбоцитарного фактора роста PDGF, PDGFR-альфа, HGF, IGF-1, ноггина, белка «ежик Соник» (SHH), дорсоморфина, ноггина и любой их комбинации. В определенных случаях ингибитор сигнализации BMP представляет собой LDN193189, SB431542 или их комбинацию. Типовая среда для дифференцировки может содержать любые специфические факторы и/или малые молекулы, которые могут облегчать или обеспечивать создание определенного типа глиальных клеток, как известно специалистам в данной области техники.

[00214] В некоторых вариантах осуществления дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток проводят посредством воздействия на клетки или приведения клеток в контакт со специфическими факторами, которые, как известно, позволяют получить глиальную клетку, такую как микроглиальная клетка (амебоидная, разветвленная, активированная фагоцитарная и активированная нефагоцитарная клетки), макроглиальная клетка (такая как астроцит, олигодендроцит, эпендимная клетка, радиальная глия, шванновская клетка и сателлитная клетка), ее прекурсор и ее предшественник. Применимые способы создания глиальных клеток, их прекурсоров и предшественников из стволовых клеток можно найти, например, в патентах США №№ 7579188; 7595194; 8263402; 8206699; 8227247; 8252586; 9193951; 9709553; и 9862925; и публикациях заявок США №№ 2018/0187148; 2017/0198255; 2017/0183627; 2017/0182097; 2017/253856; 2018/0236004; и публикациях заявок PCT №№ WO2017/172976 и WO2018/093681.

[00215] В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки экспрессируют NKX2.2, PAX6, SOX10, нейротрофический фактор головного мозга BDNF, нейротрофин-3 NT-3, NT-4, эпидермальный фактор роста EGF, цилиарный нейротрофический фактор CNTF, фактор роста нервов NGF, FGF8, EGFR, OLIG1, OLIG2, миелиновый основной белок MBP, GAP-43, LNGFR, нестин, GFAP, CD11b, CD11c, CD105, CX3CR1, P2RY12, IBA-1, TMEM119, CD45 и любую их комбинацию. Любые из этих типовых маркеров можно использовать для характеристики описанных в данном документе глиальных клеток. Чтобы проследить за дифференцировкой глиальных клеток, а также оценить фенотип глиальных клеток, можно оценивать экспрессию любого числа молекулярных и генетических маркеров, специфических для глиальных клеток и их предшественников. Например, наличие генетических маркеров можно определять различными методами, известными специалистам в данной области техники. Экспрессию молекулярных маркеров можно определять количественными методами, таким как, но не ограничиваясь этим, анализы на основе кПЦР, анализы РНК-секвенирования, протеомные анализы, иммуноанализы, иммуногистохимические анализы, иммуноблоттинг и т. п.

[00216] В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки, включая олигодендроциты, астроциты и их предшественников, экспрессируют один или более маркеров, выбранных из A2B5, CD9, CD133, CD140a, FOXG1, GalC, GD3, GFAP, нестина,

NG2, MBP, Musashi, O4, Olig1, Olig2, PDGF α R, S100 β , глутаминсинтетазы, коннексина 43, виментина, BLBP, GLAST и т. п. В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки, включая олигодендроциты, астроциты и их предшественников, не экспрессируют один или более маркеров, выбранных из PSA-NCAM, CD9, CD11, CD32, CD36, CD105, CD140a, нестина, PDGF α R и т. п. В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки отбирают или очищают, используя стратегию положительного отбора, стратегию отрицательного отбора или их обе.

[00217] В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки характеризуют в соответствии с морфологией, определяемой методами иммуоцитохимии и иммуногистохимии. В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки оценивают в соответствии с анализами функциональных характеристик, такими как, но не ограничиваясь этим, анализ совместной культуры нейронов, анализ стимуляции липополисахаридами (ЛПС), *in vitro* миелинизации, приток АТФ с анализом кальциевых волн и колебаний и т. п.

[00218] В некоторых вариантах осуществления, чтобы определить, что глиальные клетки демонстрируют клеточно-специфические характеристики и признаки, клетки можно трансплантировать животной модели. В некоторых вариантах осуществления глиальные клетки вводят мыши с ослабленным иммунитетом, например, мыши с ослабленным иммунитетом *shiverer*. Глиальные клетки вводят в головной мозг мыши, а привитые клетки оценивают через заданное количество времени. В некоторых случаях привитые клетки в головном мозге визуализируют, используя методы иммуоокрашивания и визуализации. В некоторых вариантах осуществления в привитых клетках можно определять экспрессию известных биомаркеров глиальных клеток.

[00219] Дополнительные способы определения эффекта трансплантации нейральных клеток в животной модели неврологического расстройства или состояния описаны в следующих работах: для спинного мозга - Curtis et al., *Cell Stem Cell*, 2018, 22, 941-950; для болезни Паркинсона - Kikuchi et al., *Nature*, 2017, 548:592-596; для БАС - Izrael et al., *Stem Cell Research*, 2018, 9(1):152 и Izrael et al., *IntechOpen*, DOI: 10.5772/intechopen.72862; для эпилепсии - Upadhyaya et al., *PNAS*, 2019, 116(1):287-296.

[00220] Эффективность трансплантатов нейральных клеток в случае повреждения спинного мозга можно оценивать, например, в крысиной модели острого повреждения спинного мозга, как описано в McDonald et al., *Nat. Med.*, 1999, 5:1410 и Kim et al., *Nature*, 2002, 418:50. Например, успешные трансплантаты могут характеризоваться тем, что полученные из трансплантатов клетки присутствуют в пораженном участке через 2-5 недель, дифференцируются в астроциты, олигодендроциты и/или нейроны и мигрируют вдоль спинного мозга от пораженного конца, а также улучшением походки, координации и набором массы. Конкретные животные модели выбирают на основании типа нейральных клеток и неврологического заболевания или состояния, подлежащего лечению.

Гипоиммуногенные клетки

[00221] Представленная технология относится к нейральным клеткам, полученным из плюрипотентных стволовых клеток (например, плюрипотентных стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток), которые сверхэкспрессируют CD24 или CD47. Эти нейральные клетки сверхэкспрессируют CD24 или CD47 и избегают иммунного распознавания. В некоторых вариантах осуществления нейральные клетки и плюрипотентные стволовые клетки демонстрируют сниженные уровни или сниженную активность антигенов ГКГС класса I и/или антигенов ГКГС класса II.

[00222] Предложенные в данном документе способы применимы для активации или абляции экспрессии ГКГС класса I и/или экспрессии ГКГС класса II в клетках, таких как, но не ограничиваясь этим, плюрипотентные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления также используют технологии редактирования генома с помощью редкощепящих эндонуклеаз (например, системы CRISPR/Cas, TALEN, цинк-пальцевой нуклеазы, мегануклеазы и хоминг эндонуклеазы) для снижения или устранения экспрессии критических иммунных генов (например, путем удаления геномной ДНК критических иммунных генов) в стволовых клетках человека. В определенных вариантах осуществления используют технологии редактирования генома или другие технологии модуляции генов для введения факторов, индуцирующих толерантность, в человеческие клетки, превращая их и полученные из них дифференцированные клетки в гипоиммуногенные клетки. Таким образом, гипоиммуногенные клетки снижают или устраняют экспрессию ГКГС I и экспрессию ГКГС II. В некоторых вариантах осуществления клетки являются неиммуногенными (например, не индуцируют иммунный ответ) у субъекта-реципиента.

[00223] Технологии редактирования генома позволяют создавать двухцепочечные разрывы ДНК в необходимых сайтах локуса. Эти контролируемые двухцепочечные разрывы способствуют гомологичной рекомбинации в конкретных сайтах локуса. Этот процесс сфокусирован на нацеливании на конкретные последовательности молекул нуклеиновых кислот, таких как хромосомы, с помощью эндонуклеаз, которые распознают и связывают последовательности и индуцируют двухцепочечный разрыв в молекуле нуклеиновой кислоты. Репарация двухцепочечного разрыва происходит посредством подверженного ошибкам негомологичного соединения концов (НГСК) или гомологичной рекомбинации (ГР).

[00224] При практической реализации некоторых вариантов осуществления можно применять, если специально не указано иное, традиционные методы химии, биохимии, органической химии, молекулярной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантных ДНК, генетики, иммунологии и клеточной биологии, которые находятся в компетенции специалистов в данной области техники, многие из которых описаны ниже в иллюстративных целях. Такие технологии подробно описаны в литературе. Смотрите, например, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition, 2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular*

Biology (John Wiley and Sons, updated July 2008); Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Glover, DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (IRL Press, Oxford, 1985); Anand, Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press, New York, 1992); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, Eds., 1984); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Harlow and Lane, Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1998) Current Protocols in Immunology Q. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, eds., 1991); Annual Review of Immunology; а также монографии в таких журналах, как Advances in Immunology.

[00225] В данном документе предложены клетки, содержащие модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию ГКГС I и/или ГКГС II. В определенных вариантах осуществления модификация включает повышение экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат экзогенный или рекомбинантный полипептид CD47. Также в данном документе предложены клетки, содержащие модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию ГКГС I и/или ГКГС II. В определенных вариантах осуществления модификация включает повышение экспрессии CD24. В некоторых вариантах осуществления клетки содержат экзогенный или рекомбинантный полипептид CD24. В некоторых вариантах осуществления клетка также содержит модификацию для повышения экспрессии одного белка, выбранного из группы, состоящей из CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21, CCL22 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно содержит толерогенный фактор (например, иммуномодулирующую молекулу), выбранный из группы, состоящей из DUX4, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21, CCL22 и Mfge8.

[00226] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит геномную модификацию одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей, которые регулируют экспрессию ГКГС I и/или ГКГС II. В некоторых вариантах осуществления используют систему генетического редактирования для модификации одной или более целевых полинуклеотидных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой одну или более последовательностей, выбранных из группы, состоящей из B2M и СПТА. В некоторых случаях целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой NLRC5. В определенных вариантах осуществления геном клетки был изменен для уменьшения количества или устранения критических компонентов экспрессии HLA.

[00227] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, плюрипотентная стволовая клетка или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка) или популяция клеток, имеющих

геном, в котором было осуществлено редактирование гена для удаления непрерывного участка геномной ДНК с целью снижения или устранения поверхностной экспрессии молекул ГКГС класса I в клетке или популяции клеток. В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, плюрипотентная стволовая клетка или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка) или популяция клеток, имеющих геном, в котором было осуществлено редактирование гена для удаления непрерывного участка геномной ДНК с целью снижения или устранения поверхностной экспрессии молекул ГКГС класса II в клетке или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, плюрипотентная стволовая клетка или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка) или популяция клеток, имеющих геном, в котором было осуществлено редактирование одного или более генов для удаления непрерывного участка геномной ДНК с целью снижения или устранения поверхностной экспрессии молекул ГКГС класса I и II в клетке или популяции клеток.

[00228] В определенных вариантах осуществления экспрессию ГКГС I или ГКГС II модулируют путем нацеливания на непрерывный участок геномной ДНК и его удаления с целью снижения или устранения экспрессии целевого гена, выбранного из группы, состоящей из B2M и СПТА. В других случаях целевой ген представляет собой NLRC5.

[00229] В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки и способы включают геномное редактирование человеческих клеток для расщепления последовательностей гена СПТА, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь этим, B2M и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки и способы включают геномное редактирование человеческих клеток для расщепления последовательностей гена B2M, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь этим, СПТА и NLRC5. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе клетки и способы включают геномное редактирование человеческих клеток для расщепления последовательностей гена NLRC5, а также редактирование генома таких клеток для изменения одной или более дополнительных целевых полинуклеотидных последовательностей, таких как, но не ограничиваясь этим, B2M и СПТА.

CD47

[00230] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, плюрипотентная стволовая клетка или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка) или популяция клеток, которые были модифицированы для экспрессии толерогенного фактора (например, иммуномодулирующего полипептида) CD47. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью

экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка экспрессирует экзогенный CD47. В некоторых случаях стволовая клетка экспрессирует экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD47.

[00231] CD47 представляет собой лейкоцитарный поверхностный антиген и играет роль в клеточной адгезии и модуляции интегринов. Он экспрессируется на поверхности клетки и подает сигнал циркулирующим макрофагам «не есть» эту клетку.

[00232] В некоторых вариантах осуществления клетка по представленной технологии содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность для CD47, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_001777.3 и NM_198793.2. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность для CD47, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_001777.3 и NM_198793.2.

[00233] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит полипептид CD47, имеющий по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1. В некоторых вариантах осуществления клетка в соответствии с представленной технологией содержит полипептид CD47, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001768.1 и NP_942088.1.

[00234] В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CD47 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CD47. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия мРНК экзогенного CD47 используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

CD24

[00235] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, плюрипотентная стволовая клетка или индуцированная плюрипотентная стволовая клетка) или популяция клеток, которые были модифицированы для экспрессии толерогенного фактора (например, иммуномодулирующего полипептида) CD24. В некоторых вариантах осуществления в

настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии CD24. В некоторых вариантах осуществления стволовая клетка экспрессирует экзогенный CD24. В некоторых случаях стволовая клетка экспрессирует экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий полипептид CD24.

[00236] CD24, который также называется термостабильным антигеном или антигеном кластера 4 мелкоклеточного рака легкого, представляет собой гликозилированный гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный поверхностный белок (Pirruccello et al., *J Immunol*, 1986, 136, 3779-3784; Chen et al., *Glycobiology*, 2017, 57, 800-806). Он связывается с Siglec-10 на клетках врожденного иммунитета. Недавно было показано, что CD24 посредством Siglec-10 действует как контрольная точка врожденного иммунитета (Barkal et al., *Nature*, 2019, 572, 392-396).

[00237] В некоторых вариантах осуществления клетка в соответствии с представленной технологией содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD24, который имеет по меньшей мере 95% идентичности последовательности (например, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с аминокислотной последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001278666.1, NP_001278667.1, NP_001278668.1 и NP_037362.1. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид CD24, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NP_001278666.1, NP_001278667.1, NP_001278668.1 и NP_037362.1.

[00238] В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более) с последовательностью, приведенной в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_00129737.1, NM_00129738.1, NM_001291739.1 и NM_013230.3. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит нуклеотидную последовательность, приведенную в эталонных последовательностях NCBI №№ NM_00129737.1, NM_00129738.1, NM_001291739.1 и NM_013230.3.

[00239] В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка CD24 проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку CD24. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия мРНК экзогенного CD24 используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

СПТА

[00240] В определенных вариантах осуществления представленная технология позволяет модулировать (например, снижать или устранять) экспрессию генов ГКГС II путем нацеливания и модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии транскриптора класса II (СПТА). В некоторых вариантах осуществления модуляция

происходит с помощью системы CRISPR/Cas. СПТА является членом семейства белков богатых лейцином повторов (БЛП) ДП или нуклеотидсвязывающего домена (НСД) и регулирует транскрипцию ГКГС II путем связывания с энхансеосомой ГКГС.

[00241] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой вариант СПТА. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог СПТА. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог СПТА.

[00242] В некоторых вариантах осуществления сниженная или устраненная экспрессия СПТА снижает или устраняет экспрессию одного или более из следующих ГКГС класса II: HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ и HLA-DR.

[00243] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенные клетки в соответствии с представленной технологией содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген СПТА. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеливающая на ген СПТА редкощепящую эндонуклеазу, включает белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген СПТА. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген СПТА выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:5184-36352 из таблицы 12 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00244] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген СПТА, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующую генетическую модификацию гена СПТА с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-II можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка СПТА проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку СПТА. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

B2M

[00245] В определенных вариантах осуществления представленная технология позволяет модулировать (например, снижать или устранять) экспрессию генов ГКГС-I путем нацеливания и модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии вспомогательной цепи B2M. В некоторых вариантах осуществления модуляция происходит с помощью системы CRISPR/Cas. За счет модуляции (например, снижения или устранения) экспрессии B2M блокируется направленная миграция молекул ГКГС-I и клетка становится гипоиммуногенной. В некоторых вариантах осуществления клетка обладает сниженной способностью индуцировать иммунный ответ у субъекта-реципиента.

[00246] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой вариант В2М. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой гомолог В2М. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой ортолог В2М.

[00247] В некоторых вариантах осуществления снижение или устранение экспрессии В2М снижает или устраняет экспрессию одной или более из следующих молекул ГКГС I - HLA-A, HLA-B и HLA-C.

[00248] В некоторых вариантах осуществления гипои иммуногенные клетки в соответствии с представленной технологией содержат генетическую модификацию, нацеленную на ген В2М. В некоторых вариантах осуществления генетическая модификация, нацеливающая на ген В2М редкощепящую эндонуклеазу, включает белок Cas или полинуклеотид, кодирующий белок Cas, и по меньшей мере одну последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген В2М. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность гидовой рибонуклеиновой кислоты для специфического нацеливания на ген В2М выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO:81240-85644 из таблицы 15 WO2016/183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00249] Анализы для проверки того, был ли инактивирован ген В2М, известны и описаны в данном документе. В одном варианте осуществления результирующую генетическую модификацию гена В2М с помощью ПЦР и снижение экспрессии HLA-I можно анализировать с помощью анализа FACS. В другом варианте осуществления выявление экспрессии белка В2М проводят методом вестерн-блоттинга клеточных лизатов, зондированных антителами к белку В2М. В другом варианте осуществления для подтверждения наличия инактивирующей генетической модификации используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР).

Дополнительные толерогенные факторы

[00250] В определенных вариантах осуществления в клетки с отредактированным геномом можно вставлять или повторно вставлять один или более толерогенных факторов для создания иммуно-привилегированных универсальных донорных клеток, таких как универсальные донорные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления гипои иммуногенные клетки (например, гипои иммуногенные стволовые клетки), описанные в данном документе, были дополнительно модифицированы с целью экспрессии одного или более толерогенных факторов. Типовые толерогенные факторы включают, без ограничения, один или более из DUX4, CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21, CCL22 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, состоящей из CD200, HLA-G, HLA-E, HLA-C, тяжелой цепи HLA-E, PD-L1, IDO1, CTLA4-Ig, IL-10, IL-35, FASL, Serpinb9, CCL21, CCL22 и Mfge8. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, состоящей из DUX4, HLA-C,

HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, C1-ингибитора и IL-35. В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы выбраны из группы, состоящей из HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, C1-ингибитора и IL-35.

[00251] В некоторых случаях используют систему редактирования генов, такую как система CRISPR/Cas, для облегчения вставки толерогенных факторов, например вставки толерогенных факторов в безопасный локус, такой как локус AAVS 1, для активного ингибирования иммунного отторжения. В некоторых случаях толерогенные факторы вставляют в безопасный локус, используя экспрессионный вектор.

[00252] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки CD47 в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:200784-231885 из таблицы 29 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00253] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии HLA-C. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии HLA-C. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-C в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:3278-5183 из таблицы 10 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00254] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии HLA-E. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью

экспрессии HLA-E. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-E в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:189859-193183 из таблицы 19 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00255] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии HLA-F. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии HLA-F. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-F в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 688808-399754 из таблицы 45 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00256] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии HLA-G. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии HLA-G. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки HLA-G в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:188372-189858 из таблицы 18 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00257] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии PD-L1. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии PD-L1. В определенных вариантах осуществления можно использовать по

меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки PD-L1 в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO:193184-200783 из таблицы 21 WO2016183041, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00258] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии CTLA4-Ig. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии CTLA4-Ig. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки CTLA4-Ig в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

[00259] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии СИ-ингибитора. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии СИ-ингибитора. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки СИ-ингибитора в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

[00260] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии IL-35. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии IL-35. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки IL-35 в линию стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или

по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в WO2016183041, включая перечень последовательностей.

[00261] В некоторых вариантах осуществления толерогенные факторы экспрессируют в клетке, используя экспрессионный вектор. Например, экспрессионный вектор для экспрессии CD47 в клетке содержит полинуклеотидную последовательность, кодирующую CD47. Экспрессионный вектор может представлять собой индуцибельный экспрессионный вектор. Экспрессионный вектор может представлять собой вирусный вектор, такой как, но не ограничиваясь этим, лентивирусный вектор.

[00262] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена стволовая клетка (например, гипоиммуногенная стволовая клетка, такая как гипоиммуногенная плюрипотентная стволовая клетка или гипоиммуногенная iPSC) или популяция клеток, имеющих геном, в котором геном стволовой клетки был модифицирован для экспрессии любого из полипептидов, выбранных из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFX-ANK, СИТА, NFY-A, NLRC5, B2M, RFX5, RFX-AP, HLA-G, HLA-E, NFY-B, PD-L1, NFY-C, IRF1, TAP1, GITR, 4-1BB, CD28, B7-1, CD47, B7-2, OX40, CD27, HVEM, SLAM, CD226, ICOS, LAG3, TIGIT, TIM3, CD160, BTLA, CD244, LFA-1, ST2, HLA-F, CD30, B7-H3, VISTA, TLT, PD-L2, CD58, CD2, HELIOS и IDO1. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложен способ изменения генома стволовой клетки с целью экспрессии любого из полипептидов, выбранных из группы, состоящей из HLA-A, HLA-B, HLA-C, RFX-ANK, СИТА, NFY-A, NLRC5, B2M, RFX5, RFX-AP, HLA-G, HLA-E, NFY-B, PD-L1, NFY-C, IRF1, TAP1, GITR, 4-1BB, CD28, B7-1, CD47, B7-2, OX40, CD27, HVEM, SLAM, CD226, ICOS, LAG3, TIGIT, TIM3, CD160, BTLA, CD244, LFA-1, ST2, HLA-F, CD30, B7-H3, VISTA, TLT, PD-L2, CD58, CD2, HELIOS и IDO1. В определенных вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере одну рибонуклеиновую кислоту или по меньшей мере одну пару рибонуклеиновых кислот для облегчения вставки выбранного полипептида в линию стволовых клеток. В определенных осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота или по меньшей мере одна пара рибонуклеиновых кислот выбраны из любой из описанных в приложениях 1-47 и перечне последовательностей WO2016183041, описание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Методы генетической модификации

[00263] В некоторых вариантах осуществления редкощепящую эндонуклеазу вносят в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей редкощепящую эндонуклеазу. Процесс внесения нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают опосредованную фосфатом кальция или липидами трансфекцию, электропорацию и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную

ДНК, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную мРНК, описанную в данном документе (например, синтетическую модифицированную мРНК).

[00264] Описанные в данном документе целевые полинуклеотидные последовательности можно изменять любым способом, известным специалисту в данной области техники, используя систему CRISPR/Cas. Можно использовать любую систему CRISPR/Cas, способную изменять целевую полинуклеотидную последовательность в клетке. В таких системах CRISPR-Cas могут использоваться различные белки Cas (Haft et al. PLoS Comput Biol. 2005; 1(6):e60). Молекулярная машинерия таких белков Cas, которая позволяет системе CRISPR/Cas изменять целевые полинуклеотидные последовательности в клетках, включает РНК-связывающие белки, эндо- и экзонуклеазы, геликазы и полимеразы. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа I. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа II. В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas представляет собой систему CRISPR типа V.

[00265] Системы CRISPR/Cas можно использовать для изменения любой целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Специалистам в данной области техники будет понятно, что необходимые целевые полинуклеотидные последовательности, подлежащие изменению в любой конкретной клетке, могут соответствовать любой геномной последовательности, в случае которой экспрессия геномной последовательности связана с расстройством или иным образом способствует проникновению патогена в клетку. Например, необходимая целевая полинуклеотидная последовательность для изменения в клетке может представлять собой полинуклеотидную последовательность, соответствующую геномной последовательности, которая содержит связанный с заболеванием единичный полинуклеотидный полиморфизм. В таком примере системы CRISPR/Cas можно использовать для коррекции ОНП, связанного с заболеванием, в клетке путем замены его аллелью дикого типа. В качестве другого примера, полинуклеотидная последовательность целевого гена, который отвечает за проникновение патогена в клетку или его пролиферацию, может быть подходящей мишенью для делеции или вставки с целью нарушения функции целевого гена для предотвращения проникновения патогена в клетку или его пролиферации внутри клетки.

[00266] В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой человеческую геномную последовательность. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления целевая полинуклеотидная последовательность представляет собой геномную последовательность позвоночного.

[00267] В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas содержит белок Cas и по меньшей мере одну или две рибонуклеиновые кислоты, которые способны направлять белок Cas и гибридизоваться с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности. В контексте данного документа термины «белок» и «полипептид» используются взаимозаменяемо для обозначения ряда аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями (т. е. полимера из аминокислот), и включают модифицированные аминокислоты (например, фосфорилированные, гликированные, гликозилированные, др.) и аминокислотные аналоги. Типовые полипептиды или белки включают генные продукты, встречающиеся в природе белки, гомологи, паралоги, фрагменты и другие эквиваленты, варианты и аналоги вышеперечисленного.

[00268] В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит одну или более аминокислотных замен или модификаций. В некоторых вариантах осуществления одна или более аминокислотных замен включают консервативную аминокислотную замену. В некоторых случаях, замены и/или модификации могут предотвращать или снижать протеолитическую деградацию и/или увеличивать период полужизни полипептида в клетке. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать замещение пептидной связи (например, мочевины, тиомочевины, карбамат, сульфонилмочевину и т. д.). В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать альтернативную аминокислоту (например, D-аминокислоты, бета-аминокислоты, гомоцистеин, фосфосерин и т. д.). В некоторых вариантах осуществления белок Cas может содержать модификацию для включения фрагмента (например, ПЭГилирование, гликозилирование, липидирование, ацетилирование, кэпирование концов и т. д.).

[00269] В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает коровый белок Cas. Типовые коровые белки Cas включают, но не ограничиваются этим, Cas1, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8 и Cas9. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *E. coli* (также известный как CASS2). Типовые белки Cas подтипа *E. coli* включают, но не ограничиваются этим, Cse1, Cse2, Cse3, Cse4 и Cas5e. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Ypest* (также известный как CASS3). Типовые белки Cas подтипа *Ypest* включают, но не ограничиваются этим, Csy1, Csy2, Csy3 и Csy4. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Nmeni* (также известный как CASS4). Типовые белки Cas подтипа *Nmeni* включают, но не ограничиваются этим, Csn1 и Csn2. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Dvulg* (также известный как CASS1). Типовые белки Cas подтипа *Dvulg* включают, но не ограничиваются этим, Csd1, Csd2 и Cas5d. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Tnear* (также известный как CASS7). Типовые белки Cas подтипа *Tnear* включают, но не ограничиваются этим, Cst1, Cst2, Cas5t. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа *Hmar1*. Типовые белки

Cas подтипа Hmaгi включают, но не ограничиваются этим, Csh1, Csh2 и Cas5h. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Aреrn (также известный как CASS5). Типовые белки Cas подтипа Aреrn включают, но не ограничиваются этим, Csa1, Csa2, Csa3, Csa4, Csa5 и Cas5a. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas подтипа Mtube (также известный как CASS6). Типовые белки Cas подтипа Mtube включают, но не ограничиваются этим, Csm1, Csm2, Csm3, Csm4 и Csm5. В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает белок Cas модуля RAMP. Типовые белки Cas модуля RAMP включают, но не ограничиваются этим, Cmr1, Cmr2, Cmr3, Cmr4, Cmr5 и Cmr6. Смотрите, например, Klompe et al., Nature 571, 219-225 (2019); Strecker et al., Science 365, 48-53 (2019).

[00270] В некоторых вариантах осуществления белок Cas включает любой из белков Cas, описанных в данном документе, или его функциональную часть. В контексте данного документа термин «функциональная часть» относится к части пептида, которая сохраняет свою способность образовывать комплекс по меньшей мере с одной рибонуклеиновой кислотой (например, гидовая РНК (гРНК)) и расщеплять целевую полинуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cas9, выбранных из группы, состоящей из ДНК-связывающего домена, по меньшей мере одного РНК-связывающего домена, геликазного домена и эндонуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть содержит комбинацию функционально связанных функциональных доменов белка Cas12a (также известного Cpf1), выбранных из группы, состоящей из ДНК-связывающего домена, по меньшей мере одного РНК-связывающего домена, геликазного домена и эндонуклеазного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональные домены образуют комплекс. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas9 содержит функциональную часть RuvC-подобного домена. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas9 содержит функциональную часть нуклеазного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления функциональная часть белка Cas12a содержит функциональную часть RuvC-подобного домена.

[00271] В некоторых вариантах осуществления экзогенный белок Cas можно вносить в клетку в форме полипептида. В некоторых вариантах осуществления белки Cas можно конъюгировать или сливать с проникающим в клетки полипептидом или проникающим в клетки пептидом. В контексте данного документа термины «проникающий в клетку полипептид» и «проникающий в клетку пептид» относятся к полипептиду или пептиду, соответственно, которые облегчают поглощение молекулы клеткой. Проникающие в клетки полипептиды могут содержать выявляемую метку.

[00272] В некоторых вариантах осуществления белки Cas можно конъюгировать или сливать с заряженным белком (например, который несет положительный, отрицательный или в целом нейтральный электрический заряд). Такая связь может быть ковалентной. В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно сливать с

суперположительно заряженным ЗФБ с целью существенного повышения способности белка Cas проникать в клетку (Cronican et al. ACS Chem Biol. 2010; 5(8):747-52). В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно сливать с доменом белковой трансдукции (ДБТ) с целью облегчения его проникновения в клетку. Типовые ДБТ включают Tat, олигоаргинин и пенетратин. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с проникающим в клетки пептидом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с ДБТ. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом олигоаргинина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с доменом пенетратина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит полипептид Cas9, слитый с суперположительно заряженным ЗФБ. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с проникающим в клетки пептидом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с ДБТ. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом tat. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом олигоаргинина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с доменом пенетратина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a содержит полипептид Cas12a, слитый с суперположительно заряженным ЗФБ.

[00273] В некоторых вариантах осуществления белок Cas можно вносить в клетку, содержащую целевую полинуклеотидную последовательность, в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas. Процесс внесения нуклеиновых кислот в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают опосредованную фосфатом кальция или липидами трансфекцию, электропорацию и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную ДНК, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает мРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота включает модифицированную мРНК, описанную в данном документе (например, синтетическую модифицированную мРНК).

[00274] В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с одной или двумя рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с двумя рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с одной рибонуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления белок Cas кодируется модифицированной нуклеиновой кислотой, описанной в данном документе, (например, синтетической модифицированной мРНК).

[00275] Описанные способы подразумевают применение любой рибонуклеиновой кислоты, которая способна направлять белок Cas и гибридизироваться с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из рибонуклеиновых кислот содержит tracrRNA. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из рибонуклеиновых кислот содержит CRISPR RNA (crRNA). В некоторых вариантах осуществления одна рибонуклеиновая кислота содержит гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна рибонуклеиновая кислота содержит гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. В некоторых вариантах осуществления обе из одной или двух рибонуклеиновых кислот содержат гидовую РНК, которая направляет белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке. Рибонуклеиновые кислоты можно выбирать так, чтобы они гибридизировались с рядом разных целевых мотивов, в зависимости от конкретной используемой системы CRISPR/Cas и последовательности целевого полинуклеотида, как понятно специалистам в данной области техники. Чтобы минимизировать гибридизацию с последовательностями нуклеиновых кислот, отличными от целевой полинуклеотидной последовательности, также можно выбрать одну или две рибонуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты гибридизируются с целевым мотивом, который содержит по меньшей мере два несовпадения по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот гибридизуются с целевым мотивом, который содержит по меньшей мере одно несовпадение по сравнению со всеми другими геномными нуклеотидными последовательностями в клетке. В некоторых вариантах осуществления от одной до двух рибонуклеиновых кислот предназначены для гибридизации с целевым мотивом, непосредственно примыкающим к мотиву дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемому белком Cas. В некоторых вариантах осуществления каждая из одной или двух рибонуклеиновых кислот сконструирована для гибридизации с целевыми мотивами, непосредственно примыкающим к мотивам дезоксирибонуклеиновой кислоты, распознаваемым белком Cas, фланкирующим мутантную аллель, расположенную между целевыми мотивами.

[00276] В некоторых вариантах осуществления каждая из одной или двух рибонуклеиновых кислот содержит гидовые РНК, которые направляют белок Cas и гибридизируются с целевым мотивом целевой полинуклеотидной последовательности в клетке.

[00277] В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизируются с последовательностями в одной и той же цепи целевой полинуклеотидной

последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизируются с последовательностями из противоположных цепей целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) не комплементарны и/или не гибридизируются с последовательностями из противоположных цепей целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизируются с перекрывающимися целевыми мотивами целевой полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или две рибонуклеиновые кислоты (например, гидовые РНК) комплементарны и/или гибридизируются с выступающими целевыми мотивами целевой полинуклеотидной последовательности.

[00278] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие белок Cas, и нуклеиновые кислоты, кодирующие по меньшей мере одну или две рибонуклеиновые кислоты, вносят в клетку посредством вирусной трансдукции (например, лентивирусной трансдукции). В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с 1-2 рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с двумя рибонуклеиновыми кислотами. В некоторых вариантах осуществления белок Cas образует комплекс с одной рибонуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления белок Cas кодируется модифицированной нуклеиновой кислотой, описанной в данном документе, (например, синтетической модифицированной мРНК).

[00279] Типовые последовательности гРНК, применимые для нацеливания на гены с помощью CRISPR/Cas, описанного в данном документе, приведены в таблице 1. Эти последовательности можно найти в WO2016/183041, поданной 9 мая 2016 г., раскрытие которой, включая таблицы, приложения и перечень последовательностей, в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

Таблица 1. Примеры последовательностей нРНК, пригодных для нацеливания на гены

Название гена	SEQ ID NO: (WO2016183041)	WO2016183041
HLA-A	SEQ ID NO: 2-1418	Таблица 8, приложение 1
HLA-B	SEQ ID NO: 1419-3277	Таблица 9, приложение 2
HLA-C	SEQ ID NO: 3278-5183	Таблица 10, приложение 3
RFX-ANK	SEQ ID NO: 95636-102318	Таблица 11, приложение 4
NFY-A	SEQ ID NO: 102319-121796	Таблица 13, приложение 6
RFX5	SEQ ID NO: 85645-90115	Таблица 16, приложение 9
RFX-AP	SEQ ID NO: 90116-95635	Таблица 17, приложение 10

NFY-B	SEQ ID NO: 121797-135112	Таблица 20, приложение 13
NFY-C	SEQ ID NO: 135113-176601	Таблица 22, приложение 15
IRF1	SEQ ID NO: 176602-182813	Таблица 23, приложение 16
TAP1	SEQ ID NO: 182814-188371	Таблица 24, приложение 17
СПТА	SEQ ID NO:5184-36352	Таблица 12, приложение 5
B2M	SEQ ID NO:81240-85644	Таблица 15, приложение 8
NLRC5	SEQ ID NO:36353-81239	Таблица 14, приложение 7
CD47	SEQ ID NO:200784-231885	Таблица 29, приложение 22
HLA-E	SEQ ID NO:189859-193183	Таблица 19, приложение 12
HLA-F	SEQ ID NO:688808-699754	Таблица 45, приложение 38
HLA-G	SEQ ID NO:188372-189858	Таблица 18, приложение 11
PD-L1	SEQ ID NO:193184-200783	Таблица 21, приложение 14

[00280] В некоторых вариантах осуществления клетки создают, используя методологии с использованием нуклеаз на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN).

[00281] Под «TALE-нуклеазой» (TALEN) подразумевается слитый белок, состоящий из связывающего нуклеиновую кислоту домена, как правило, полученного из эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE), и одного нуклеазного каталитического домена для расщепления целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Каталитический домен предпочтительно представляет собой нуклеазный домен и более предпочтительно домен, обладающий эндонуклеазной активностью, такой как, например, I-TevI, CoIE7, NucA и Fok-I. В конкретном варианте осуществления домен TALE может быть слит с мегануклеазой, такой как, например, I-CreI и I-OnuI, или их функциональным вариантом. В более предпочтительном варианте осуществления указанная нуклеаза представляет собой мономерную TALE-нуклеазу. Мономерная TALE-нуклеаза представляет собой TALE-нуклеазу, для димеризации которой не требуется специфическое распознавание и расщепление, такую как слияния сконструированных повторов TAL с каталитическим доменом I-TevI, описанные в WO2012138927. Эффектор, подобный активатору транскрипции (TALE), представляет собой белки бактериального вида *Xanthomonas*, содержащие множество повторяющихся последовательностей, причем каждый повтор содержит два остатка в позициях 12 и 13 (RVD), которые специфичны для каждого нуклеотидного основания целевой последовательности нуклеиновой кислоты. Связывающие домены с аналогичными свойствами связывания нуклеиновых кислот модульного типа «основание за основанием» (MBBBD) также можно получать из новых модульных белков, недавно открытых заявителем в другом виде бактерий. Преимущество новых модульных белков заключается в том, что они демонстрируют большую изменчивость последовательностей, чем повторы TAL. Предпочтительно RVD, связанные с распознаванием разных нуклеотидов, представляют собой HD для распознавания C, NG

для распознавания T, NI для распознавания A, NN для распознавания G или A, NS для распознавания A, C, G или T, HG для распознавания T, IG для распознавания T, NK для распознавания G, HA для распознавания C, ND для распознавания C, HI для распознавания C, HN для распознавания G, NA для распознавания G, SN для распознавания G или A и YG для распознавания T, TL для распознавания A, VT для распознавания A или G и SW для распознавания A. В другом варианте осуществления критические аминокислоты 12 и 13 можно заменять другими аминокислотными остатками, чтобы модулировать их специфичность в отношении нуклеотидов A, T, C и G и, в частности, для усиления этой специфичности. Наборы TALEN продаются на коммерческой основе.

[00282] В некоторых вариантах осуществления клетки подвергают манипуляциям с помощью цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN). «Цинк-пальцевой связывающий белок» представляет собой белок или полипептид, который связывает ДНК, РНК и/или белок, предпочтительно специфичным в отношении последовательности образом, в результате стабилизации структуры белка посредством координации ионом цинка. Термин цинк-пальцевой связывающий белок часто сокращенно называют цинк-пальцевым белком или ZFP. Отдельные ДНК-связывающие домены, как правило, называют «пальцами». ZFP имеет по меньшей мере один палец, обычно два пальца, три пальца или шесть пальцев. Каждый палец связывает от двух до четырех пар оснований ДНК, как правило, три или четыре пары оснований ДНК. ZFP связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты, называемой целевым сайтом или целевым сегментом. Каждый палец, как правило, содержит приблизительно 30 аминокислот, цинк-хелатирующий, ДНК-связывающий субдомен. Исследования показали, что один цинковый палец этого класса состоит из альфа-спирали, содержащей два инвариантных гистидиновых остатка, координационно связанных с цинком, наряду с двумя цистеиновыми остатками одного бета-изгиба (смотрите, например, Berg & Shi, *Science* 271:1081-1085 (1996)).

[00283] В некоторых вариантах осуществления клетки получают, используя хоминг-эндонуклеазы. Такие хоминг-эндонуклеазы хорошо известны в данной области техники (Stoddard 2005). Хоминг-эндонуклеазы распознают целевую последовательность ДНК и генерируют одно- или двухцепочечный разрыв. Хоминг-эндонуклеазы являются высокоспецифичными, распознавая целевые сайты ДНК длиной от 12 до 45 пар оснований (п. о.), обычно в диапазоне от 14 до 40 п. о. В некоторых вариантах осуществления хоминг-эндонуклеаза может, например, соответствовать эндонуклеазе LAGLIDADG, эндонуклеазе HNH или эндонуклеазе GIY-YIG. Предпочтительная хоминг-эндонуклеаза может представлять собой вариант I-CreI.

[00284] В некоторых вариантах осуществления клетки получают, используя мегануклеазу. Мегануклеазы по определению представляют собой специфические в отношении последовательности эндонуклеазы, распознающие большие последовательности (Chevalier, B. S. and B. L. Stoddard, *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29, 3757-3774). Они могут расщеплять уникальные сайты в живых клетках, тем самым усиливая

нацеливание на гены в 1000 и более раз вблизи сайта расщепления (Puchta et al., *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 5034-5040; Rouet et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14, 8096-8106; Choulika et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1995, 15, 1968-1973; Puchta et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 5055-5060; Sargent et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1997, 17, 267-77; Donoho et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 4070-4078; Elliott et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 93-101; Cohen-Tannoudji et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 1444-1448).

[00285] В некоторых вариантах осуществления клетки получают, используя РНК-сайленсинг или РНК-интерференцию (РНКи) для нокдауна (например, снижения, устранения или ингибирования) экспрессии полипептида, такого как толерогенный фактор. Применимые методы РНКи включают те, в которых используют синтетические молекулы РНКи, короткие интерферирующие РНК (киРНК), РІWІ-взаимодействующие NRAs (рiРНК), короткие шпилечные РНК (кшРНК), микроРНК (микро-РНК) и другие способы осуществления временного нокдауна, известные специалистам в данной области техники. Реагенты для РНК-интерференции, включая специфические в отношении последовательности кшРНК, киРНК, микроРНК и т. п., являются коммерчески доступными. Например, нокдаун СІТА в плюрипотентной стволовой клетке можно осуществлять посредством внесения киРНК СІТА или трансдукции вируса экспрессирующего кшРНК СІТА, в клетку. В некоторых вариантах осуществления РНК-интерференцию используют для снижения или ингибирования экспрессии по меньшей мере одного белка, выбранного из группы, состоящей из СІТА, В2М и NLRC5.

Сверхэкспрессия толерогенных факторов

[00286] Для всех этих технологий используют хорошо известные рекомбинантные технологии для создания рекомбинантных нуклеиновых кислот. В определенных вариантах осуществления рекомбинантные нуклеиновые кислоты, кодирующие толерогенный фактор, могут быть функционально связаны с одной или более регуляторными нуклеотидными последовательностями в экспрессионной конструкции. Регуляторные нуклеотидные последовательности в общем случае соответствуют клетке-хозяину и подлежащему лечению субъекту. В данной области техники известны многочисленные типы соответствующих экспрессионных векторов и подходящих регуляторных последовательностей для различных клеток-хозяев. Как правило, одна или более регуляторных нуклеотидных последовательностей могут содержать, но не ограничиваются этим, промоторные последовательности, лидерные или сигнальные последовательности, сайты связывания рибосом, последовательности начала и терминации транскрипции, последовательности начала и терминации трансляции и энхансерные или активаторные последовательности. Также предусмотрены конститутивные или индуцибельные промоторы, известные в данной области техники. Промоторы могут быть встречающимися в природе промоторами или гибридными промоторами, в которых объединены элементы более чем одного промотора. Экспрессионная конструкция может присутствовать в клетке в эписоме, такой как плаزمид, или экспрессионная конструкция может быть вставлена в хромосому. В

конкретном варианте осуществления экспрессионный вектор содержит ген селективного маркера, позволяющий осуществлять отбор трансформированных клеток-хозяев. Определенные варианты осуществления включают экспрессионный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариантный полипептид, функционально связанный с по меньшей мере одной регуляторной последовательностью. Регуляторные последовательности для применения в данном документе включают промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии. В некоторых вариантах осуществления экспрессионный вектор предназначен для отбора трансформируемой клетки-хозяина, конкретного варианта полипептида, который необходимо экспрессировать, числа копий вектора, способности контролировать это число копий или экспрессии любого другого белка, кодируемого вектором, например, антибиотических маркеров.

[00287] Примеры подходящих промоторов млекопитающих включают, например, промоторы из следующих генов: промотор убиквитина/S27a хомяка (WO 97/15664), ранний промотор вакуолизирующего вируса обезьян 40 (SV40), главный поздний промотор аденовируса, промотор металлотioneина-I мыши, область длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), область длинных концевых повторов вируса лейкоза мышей Молони и ранний промотор цитомегаловируса человека (CMV). Примеры других гетерологичных промоторов млекопитающих включают промотор(ы) актина, иммуноглобулина или теплового шока. В дополнительных вариантах осуществления промоторы для применения в клетках-хозяевах млекопитающих можно получать из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур (UK 2211504, опубликован 5 июля 1989 г.), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40). В дополнительных вариантах осуществления используют гетерологичные промоторы млекопитающих. Примеры включают промотор актина, промотор иммуноглобулина и промоторы теплового шока. Ранние и поздние промоторы SV40 удобно получать в виде рестрикционного фрагмента SV40, который также содержит точку начала репликации вируса SV40 (Fiers et al, Nature 273: 113-120 (1978)). Немедленно ранний промотор цитомегаловируса человека удобно получать в виде фрагмента рестрикционного фермента HindIII (Greenaway et al, Gene 18: 355-360 (1982)). Некоторые другие примеры включают промотор β -актина человека (ACTB), промотор цитомегаловируса (CMV), промотор фактора элонгации 1 α (EF1 α), промотор фосфоглицераткиназы (PGK), синтетический промотор CAG и промотор убиквитина С (UbC). Дополнительные промоторы, которые можно использовать, можно найти в Norrman K et al., PLoS ONE, 2010, 5(8): e12413; Xia, Stem Cells Dev., 2007; 16(1):167-176), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[00288] В некоторых вариантах осуществления толерогенный фактор, такой как CD47, экспрессируется под управлением конститутивного промотора или клеточно-специфического промотора. В некоторых случаях конститутивный промотор выбран из

группы, состоящей из промотора CMV, промотора CAG, промотора EF1 α , промотора PGK и промотора ACTB. В некоторых случаях клеточно-специфический промотор является активным в любом из типов нейральных клеток, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления экспрессия экзогенного CD47 в клетках по представленной технологии находится под управлением клеточно-специфического промотора, который является активным в нейральной клетке и/или нейральной клетке-предшественнике. В определенных вариантах осуществления клеточно-специфический промотор является активным в дофаминовом нейроне и/или его предшественнике. В некоторых случаях клеточно-специфический промотор выбран из группы, состоящей из TUJ1, MAP2, синапсина, ENO2, TUBA1A, AADC, TH, VMAT2, DAT, NURR1 и PITX3.

[00289] В некоторых вариантах осуществления экспрессию целевого гена (например, CD47 или другого толерогенного фактора) повышают за счет экспрессии слитого белка или белкового комплекса, содержащего (1) сайт-специфический связывающий домен, специфический в отношении экзогенного CD47 или другого гена, и (2) активатор транскрипции.

[00290] В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор состоит из сайт-специфической ДНК-связывающей молекулы нуклеиновой кислоты, такой как гидовая РНК (гРНК). В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют с помощью сайт-специфических ДНК-связывающих нацеленных белков, таких как цинк-пальцевые белки (ZFP) или слитые белки, содержащие ZFP, которые также известны как цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN).

[00291] В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор содержит сайт-специфический связывающий домен, например с ДНК-связывающим белком или ДНК-связывающей нуклеиновой кислотой, который специфически связывается или гибридизируется с геном в целевой области. В некоторых вариантах осуществления предложенные полинуклеотиды или полипептиды сопряжены или образуют комплекс с сайт-специфической нуклеазой, такой как модифицированная нуклеаза. Например, в некоторых вариантах осуществления введение выполняют, используя слияние, содержащее ДНК-нацеленный белок модифицированной нуклеазы, такой как мегануклеаза или РНК-направляемая нуклеаза, например, систему на основе нуклеиновой кислоты коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)-Cas, такую как система CRISPR-Cas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза модифицирована так, чтобы у нее отсутствовала нуклеазная активность. В некоторых вариантах осуществления модифицированная нуклеаза представляет собой каталитически мертвую dCas9.

[00292] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический связывающий домен может быть получен из нуклеазы. Например, последовательностей распознавания хоминг-эндонуклеаз и мегануклеаз, таких как I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. Смотрите также патент США № 5420032; патент США № 6833252; Belfort et al. , (1997) *Nucleic Acids Res.*

25:3379-3388; Dujon et al., (1989) *Gene* 82:115-118; Perler et al, (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble et al., (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast et al, (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 и каталог New England Biolabs. Кроме того, специфичность хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз в отношении связывания ДНК может быть сконструирована для связывания не встречающихся в природе целевых сайтов. Смотрите, например, Chevalier et al, (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epinat et al, (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth et al, (2006) *Nature* 441:656-659; Paques et al, (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; публикацию патента США № 2007/0117128.

[00293] Связывающие домены системы на основе цинковых пальцев, TALE и CRISPR могут быть «сконструированы» для связывания с заранее определенной нуклеотидной последовательностью, например, посредством конструирования (изменения одной или более аминокислот) области спирали распознавания встречающегося в природе белка цинк-пальцевого белка или белка TALE. Сконструированные ДНК-связывающие белки (цинковые пальцы или TALE) представляют собой белки, не встречающиеся в природе. Рациональные критерии для конструирования включают применение правил проведения замен и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих конструкциях ZFP и/или TALE и данные по связыванию. Смотрите, например, патенты США №№ 6140081; 6453242; и 6534261; также смотрите WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496 и публикацию США № 20110301073.

[00294] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический связывающий домен содержит один или более цинк-пальцевых белков (ZFP) или их доменов, которые связываются с ДНК специфическим в отношении последовательности образом. ZFP или его домен представляет собой белок или его домен в более крупном белке, который связывает ДНК специфическим в отношении последовательности образом посредством одного или более цинковых пальцев, области аминокислотной последовательности в связывающем домене, структура которого стабилизируется за счет координации иона цинка.

[00295] Среди ZFP встречаются домены ZFP, нацеленные на конкретные последовательности ДНК, как правило, длиной 9-18 нуклеотидов, созданные за счет сборки отдельных «пальцев». ZFP включают те, в которых единственный пальцевой домен имеет длину приблизительно 30 аминокислот и содержит альфа-спираль, содержащую два инвариантных остатка гистидина, скоординированных посредством цинка, с двумя цистеинами одного бета-изгиба, и которые содержат два, три, четыре, пять или шесть пальцев. В общем случае специфичность в отношении последовательности ZFP можно менять посредством аминокислотных замен в четырех позициях спирали (-1, 2, 3 и 6) в цинк-пальцевой спирали распознавания. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления ZFP или ZFP-содержащая молекула не встречаются в природе, например, сконструированы для связывания с выбранным целевым сайтом. Смотрите, например, Beerli et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo et al. (2001) *Ann. Rev. Biochem.*

70:313-340; Isalan et al. (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal et al. (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo et al. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; патенты США №№ 6453242; 6534261; 6599692; 6503717; 6689558; 7030215; 6794136; 7067317; 7262054; 7070934; 7361635; 7253273; и публикации патентов США №№ 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[00296] Многие ген-специфические сконструированные цинковые пальцы доступны на коммерческой основе. Например, Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA) разработали платформу (ComproZr) для конструирования цинковых пальцев совместно с Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), которая позволяет исследователям обойти как конструирование, так и валидацию цинковых пальцев и обеспечивает специфически нацеленные цинковые пальцы для тысяч белков (Gaj et al., *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7), 397-405). В некоторых вариантах осуществления используют коммерчески доступные или специально сконструированные цинковые пальцы.

[00297] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический связывающий домен содержит встречающийся в природе или сконструированный (не встречающийся в природе) ДНК-связывающий домен на основе подобного активатору транскрипции белка (TAL), такой как в белке на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALE). Смотрите, например, публикацию патента США № 20110301073, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки.

[00298] В некоторых вариантах осуществления сайт-специфический связывающий домен получен из системы CRISPR/Cas. В общем случае «система CRISPR» в целом относится к транскриптам и другим элементам, участвующим в экспрессии или управлении активностью CRISPR-ассоциированных («Cas») генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas, последовательность *tracr* (транс-активирующих CRISPR) (например *tracr*PHK или активную частичную *tracr*PHK), парную последовательность *tracr* (включающую «прямой повтор» и *tracr*PHK-процессируемый частичный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), гидовую последовательность (также называемую «спейсером» в контексте эндогенной системы CRISPR или «нацеливающей последовательностью») и/или другие последовательности и транскрипты из локуса CRISPR.

[00299] В общем случае гидовая последовательность включает нацеливающий домен, содержащий полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную степень комплементарности с целевой полинуклеотидной последовательностью для гибридизации с целевой последовательностью и управления специфическим в отношении последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью, при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания, составляет около или более чем около 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99%

или более. В некоторых примерах нацеливающий домен гРНК является комплементарным, например по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98 или 99% комплементарным, например полностью комплементарным, целевой последовательности в целевой нуклеиновой кислоте.

[00300] В некоторых вариантах осуществления целевой сайт расположен выше сайта инициации транскрипции целевого гена. В некоторых вариантах осуществления целевой сайт примыкает к сайту инициации транскрипции гена. В некоторых вариантах осуществления целевой сайт примыкает к сайту остановки РНК-полимеразы ниже сайта инициации транскрипции гена.

[00301] В некоторых вариантах осуществления нацеливающий домен сконструирован для нацеливания на промоторную область целевого гена для стимуляции инициации транскрипции, связывания одного или более энхансеров или активаторов транскрипции и/или РНК-полимеразы. Для нацеливания на промоторную область гена можно использовать одну или более гРНК. В некоторых вариантах осуществления можно осуществлять нацеливание на одну или более областей гена. В определенных вариантах осуществления целевые сайты расположены в пределах 600 пар оснований с любой стороны сайта инициации транскрипции (СИТ) гена.

[00302] Конструирование или идентификация последовательности гРНК, которая представляет собой или содержит последовательность, нацеленную на ген, включая экзонную последовательность и последовательности регуляторных областей, включая промоторы и активаторы, находятся в компетенции специалиста в данной области техники. Полногеномная база данных гРНК для редактирования генома CRISPR является общедоступной и содержит типовые целевые последовательности одиночной гидовой РНК (огРНК) в конститутивных экзонах генов человеческого генома или мышинового генома (смотрите, например, genescript.com/gRNA-database.html; также смотрите Sanjana et al. (2014) Nat. Methods, 11:783-4; www.e-crisp.org/E-CRISP/; crispr.mit.edu/). В некоторых вариантах осуществления последовательность гРНК представляет собой или содержит последовательность с минимальным нецелевым связыванием с нецелевым геном.

[00303] В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор дополнительно содержит функциональный домен, например, активатор транскрипции.

[00304] В некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции представляет собой или содержит один или более регуляторных элементов, таких как один или более элементов контроля транскрипции целевого гена, посредством которых предложенный выше сайт-специфический домен управляет экспрессией такого гена. В некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции управляет экспрессией целевого гена. В некоторых случаях активатор транскрипции может представлять собой или содержать весь или часть гетерологичного домена трансактиваии. Например, в некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции выбран из полученного из вируса простого герпеса домена трансактиваии, домена метилтрансферазы Dnmt3a, p65, VP16 и VP64.

[00305] В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор представляет собой цинк-пальцевой транскрипционный фактор (ZF-TF). В некоторых вариантах осуществления регуляторный фактор представляет собой VP64-p65-Rta (VPR).

[00306] В определенных вариантах осуществления регуляторный фактор дополнительно содержит домен регуляции транскрипции. Обычные домены включают, например, домены транскрипционных факторов (активаторы, репрессоры, коактиваторы, корепрессоры), сайленсеры, онкогены (например, члены семейств *myc*, *jun*, *fos*, *myb*, *max*, *mad*, *rel*, *ets*, *bcl*, *myb*, *mos* и т. д.); ферменты репарации ДНК и связанные с ними факторы и модификаторы; ферменты перестройки ДНК и связанные с ними факторы и модификаторы; связанные с хроматином белки и их модификаторы (например киназы, ацетилазы и деацетилазы); и ДНК-модифицирующие ферменты (например, метилтрансферазы, такие как члены семейства DNMT (например, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L и т. д., топоизомеразы, геликазы, лигазы, киназы, фосфатазы, полимеразы, эндонуклеазы) и связанные с ними факторы и модификаторы. Смотрите, например, публикацию США № 2013/0253040, в полном объеме включенную в данный документ посредством ссылки.

[00307] Подходящие домены для обеспечения активации включают домен активации HSV VP 16 (смотрите, например, Hagmann et al, *J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)), рецепторы ядерного гормона (смотрите, например, Torchia et al., *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:373-383 (1998)); субъединицу p65 ядерного фактора каппа В (Bitko & Bank, *J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) и Doyle & Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); Liu et al., *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998) или искусственные химерные функциональные домены, такие как VP64 (Beerli et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14623-33), и дегрон (Molinari et al., (1999) *EMBO J.* 18, 6439-6447). Дополнительные типовые домены активации включают Oct 1, Oct-2A, Spl, AP-2 и CTF1 (Seipel et al, *EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992), а также p300, CBP, PCAF, SRC1 P_vALF, AtHD2A и ERF-2. Смотрите, например, Robyr et al, (2000) *Mol. Endocrinol.* 14:329-347; Collingwood et al, (1999) *J. Mol. Endocrinol* 23:255-275; Leo et al, (2000) *Gene* 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89; McKenna et al, (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:3-12; Malik et al, (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283; и Lemon et al, (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504. Дополнительные типовые домены активации включают, но не ограничиваются этим, OsGAI, HALF-1, Cl, AP1, ARF-5, -6, -1 и -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP и TRAB1. Смотрите, например, Ogawa et al, (2000) *Gene* 245:21-29; Okanami et al, (1996) *Genes Cells* 1:87-99; Goff et al, (1991) *Genes Dev.* 5:298-309; Cho et al, (1999) *Plant Mol Biol* 40:419-429; Ulmason et al, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849; Sprenger-Haussels et al, (2000) *Plant J.* 22:1-8; Gong et al, (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44; и Hobo et al. , (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15,348-15,353.

[00308] Типовые домены репрессии, которые можно использовать для создания генетических репрессоров, включают, но не ограничиваются этим, KRAB A/B, KOX, TGF-бета-индуцибельный ранний ген (TIEG), *v-erbA*, SID, MBD2, MBD3, членов семейства

DNMT (например, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L и т. д.), Rb и MeCP2. Смотрите, например, Bird et al, (1999) *Cell* 99:451-454; Tyler et al, (1999) *Cell* 99:443-446; Knoepfler et al, (1999) *Cell* 99:447-450; и Robertson et al, (2000) *Nature Genet.* 25:338-342. Дополнительные типовые домены репрессии включают, но не ограничиваются этим, ROM2 и AtHD2A. Смотрите, например, Chem et al, (1996) *Plant Cell* 8:305-321; и Wu et al, (2000) *Plant J.* 22:19-27.

[00309] В некоторых случаях домен участвует в эпигенетической регуляции хромосомы. В некоторых вариантах осуществления домен представляет собой гистонацетилтрансферазу (НАТ), например типа А, локализованную в ядре, такую как члены семейства MYST MOZ, Ybf2/Sas3, MOF и Tip60, члены семейства GNAT Gcn5 или pCAF, члены семейства p300 CBP, p300 или Rtt109 (Bemdsen and Denu (2008) *Curr Opin Struct Biol* 18(6):682-689). В других случаях домен представляет собой гистондеацетилазу (HD AC), например класса I (HDAC-1, 2, 3 и 8), класса II (HDAC IIA (HDAC-4, 5, 7 и 9), HD AC IIB (HDAC 6 и 10)), класса IV (HDAC-I 1), класса III (также известные как сиртуины (SIRT); SIRT1-7) (смотрите Mottamal et al., (2015) *Molecules* 20(3):3898-3941). Другим доменом, который используют в некоторых вариантах осуществления, является гистонфосфорилаза или киназа, а примеры включают MSK1, MSK2, ATR, ATM, DNA-ПК, Vubl, VprBP, IKK-a, PKC α , Dik/Zip, JAK2, PKC5, WSTF и CK2. В некоторых вариантах осуществления используют домен метилирования, который может быть выбран из групп, таких как Ezh2, PRMT1/6, PRMT5/7, PRMT 2/6, CARM1, set7/9, MLL, ALL-1, Suv 39h, G9a, SETDB1, Ezh2, Set2, Dot1, PRMT 1/6, PRMT 5/7, PR-Set7 и Suv4-20h. Также в некоторых вариантах осуществления можно использовать домены, участвующие в сумоилировании и биотинилировании (Lys9, 13, 4, 18 и 12) (обзор смотрите в Kousarides (2007) *Cell* 128:693-705).

[00310] Слитые молекулы конструируют методами клонирования и биохимической конъюгации, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Слитые молекулы содержат ДНК-связывающий домен и функциональный домен (например, домен активации или репрессии транскрипции). Слитые молекулы также необязательно содержат сигналы ядерной локализации (такие как, например, из среднего Т-антигена SV40) и эпитопные теги (такие как, например, FLAG и гемагглютинин). Слитые белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) конструируют так, чтобы сохранить трансляционную рамку считывания среди компонентов слияния.

[00311] Слияния между полипептидным компонентом функционального домена (или его функционального фрагмента) с одной стороны, и небелковым ДНК-связывающим доменом (например, антибиотиком, интеркалятором, связывающим малую бороздку компонентом, нуклеиновой кислотой) с другой, конструируют методами биохимической конъюгации, известными специалистам в данной области техники. Смотрите, например, каталог компании Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Методы и композиции для создания таких слияний между связывающим малую бороздку компонентом и полипептидом были описаны. Mapp et al, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

97:3930-3935. Аналогично, CRISPR/Cas TF и нуклеазы, содержащие компонент нуклеиновой кислоты оgРНК в ассоциации с функциональным доменом полипептидного компонента, также известны специалистам в данной области техники и подробно описаны в данном документе.

[00312] Процесс внесения описанных в данном документе полинуклеотидов в клетки можно осуществлять любым подходящим способом. Подходящие способы включают опосредованную фосфатом кальция или липидами трансфекцию, электропорацию и трансдукцию или инфицирование с помощью вирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды вносят в клетку посредством вирусной трансдукции (например, лентивирусной трансдукции).

[00313] После изменения наличие экспрессии любой молекулы, описанной в данном документе, можно анализировать, используя известные методики, такие как вестерн-блот, анализ ELISA, анализ FACS и т. п.

[00314] В некоторых вариантах осуществления представленная технология предлагает гипоиммуногенные плюрипотентные клетки, которые содержат «суицидальный ген» или «суицидальный переключатель». Они включены, чтобы функционировать как «защитный переключатель», который может вызвать гибель гипоиммуногенных плюрипотентных клеток, если они будут расти и делиться нежелательным образом. Подход абляции суицидального гена включает суицидальный ген в векторе для переноса генов, кодирующем белок, который приводит к гибели клеток только при активации определенным соединением. Суицидальный ген может кодировать фермент, избирательно преобразующий нетоксичное соединение в высокотоксичные метаболиты. Результатом является специфическое удаление клеток, экспрессирующих этот фермент. В некоторых вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой ген тимидинкиназы вируса гермеса (HSV-tk), а триггером является ганцикловир. В других вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой ген цитозиндезаминазы *Escherichia coli* (EC-CD), а триггером является 5-фторцитозин (5-FC) (Barese et al, Mol. Therap. 20(10): 1932-1943 (2012), Xu et al, Cell Res. 8:73-8 (1998), обе в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки).

[00315] В других вариантах осуществления суицидальный ген представляет собой индуцибельный белок каспазы. Индуцибельный белок каспазы содержит по меньшей мере часть белка каспазы, способную индуцировать апоптоз. В предпочтительных вариантах осуществления индуцибельный белок каспазы представляет собой iCasp9. Он содержит последовательность белка, связывающего FK506 человека, FKBP12, с мутацией F36V, связанного рядом аминокислот с геном, кодирующим каспазу 9 человека. FKBP12-F36V с высокой аффинностью связывается с низкомолекулярным димеризующим агентом, AP1903. Таким образом, суицидальную функцию iCasp9 инициируют введением химического индуктора димеризации (ХИД). В некоторых вариантах осуществления ХИД представляет собой низкомолекулярное лекарственное средство API 903. Димеризация вызывает быструю индукцию апоптоза. (Смотрите, WO2011146862; Stasi et al, N. Engl. J.

Med 365;18 (2011); Tey et al, *Biol. Blood Marrow Transplant.* 13:913-924 (2007), каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки).

Создание гипоиммуногенных плюрипотентных стволовых клеток

[00316] В настоящей технологии предложены способы получения гипоиммуногенных плюрипотентных клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает создание плюрипотентных стволовых клеток. Создание мышинных и человеческих плюрипотентных стволовых клеток (обычно называемых iPSC; miPSC в случае мышинных клеток или hiPSC в случае человеческих клеток) в общем случае известно в данной области техники. Какпонятно специалистам в данной области техники, существует множество разных способов создания iPSC. Первоначальную индукцию проводили из эмбриональных или взрослых фибробластов мышей, используя вирусное внесение четырех факторов транскрипции: Oct3/4, Sox2, c-Мус и Klf4; смотрите Takahashi and Yamanaka *Cell* 126:663-676 (2006), которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки, в частности, в отношении описанных в ней методик. С тех пор был разработан ряд методов; смотрите обзор в Seki et al, *World J. Stem Cells* 7(1): 116-125 (2015), и Lakshmipathy and Vermuri, editors, *Methods in Molecular Biology: Pluripotent Stem Cells, Methods and Protocols*, Springer 2013, содержание которых явным образом в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки, в частности, в отношении методов создания hiPSC (смотрите, например, главу 3 последней ссылки).

[00317] В общем случае iPSC создают посредством временной экспрессии одного или более перепрограммирующих факторов в клетке-хозяине, обычно вносимых с помощью эписомальных векторов. В этих условиях происходит индукция небольшого количества клеток, которые становятся iPSC (в целом, эффективность этого этапа является низкой, поскольку на нем не используют селекционные маркеры). Как только клетки «перепрограммированы», и становятся плюрипотентными, они утрачивают эписомальный(е) вектор(ы) и вырабатывают факторы, используя эндогенные гены.

[00318] Как также понятно специалистам в данной области техники, количество перепрограммирующих факторов, которые можно использовать или используют, может варьироваться. Обычно при использовании меньшего количества перепрограммирующих факторов снижается эффективность трансформации клеток в плюрипотентное состояние, а также «плюрипотентность», например, меньшее количество перепрограммирующих факторов может приводить к тому, что клетки не становятся полностью плюрипотентными и могут быть способны дифференцироваться только в меньшее количество типов клеток.

[00319] В некоторых вариантах осуществления используют один перепрограммирующий фактор, OCT4. В других вариантах осуществления используют два перепрограммирующих фактора, OCT4 и KLF4. В других вариантах осуществления используют три перепрограммирующих фактора, OCT4, KLF4 и SOX2. В других вариантах осуществления используют четыре перепрограммирующих фактора, OCT4, KLF4, SOX2 и c-Мус. В других вариантах осуществления можно использовать 5, 6 или 7

перепрограммирующих факторов, выбранных из группы, состоящей из SOKMNLT; SOX2, OCT4 (POU5F1), KLF4, MYC, NANOG, LIN28 и Т-антигена SV40L. В общем случае гены этих перепрограммирующих факторов предоставлены в эписомальных векторах, таких как известные в данной области техники и коммерчески доступные.

[00320] В общем случае, как известно в данной области техники, iPSC получают из неплюрипотентных клеток, таких как, но не ограничиваясь этим, клетки крови, фибробласты и т. д., посредством временной экспрессии перепрограммирующих факторов, как описано в данном документе.

Анализы фенотипов гипоиммуногенности и сохранения плюрипотентности

[00321] После получения гипоиммуногенных клеток их можно анализировать в отношении их гипоиммуногенности и/или сохранения плюрипотентности, как описано в WO 2016183041 и WO 2018132783, каждая из которых в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

[00322] В некоторых вариантах осуществления гипоиммуногенность анализируют, используя ряд методик, проиллюстрированных на Фиг. 13 и Фиг. 15 в WO2018132783, включенной в данный документ посредством ссылки. Эти методики включают трансплантацию аллогенным хозяевам и наблюдение за ростом гипоиммуногенных плюрипотентных клеток (например, тератом), которые ускользнули от иммунной системы хозяина. В некоторых случаях производные гипоиммуногенных плюрипотентных клеток трансдуцируют для экспрессии люциферазы, после чего их можно исследовать, используя биолюминесцентную визуализацию. Аналогично исследуют Т-клеточный и/или В-клеточный ответ животного-хозяина на такие клетки, чтобы подтвердить, что клетки не вызывают иммунную реакцию у животного-хозяина. Т-клеточные ответы можно оценивать методами Elispot, ELISA, FACS, ПЦР или масс-цитометрии (CYTOF). В-клеточные ответы или ответы антител оценивают, используя FACS или LumineX. В дополнительном или альтернативном варианте клетки можно анализировать в отношении их способности избегать ответов врожденного иммунитета, например, уничтожения НК-клетками, как в целом проиллюстрировано на Фиг. 14 и 15 в WO2018132783, включенной в данный документ посредством ссылки.

[00323] В некоторых вариантах осуществления иммуногенность клеток оценивают, используя иммуноанализы Т-клеток, такие как анализы пролиферации Т-клеток, анализы активации Т-клеток и анализы уничтожения Т-клетками, известные специалистам в данной области техники. В некоторых случаях анализ пролиферации Т-клеток включает предварительную обработку клеток гамма-интерфероном и совместное культивирование клеток с мечеными Т-клетками и анализ присутствия популяции Т-клеток (или популяции пролиферирующих Т-клеток) через предварительно выбранный промежуток времени. В некоторых случаях анализ активации Т-клеток включает совместное культивирование Т-клеток в соответствии с представленной технологией и определение уровней экспрессии маркеров активации Т-клеток в Т-клетках.

[00324] Для оценки иммуногенности описанных в данном документе клеток можно

проводить анализы *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления выживаемость и иммуногенность гипоиммуногенных клеток определяют, используя в качестве модели аллогенных гуманизированных мышей с ослабленным иммунитетом. В некоторых случаях гипоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки трансплантируют аллогенным гуманизированным мышам NSG-SGM3 и анализируют в отношении отторжения клеток, выживаемости клеток и образования тератом. В некоторых случаях привитые гипоиммуногенные плюрипотентные стволовые клетки или их дифференцированные клетки демонстрируют долгосрочную выживаемость в мышинной модели.

[00325] Дополнительные методики определения иммуногенности, включая гипоиммуногенность клеток, описаны, например, в Deuse et al., *Nature Biotechnology*, 2019, 37, 252-258 и Han et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(21), 10441-10446, описания которых, включая фигуры, подписи к фигурам и описание способов, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[00326] Аналогично, сохранение плюрипотентности исследуют рядом способов. В одном варианте осуществления плюрипотентность оценивают по экспрессии определенных факторов, специфических для плюрипотентности, как в целом описано в данном документе и показано на Фиг. 29 в WO2018132783, которая включена в данный документ посредством ссылки. В дополнительном или альтернативном варианте плюрипотентные клетки дифференцируют в один или более типов клеток, что свидетельствует о плюрипотентности.

[00327] Как понятно специалистам в данной области техники, успешное снижение функции ГКГС I (HLA I, когда клетки получены из человеческих клеток) в плюрипотентных клетках можно определять, используя методики, известные в данной области техники и описанные ниже; например, методику FACS с использованием меченых антител, которые связывают комплекс HLA; например, используя коммерчески доступные антитела к HLA-A, B, C, которые связываются с альфа-цепью антигенов HLA класса I главного комплекса гистосовместимости человека.

[00328] Кроме того, клетки можно исследовать, чтобы подтвердить, что комплекс HLA I не экспрессируется на клеточной поверхности. Это можно анализировать с помощью анализа FACS, используя антитела к одному или более компонентам клеточной поверхности HLA, как обсуждалось выше.

[00329] Успешное снижение функции ГКГС II (HLA II, когда клетки получены из человеческих клеток) в плюрипотентных клетках или их производных можно определять, используя методики, известные в данной области техники, такие как вестерн-блоттинг с использованием антител к белку, методики FACS, методики ОТ-ПЦР и т. д.

[00330] Кроме того, клетки можно исследовать, чтобы подтвердить, что комплекс HLA II не экспрессируется на клеточной поверхности. Опять же, этот анализ проводят так, как известно в данной области техники (смотрите, например, Фиг. 21 в WO2018132783, которая включена в данный документ посредством ссылки), и в общем

случае проводят, используя вестерн-блоттинг или анализ FACS на основе коммерческих антител, которые связываются с HLA-антигенами человека класса II, HLA-DR, DP и большинством DQ.

[00331] В дополнение к снижению уровня HLA I и II (или ГКГС I и II) гипои иммуногенные клетки обладают сниженной подверженностью фагоцитозу макрофагами и уничтожению NK-клетками. Полученные в результате гипои иммуногенные клетки «избегают» иммунных макрофагов и путей врожденного иммунитета из-за экспрессии одного или более трансгенов CD47 или одного или более трансгенов CD24.

[00332] Кроме того, любые клетки, описанные в данном документе, ингибируют микроглиальный фагоцитоз. Кроме того, клетки можно исследовать, чтобы подтвердить ингибирование микроглиального фагоцитоза. Это можно анализировать и оценивать, используя, например, красители для отслеживания нейральных клеток, Elispot, ELISA, FACS, ПЦР, масс-цитометрию (СУТОF), иммуноокрашивание, анализы микроглиальной активации или другие анализы, известные в данной области техники для измерения микроглиального фагоцитоза или функционального состояния микроглии. Можно проводить нейральные оценки реципиента, которому вводили нейральные клетки по представленной технологии. Неограничивающие примеры применимых нейральных оценок включают структурную/функциональную оценку головного мозга методом МРТ, ПЭТ-визуализацию, ПЭТ/МРТ-визуализацию, исследования двигательной функции, нейропсихологическое тестирование, нейрокогнитивные оценки, когнитивные и поведенческие оценки, тестирование пространственного обучения, тестирование памяти и любое клинически признанное тестирование для оценки пациента в любыми неврологическими расстройствами, описанными в данном документе. Например, подробное описание анализов *in vitro* и *in vivo* и исследований, применимых для оценки структуры и функции микроглии, можно найти, например, в Ramesha et al., J. Vis. Exp., 2005, (160), e61467; Beurner et al., Gene Therapy, 2013, 20:797-806; Pearse et al., Int J Mol Scie, 2018, 19(9), 2550; Svoboda et al., Prot Natl Acad Scie USA, 2019, 116(50):25293-25303; Mancuso et al., Nat Neurosc, 2019, 22:2111-2116; Modo et al., Brain Research, 2002, 958(1):70-82; и Xu et al., Cell Reports, 2020, 32(6):108041, а также в патентах США №№ 9724432; 10190095; 10279051; 10485807; 10626369; публикации заявки США № 20200197445; и публикаций заявок РСТ №№ WO2000023571; WO2003070171; WO2008089267; WO2009137674; WO2014124087; WO2018209022; WO2019246262; WO2020167822; и WO2021011936.

Поддержание гипои иммуногенных плюрипотентных стволовых клеток

[00333] После образования гипои иммуногенных плюрипотентных стволовых клеток их можно поддерживать в недифференцированном состоянии, как известно для поддержания iPSC. Например, клетки можно культивировать на матрикеле, используя питательную среду, предотвращающую дифференцировку и сохраняющую плюрипотентность. Кроме того, они могут находиться в культуральной среде в условиях, обеспечивающих сохранение плюрипотентности.

Трансплантация нейральных клеток, дифференцированных из гипоиммуногенных клеток

[00334] Как понятно специалистам в данной области техники, производные дифференцированных гипоиммуногенных плюрипотентных клеток можно трансплантировать, используя методики, известные в данной области техники, которые зависят как от типа клеток, так и от конечного использования этих клеток.

[00335] Нейральные клетки можно вводить способом, который подволяет им приживляться в соответствующем тканевом участке и восстанавливать или регенерировать область с нарушением функциональности. Например, нейральные клетки можно трансплантировать непосредственно в паренхимальные или интратекальные участки центральной нервной системы в соответствии с заболеванием, лечение которого проводят. В некоторых вариантах осуществления любые нейральные клетки, описанные в данном документе, включая церебральные эндотелиальные клетки, нейроны, дофаминергические нейроны, эпендимные клетки, астроциты, микроглиальные клетки, олигодендроциты и шванновские клетки, вводят пациенту путем внутривенной, интраспинальной, интрацеребровентрикулярной, интратекальной, внутриартериальной, внутримышечной, внутрибрюшинной, подкожной, внутримышечной, интраабдоминальной, внутриглазной, ретробульбарной инъекции и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления клетки вводят или депонируют в форме болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В определенных вариантах осуществления нейральные клетки вводят путем инъекции в головной мозг, в подходящий участок головного мозга и их комбинации. Инъекцию можно проводить, например, через просверленное в черепе субъекта отверстие. Подходящие участки для введения нейральных клеток в головной мозг включают, но не ограничиваются этим, желудочек головного мозга, боковые желудочки, мозжечково-мозговую цистерну, скорлупу, базальное ядро, кору гиппокампа, полосатое тело, области хвостатого ядра головного мозга и их комбинации.

[00336] Для терапевтических применений клетки, полученные в соответствии с раскрытыми способами, как правило, могут быть предоставлены в форме фармацевтической композиции, содержащей изотонический эксципиент, и получены в условиях, которые являются в достаточной степени стерильными для применения человеком. Общие принципы медицинских составов клеточных композиций смотрите в “Cell Therapy: Stem Cell Transplantation, Gene Therapy, and Cellular Immunotherapy,” by Morstyn & Sheridan eds, Cambridge University Press, 1996; и “Hematopoietic Stem Cell Therapy,” E. D. Ball, J. Lister & P. Law, Churchill Livingstone, 2000. Клетки могут быть упакованы в устройстве или контейнере, подходящих для распределения или клинического применения.

[00337] Дополнительные способы введения дифференцированных нейральных клеток полностью описаны в литературе. Смотрите, например, Xi, J et al., Specification of Midbrain Dopamine Neurons from Primate Pluripotent Stem Cells. Stem Cells, 2012; 30:1655-

1663; Kim et al., Biphasic Activation of WNT Signaling Facilitates the Derivation of Midbrain Dopamine Neurons from hESCs for Translational Use, *Cell Stem Cell*, 2021; 28:343-355; Nolbrant et al., Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation, *Nature Protocols*, 2018; 12:9 1962-1979; Xiong et al., Human Stem Cell-Derived Neurons Repair Circuits and Restore Neural Function, *Cell Stem Cell*, 2021, 28:1-15; и патент США № 10858625, патент США № 10828335, патент США № 8597945, патентную заявку США № 2016/0348070A1; патентную заявку США № 2019/0211306A1; WO2018035214A1; и WO2019016113A1, описания которых в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки, включая фигуры, описания фигур и примеры.

Иммуносупрессивные агенты

[00338] В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту перед введением (например, первым введением) популяции гипоиммуногенных нейральных клеток.

[00339] Во многих вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту перед первым введением популяции гипоиммуногенных нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более перед первым введением нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более перед первым введением нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту после первого введения нейральных клеток или вводят по меньшей мере через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более после первого введения нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после первого введения нейральных клеток. Неограничивающие примеры иммуносупрессивного и/или иммуномодулирующего агента включают циклоспорин, азатиоприн, микофеноловую кислоту, микофенолата мофетил, кортикостероиды, такие как преднизон, метотрексат, соли золота, сульфасалазин, противомаларийные средства, бреквинар, лефлуномид, мизорибин, 15-деоксиспергуалин, 6-меркаптопурин, циклофосфамид, рапамицин, такролимус (FK-506), ОКТ3, антитимоцитарный глобулин, тимопентин, тимозин- α и сходные агенты. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент выбран из группы иммуносупрессивных антител, состоящей из антител, связывающихся с p75 рецептора IL-2, антител, связывающихся, например, с MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN-гамма, TNF-альфа, IL-4, IL-5, IL-6R, IL-6, IGF, IGFR1, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a или CD58, и антител, связывающихся с

любыми их лигандами. В одном варианте осуществления такой иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент может быть выбран из растворимых молекул IL-15R, IL-10, B7 (например, B7-1, B7-2, их вариантов и их фрагментов), ICOS и OX40, ингибитора негативного Т-клеточного регулятора (такого как антитело к CTLA-4) и сходных агентов. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после первого введения нейральных клеток, введение осуществляют в более низкой дозировке, чем потребовалась бы для клеток с экспрессией ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после первого введения нейральных клеток, введение осуществляют в более низкой дозировке, чем потребовалась бы для клеток с экспрессией ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD24.

[00340] Во многих вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент не вводят пациенту перед введением популяции гипоиммуногенных клеток. Во многих вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту перед первым и/или вторым введением популяции гипоиммуногенных нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более перед введением нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более перед первым и/или вторым введением нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере за 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 дней или более после введения нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят по меньшей мере через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель или более после первого и/или второго введения нейральных клеток. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после введения клеток, введение осуществляют в более низкой дозировке, чем потребовалась бы для клеток с экспрессией ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD47. В некоторых вариантах осуществления, в которых иммуносупрессивный и/или иммуномодулирующий агент вводят пациенту до или после введения клеток, введение осуществляют в более низкой дозировке, чем потребовалась бы для клеток с экспрессией ГКГС I и/или ГКГС II и без экзогенной экспрессии CD24.

Примеры

Пример 1. Трансплантаты гипоиммуногенных церебральных эндотелиальных клеток для лечения неврологического заболевания

Уровень техники

[00341] С появлением клеточной терапии для эндотелиальных клеток (ЭК) было предположено наличие благоприятных эффектов клеточно-опосредованного восстановления сосудов при различных неврологических заболеваниях. Церебральные ЭК обеспечивают структурную поддержку, контроль потока крови и регулируют нейротрансмиттеры, все параметры, которые нарушаются при болезненном состоянии. В общем случае центральная нервная система (ЦНС) считается иммунопривилегированной из-за своей иммунологически уникальной ниши, отделенной от циркуляции гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ). Однако сложные нейроиммунные взаимодействия между трансплантированными клетками в головном мозге и локальным иммунным окружением до сих пор не были четко определены. В частности, нарушение ГЭБ в контексте стереотактической доставки клеток может препятствовать его иммунной барьерной функции и делать аллогенные клеточные трансплантаты подверженными отторжению.

Методы

1. Дифференцировка эндотелиальных клеток (ЭК)

[00342] iPSC высевали на желатин в 6-луночные планшеты и поддерживали в среде для iPSC. После достижения клетками 60% конфлюентности начиналась дифференцировка, а среду меняли на RPMI-1640, содержащую 2% B-27 минус инсулина (оба Gibco) и 5 мкМ CHIR-99021 (Selleckchem, Munich, Germany). На день 2 среду меняли на сокращенную среду: RPMI-1640, содержащую 2% B-27 минус инсулина (оба Gibco) и 2 мкМ CHIR-99021 (Selleckchem). От дня 4 до дня 7 клетки держали в среде RPMI-1640 для ЭК, RPMI-1640, содержащей 2% B-27 минус инсулина плюс 50 нг/мл мышинового фактора роста сосудистого эндотелия (mVEGF; R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 нг/мл мышинового фактора роста фибробластов, основного (mFGFb; R&D Systems), 10 мкМ Y-27632 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) и 1 мкМ SB 431542 (Sigma-Aldrich). Кластеры эндотелиальных клеток были видимыми, начиная с дня 7, а клетки поддерживали в базовой среде для эндотелиальных клеток 2 (PromoCell, Heidelberg, Germany) плюс добавки, 10% ФТС hi (Gibco), 1% пенициллина/стрептомицина, 25 нг/мл VEGF, 2 нг/мл FGFb, 10 мкМ Y-27632 (Sigma-Aldrich) и 1 мкМ SB 431542 (Sigma-Aldrich). Процесс дифференцировки завершали через 21 день, а недифференцированные клетки отделяли во время процесса дифференцировки. Для очистки клетки подвергали очистке MACS в соответствии с протоколом производителя, используя покрытые анти-CD15 mAb магнитные микрогранулы (Miltenyi, Auburn, CA) для отрицательного отбора. Очищенные в высокой степени ЭК в проточном режиме культивировали в среде для ЭК, как описано выше. TрупLE использовали для пассирования клеток 1:3 каждые 3-4 дня.

2. Анализ уничтожения посредством микроглиального фагоцитоза методом XCelligence (Фиг. 1)

[00343] Анализ микроглиального уничтожения проводили на платформе XCelligence (ACEA BioSciences, San Diego, CA.). 96-луночные E-планшеты (ACEA BioSciences) покрывали коллагеном (Sigma-Aldrich) и 4×10^5 дт, B2m^{-/-}Ciita^{-/-} или B2m^{-/-}

$Ciita^{-/-}$ CD47 tg ЭК и высевали в 100 мкл клеточно-специфической среды. После того, как клеточный индекс достигал значения 0,7, добавляли микроглию при соотношении Э:М 1:1. В качестве отрицательного контроля клетки обрабатывали 2% тритонX-100 (данные не приведены). Данные стандартизировали и анализировали с помощью программного обеспечения RTCA (ACEA).

3. Elispot Т-клеток (Фиг. 2)

[00344] 1×10^6 дт или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg вводили в полосатое тело головного мозга или мышцу конечности, а через 5 дней вырезали селезенки для выделения Т-клеток. Для Т-клеточного специфического анализа Elispot Т-клетки от мышей BALB/c культивировали совместно с дт или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg ЭК и измеряли высвобождение IFN- γ в них. Обработанные митомицином (50 мкг/мл в течение 30 мин) клетки-стимуляторы инкубировали с Т-клетками в течение 24 ч и подсчитывали частоту пятен IFN- γ , используя планшет-ридер Elispot. Т-клетки без клеток-стимуляторов использовали как фоновый контроль.

4. Донор-специфические антитела (Фиг. 3)

[00345] Донор-специфические антитела (DSA) выявляли с помощью анализа FACS. Сыворотку Balb/c через 5 дней после трансплантации дт или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg ЭК инкубировали с клетками трансплантата и количественно оценивали связывание специфических к трансплантату антител. Анализировали только антитела IgM из-за известного быстрого повышения их количества в течение 5 дней после аллогенной стимуляции. Антитела IgM окрашивали посредством инкубации клеток с PE-конъюгированным козьим антителом к Fc-части мышинового IgM (BD Biosciences). Клетки промывали, а затем анализировали на системе Attune. Данные по флуоресценции выражали в СИФ.

5. Биоломинесцентная визуализация (БЛВ; Фиг. 4-7)

[00346] Для БЛВ калиевую соль D-люциферина светляков (375 мг/кг) (Biosynth AG), растворенную в стерильном ФСБ (pH 7,4) (Gibco, Invitrogen), в/б вводили (250 мкл на мышшь) анестезированным мышам. Визуализацию животных проводили, используя ami HT (Spectral Instruments Imaging, Tucson, AZ). Биоломинесценцию области интереса (ОИ) количественно оценивали в единицах максимального числа фотонов в секунду на квадратный сантиметр на стерадиан (ф/с/см²/ст). Максимальный сигнал от ОИ измеряли, используя программное обеспечение Living Image (Media Cybernetics). Мышей наблюдали в день 0, день 1 и через день до тех пор, пока не происходило отторжение клеток или до 28 дней.

Результаты

[00347] Чтобы преодолеть иммунное отторжение после трансплантации гипои иммуногенные iPSC конструировали так, чтобы они могли избегать аллогенного иммунного распознавания, путем инактивации генов B2M и CIITA для уменьшения числа эпитопов главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) I и II, используя CRISPR-Cas9 и направляющие, и обеспечивали сверхэкспрессию CD47 для защиты от уничтожения

врожденным иммунитетом.

[00348] Микроглия действует как первая линия активной иммунной защиты в головном мозге. С использованием *in vitro* условий было продемонстрировано, что гипои иммуногенные ЭК (сверхэкспрессирующие CD47) напрямую защищены от микроглиального фагоцитоза (Фиг. 1). В этом эксперименте оценивали эффект экспрессии CD47 и ингибирования микроглии. Человеческие ЭК дикого типа, ЭК с двойным нокаутом (B2M-/-СИТА-/-) и dKO/CD47Tg (B2M-/-СИТА-/- CD47 tg) ЭК культивировали совместно с аллогенными макрофагами или микроглией человека. Данные показывают CD47 защищал клетки с двойным нокаутом (dKO) от уничтожения макрофагами (Фиг. 1, верхняя панель). CD47 также защищал клетки с двойным нокаутом (dKO) от микроглиального уничтожения (Фиг. 1, нижняя панель).

[00349] Исследовали иммунную участь полученных из iPSC мышей C57BL/6 ЭК в головном мозге после инъекции в полосатое тело. В случае инъекции аллогенным мышам BALB/c ЭК дикого типа (дт) запускали интенсивный лимфоцитарный иммунный ответ интерферона-гамма в селезенке, а также выработку донор-специфических антител (DSA) в сыворотке (Фиг. 2 и 3). После инъекции в полосатое тело аллогенных полностью не совпадающих по ГКГС мышей BALB/c не наблюдали никаких системных или клеточных ответов антител (Фиг. 2 и 3).

[00350] На Фиг. 2 показано сравнение иммунного ответа после трансплантации аллогенных полученных из miPSC эндотелиальных клеток в головной мозг и мышцы. Инъекции ЭК дикого типа в головной мозг индуцировали Т-клеточный ответ по данным анализа IFN-гамма методом Elispot. Клетки dKO/CD47Tg не индуцировали Т-клеточный ответ, что также наблюдали в других органах, включая мышцы.

[00351] На Фиг. 3 показано сравнение иммунного ответа после трансплантации аллогенных полученных из miPSC эндотелиальных клеток в головной мозг и мышцы, определяемого по донор-специфическим антителам (DSA). Инъекции ЭК дикого типа в головной мозг индуцировали ответ донор-специфических антител. В отличие от этого, клетки dKO/CD47Tg не индуцировали выработку DSA, что также наблюдали в других органах, включая мышцы.

[00352] Полученные из miPSC эндотелиальные клетки дикого типа трансплантировали в полосатое тело головного мозга здоровых аллогенных мышей BALB/c. Билюминесцентная визуализация показала, что ЭК дикого типа отторгались в течение 15 дней (4 из 5 мышей), как проиллюстрировано на Фиг. 4.

[00353] При этом ЭК дикого типа выживали у здоровых бежевых мышей SCID с ослабленным иммунитетом (Фиг. 5). Клетки ДТ выживали по меньшей мере в течение 11 дней у мышей с ослабленным иммунитетом.

[00354] Гипои иммунные трансплантаты ЭК стабильно выживали в течение 19 дней последующего наблюдения у аллогенных мышей (7 из 7) без применения иммуносупрессии (Фиг. 6). ЭК dKO/CD47Tg трансплантировали в полосатое тело головного мозга здоровых аллогенных мышей BALB/c. Такие клетки также выживали у

здоровых бежевых мышей SCID с ослабленным иммунитетом (Фиг. 7). ЭК dKO/CD47Tg выживали по меньшей мере в течение 19 дней у мышей с ослабленным иммунитетом.

[00355] Эти данные демонстрируют, что сверхэкспрессия CD47 защищает от микроглиального фагоцитоза. Таким образом, гипоиммунные клетки, экспрессирующие CD47, подходят для терапевтических стратегий в отношении ЦНС. Результаты также показывают, что головной мозг не является «иммунопривилегированным» органом для подходов трансплантации стволовых клеток.

Заключение

[00356] В целом было показано, что композиции гипоиммунногенных клеток, описанные в данном документе, избегают активации иммунных клеток в различных системах органов, включая головной мозг.

Пример 2. Трансплантаты гипоиммунногенных церебральных эндотелиальных клеток в модели инсульта

[00357] Инсульт является одной из основных причин смерти и инвалидности по всему миру. Необходимы новые варианты терапии для облегчения ишемического инсульта. В этом примере описано исследование для изучения применения дифференцированных *in vitro* из плюрипотентных стволовых клеток эндотелиальных клеток для лечения инсульта.

Методы

1. Дифференцировка эндотелиальных клеток (ЭК) *in vitro*

[00358] iPSC высевают на желатин в 6-луночные планшеты и поддерживают в среде для iPSC. После достижения клетками 60% конфлюентности начинается дифференцировка, а среду меняют на RPMI-1640, содержащую 2% B-27 минус инсулина (оба Gibco) и 5 мкМ CHIR-99021 (Selleckchem, Munich, Germany). На день 2 среду меняют на сокращенную среду: RPMI-1640, содержащую 2% B-27 минус инсулина (оба Gibco) и 2 мкМ CHIR-99021 (Selleckchem). От дня 4 до дня 7 клетки держат в среде RPMI-1640 для ЭК, RPMI-1640, содержащей 2% B-27 минус инсулина плюс 50 нг/мл мышинового фактора роста сосудистого эндотелия (mVEGF; R&D Systems, Minneapolis, MN), 10 нг/мл мышинового фактора роста фибробластов, основного (mFGFb; R&D Systems), 10 мкМ Y-27632 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) и 1 мкМ SB 431542 (Sigma-Aldrich). Кластеры эндотелиальных клеток являются видимыми, начиная с дня 7, а клетки поддерживают в базовой среде для эндотелиальных клеток 2 (PromoCell, Heidelberg, Germany) плюс добавки, 10% ФТС hi (Gibco), 1% пенициллина/стрептомицина, 25 нг/мл VEGF, 2 нг/мл FGFb, 10 мкМ Y-27632 (Sigma-Aldrich) и 1 мкМ SB 431542 (Sigma-Aldrich). Процесс дифференцировки завершается через 21 день, а недифференцированные клетки отделяют во время процесса дифференцировки. Для очистки клетки подвергают очистке MACS в соответствии с протоколом производителя, используя покрытые анти-CD15 mAb магнитные микрогранулы (Miltenyi, Auburn, CA) для отрицательного отбора. Очищенные в высокой степени ЭК в проточном режиме культивируют в среде для ЭК, как описано выше. TрупLE используют для пассирования клеток 1:3 каждые 3-4 дня.

2. Анализ уничтожения посредством микроглиального фагоцитоза методом XCelligence

[00359] Анализ микроглиального уничтожения проводят на платформе XCelligence (ACEA BioSciences, San Diego, CA.). 96-луночные E-планшеты (ACEA BioSciences) покрывают коллагеном (Sigma-Aldrich) и 4×10^5 дт, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD24 tg ЭК и высевают в 100 мкл клеточно-специфической среды. После того, как клеточный индекс достигает значения 0,7, добавляют микроглию при соотношении Э:М 1:1. В качестве отрицательного контроля клетки обрабатывают 2% тритонX-100 (данные не приведены). Данные стандартизируют и анализируют с помощью программного обеспечения RTCA (ACEA).

3. Elispot Т-клеток

[00360] 1×10^6 дт, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD24 tg ЭК вводят в полосатое тело головного мозга или мышцу конечности, а через 5 дней вырезают селезенки для выделения Т-клеток. Для Т-клеточного специфического анализа Elispot Т-клетки от мышей Balb/c культивируют совместно с дт, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD24 tg ЭК и измеряют высвобождение IFN- γ в них. Обработанные митомицином (50 мкг/мл в течение 30 мин) клетки-стимуляторы инкубируют с Т-клетками в течение 24 ч и подсчитывают частоту пятен IFN- γ , используя планшет-ридер Elispot. Т-клетки без клеток-стимуляторов используют как фоновый контроль.

4. Донор-специфические антитела

[00361] Донор-специфические антитела (DSA) выявляют с помощью анализа FACS. Сыворотку Balb/c через 5 дней после трансплантации дт, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD24 tg ЭК инкубируют с клетками трансплантата и количественно оценивают связывание специфических к трансплантату антител. Анализируют только антитела IgM из-за известного быстрого повышения их количества в течение 5 дней после аллогенной стимуляции. Антитела IgM окрашивают посредством инкубации клеток с PE-конъюгированным козьим антителом к Fc-части мышинового IgM (BD Biosciences). Клетки промывают, а затем анализируют на системе Attune. Данные по флуоресценции выражают в СИФ.

5. Билюминесцентная визуализация (БЛВ)

[00362] Для БЛВ калиевую соль D-люциферина светляков (375 мг/кг) (Biosynth AG), растворенную в стерильном ФСБ (pH 7,4) (Gibco, Invitrogen), в/б вводят (250 мкл на мышшь) анестезированным мышам. Визуализацию животных проводят, используя ami HT (Spectral Instruments Imaging, Tucson, AZ). Билюминесценцию области интереса (ОИ) количественно оценивают в единицах максимального числа фотонов в секунду на квадратный сантиметр на стерадиан (ф/с/см²/ст). Максимальный сигнал от ОИ измеряют, используя программное обеспечение Living Image (Media Cybernetics). Мышей наблюдают в день 0, день 1 и через день до тех пор, пока не происходит отторжение клеток или до 28 дней.

6. Мышиная модель ишемического инсульта

[00363] В мышинной модели окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) мышей анестезируют, используя смесь 70% NO₂, 30% O₂ и 2,0-2,5% изофлурана, используя устройство для общей анестезии животных. Открывают общую сонную артерию, разрезая кожу по срединной линии, и закупоривают среднюю мозговую артерию, используя 8-0 нейлоновое моноволокно, покрытое Provil novo (Heraeus, Hanau, Germany). Через 2 часа ОСМА волокно убирают для проведения реперфузии под легкой анестезией. После процедуры мышей содержат в тех же условиях, что и до операции (24 ± 2 °С; 12-часовой цикл день/ночь).

7. Оценка церебрального инфаркта

[00364] Церебральный инфаркт оценивают путем количественного определения объема инфаркта. Передний мозг мышей удаляют под глубокой анестезией изофлураном через 24 часа после индукции ОСМА. Получают коронарные срезы и окрашивают их, используя 2% раствор TTC в течение 30 минут. Проводят цифровую визуализацию окрашенных срезов и анализируют их, используя программное обеспечение для обработки изображений.

8. Поведенческая оценка

[00365] Проводят поведенческие оценки мышей после индукции ОСМА. Например, можно оценивать 6 видов поведения, включая: спонтанную активность в течение 5 минут, симметрию четырех конечностей во время движения, симметрию вытягивания передних конечностей, способность преодолевать подъем, проприорецепцию тела и ответ на прикосновение к вибриссам. Каждый вид поведения оценивают по балльной шкале и рассчитывают общую оценку. Меньшая оценка свидетельствует от тяжелом неврологическом дефиците.

9. Оценка мозгового кровотока

[00366] Мозговой кровоток (МКТ) можно определять у мышей с церебральной ишемией, используя лазерную доплеровскую флоуметрию.

[00367] Мышей размещают на животе под легкой анестезией 2,0-3,0% изофлураном и открывают череп, используя линейный разрез кожи. Череп подвергают воздействию 780 нм полупроводникового лазера. Отраженный свет, который является линейно поляризованным, регистрируют, используя камеру на приборе с зарядовой связью, размещенную над головой, через гибридный фильтр. Гибридный фильтр используют для исключения регистрации света, отраженного от поверхности ткани, и обеспечения стабильных и определенных измерений. Необработанные изображения спеклов записывают на видеопленку, чтобы оценить контрастность спеклов, которая свидетельствует о скорости и числе движущихся красных кровяных клеток. Для получения одного изображения кровотока используют в среднем 20 последовательных необработанных изображений спеклов. Красный цвет указывает на большой мозговой кровоток. Изображения анализируют, используя программное обеспечение, установленное в системе лазерной спекл-визуализации. Овальные области интереса (ОИ) создают в участках ипсилатеральной и контралатеральной средней мозговой артерии

(СМА). Относительный кровоток в участке СМА рассчитывают путем усреднения кровотока ОИ и рассчитывают отношение ипсилатерального МКТ и контралатерального МКТ. МКТ измеряют непосредственно перед ОСМА, непосредственно после ОСМА, перед реперфузией, после реперфузии, перед введением исследуемых нейральных клеток и после введения исследуемых нейральных клеток.

[00368] Дополнительную информацию касательно мышинных моделей ишемического инсульта и методов оценки таких мышей можно найти, например, в Yamauchi et al., *Scientific Reports*, 2017, 7:12088, раскрытие которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

План эксперимента

[00369] Эндотелиальные клетки (ЭК), созданные в соответствии с изложенными выше способами, оценивают в мышинной модели инсульта - мышинной модели фокальной церебральной ишемии. Церебральные эндотелиальные клетки вводят мышам с церебральной ишемией. В некоторых случаях клетки вводят путем интрапаренхиматозного, интрацеребровентрикулярного или интратекального (например, цистернального или люмбарного) введения.

[00370] В этом исследовании iPSC дифференцируют для создания дТ, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD24 tg ЭК в соответствии со способами, описанными выше. Клетки вводят мышинной модели фокальной церебральной ишемии.

[00371] Вкратце, мышей анестезируют в нокдаун-камере, используя 3% изофлуран+кислород. Когда животное теряет сознание, записывают его массу и бреют верхнюю часть головы животного от уровня глаз до зоны за ушами. Мышь переносят в стереотаксическое устройство. количество анестезии снижают до 1,5% изофлурана. Выбранный участок дезинфицируют 3% хлоргексидина глюконатом.

[00372] Делают разрез вдоль срединной линии приблизительно на 1 см между глазами/ушами. Подкожную соединительную ткань отделяют от черепа. Для очистки на череп наносят 70% EtOH. Используя микросверло, просверливают отверстие в координатах: AP= -1,2 мм и ML= -1,1 мм от брегмы, осторожно, чтобы не просверлить твердую мозговую оболочку.

[00373] Шприц Гамильтона, оснащенный 23G иглой, загружают ЭК. Микросверло заменяют насосом UltraMicroPump 3T (UMP3T; World Precision Instruments) и загружают шприц Гамильтона в UMP3T. Параметры инфузии устанавливают до около 500 нл/мин. Около 6,5 мкл (всего 1 миллион клеток) инфузируют в МПМ (медиальный передний мозг) через ранее просверленное отверстие на глубине DV=-5,00 мм. После инфузии иглу медленно извлекают.

[00374] Разрез кожи закрывают, используя 7-0 рассасывающийся шовный материал и инвертированный простой узловый шов. Животное забирают из стереотаксического устройства и помещают в теплую клетку для восстановления. После того как животное приходит в сознание, его возвращают в его домашнюю клетку. Массу животного проверяют в отношении минимума каждый день в течение трех дней.

[00375] Эффекты трансплантированных церебральных ЭК на мышей с фокальной церебральной ишемией оценивают в соответствии с методами, известными специалистам в данной области техники. Например, изменения или различия в поведении, церебральном инфаркте, мозговом кровотоке и т. п. можно оценивать у мышей с фокальной церебральной ишемией, которым вводили церебральные ЭК - дт $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-} CD47 tg ECs$.

Пример 3. Трансплантаты гипоиммуногенных дофаминергических нейронов в модели болезни Паркинсона

[00376] В этом примере описано исследование для изучения применения дифференцированных *in vitro* из плюрипотентных стволовых клеток дофаминергических (DA) нейронов для лечения болезни Паркинсона.

Методы

1. Дифференцировка дофаминергических нейронов (включая предшественников DA) *in vitro*

[00377] iPSC (например, дт, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-} CD47 tg$ или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-} CD24 tg$ iPSC) высевают на покрытые LM511-E8 6-луночные планшеты и поддерживают в среде для iPSC. После достижения конфлюентности клеток поддерживающую среду меняют на среду для дифференцировки, содержащую GMEM, дополненную 8% KSR, 0,1 мМ заменимых аминокислот MEM, 1 мМ пирувата натрия и 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола, и добавки, включая 10 нМ LDN193189 и 500 нМ A83091. От дня 1 до дня 7 дифференцировки в среду для дифференцировки также добавляют 2 мкМ пурморфамин и 100 нг/мл FGF8. От дня 2 до дня 12 дифференцировки клетки культивируют в среде для дифференцировки, дополненной 3 мкМ CHIR99021.

[00378] Клетки сортируют в день 12, используя стандартные процедуры для отбора, и выделяют положительные по CORIN (маркер вентральной пластинки) клетки. Отсортированные клетки высевают на планшеты с низкой клеточной адгезией и культивируют в среде для нейральной дифференцировки, содержащей нейробазальную среду с добавкой B27, 2 мМ L-глутамин, 10 нг/мл GDNF, 200 мМ аскорбиновой кислоты, 20 нг/мл BDNF и 400 мкМ dbcAMP. При начальном высевании после сортировки среда для нейральной дифференцировки также содержит 30 мкМ Y-27632.

2. Анализ предшественников DA нейронов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток

[00379] Дифференцированные DA нейроны и их предшественников оценивают посредством иммуноокрашивания в отношении DA нейрональных маркеров, включая FOXA2, NURR1, TUJ1, и других нейральных маркеров, включая PAX6 и SOX1. Электрофизиологический анализ проводят, используя стандартные пэтч-кламп записи целевых клеток, известные специалистам в данной области техники (смотрите, например, Kikuchi et al., Nature, 2017, 548, 592-596).

3. Модель БП у обезьян

[00380] Обезьянам внутривенно вводят гидрохлорид МРТР дважды в неделю, пока

они не станут демонстрировать симптомы паркинсонизма, такие как, но не ограничиваясь этим, дрожание, брадикинезию и нарушение равновесия. Обезьянам трансплантируют предшественников DA нейронов, дифференцированных из iPSC, как изложено выше. Предшественников DA нейронов стереотактически билатерально трансплантируют в скорлупу МРТР-обработанных обезьян.

[00381] За животными наблюдают и проводят периодическую оценку, используя технологии и методы для оценки симптомов БП и функций трансплантированных клеток. В некоторых случаях методы включают МТР-сканирование и анализ, ПЭТ анализ, видеоанализ и поведенческий анализ, тесты L-DOPA и т. п. (смотрите, например, Kikuchi et al., Nature, 2017, 548, 592-596).

План эксперимента

[00382] Предшественников DA нейронов, созданных из плюрипотентных стволовых клеток, оценивают в обезьяньей модели болезни Паркинсона (БП). В этом исследовании iPSC дифференцируют для создания дт, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD24 tg предшественников DA нейронов в соответствии со способами, описанными выше. Клетки вводят в головной мозг обезьяньей модели БП.

[00383] Эффекты трансплантированных DA нейронов оценивают в соответствии с методами, известными специалистам в данной области техники. Например, у обезьян, которым вводили DA нейроны - дт, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$, $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD47 tg или $B2m^{-/-}Ciita^{-/-}$ CD24 tg DA нейроны, можно оценивать изменения или различия в поведении, движениях, симптомах БП, дофаминергической функции и т. п.

Пример 4. Пилотное исследование хирургического нацеливания трейсера на основе субъединицы В холерного токсина (СТВ) в ЦНС мышинных моделей

[00384] В этом примере описано исследование для верификации точности хирургического нацеливания меченного флуорофором трейсера на основе субъединицы В холерного токсина (СТВ) в головной мозг мыши. Начальные эксперименты проводят на мышах C57BL/6, а последующие эксперименты проводят на мышах NSG™.

Метод - Инъекция в полосатое тело трейсера СТВ, меченного флуорофором для визуализации мышинного головного мозга с помощью микроскопии

[00385] Трейсер СТВ используют для визуализации нейронов в месте инъекции в головном мозге мыши-реципиента, используя микроскоп или сканер. В первом эксперименте трейсер СТВ вводят в полосатое тело мышей C57BL/6 (5 мышей на группу). Ретроградные меченные нейральные клетки визуализируют в месте инъекции через 5 дней после инъекции. Во втором эксперименте трейсер СТВ вводят в полосатое тело мышей NSG™. В группе 5 мышей, а ретроградные меченные нейральные клетки визуализируют через 5 дней после инъекции.

Пример 5. Пилотное исследование - хирургическое нацеливание

[00386] В этом примере описано исследование для демонстрации прививания дофаминовых нейронов или их предшественников отличного от человека примата (ОЧП) в головной мозг мыши-реципиента. Дофаминовые (DA) нейроны и их предшественников

получают посредством дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) ОЧП.

Методы - билатеральные инъекции полученных из iPSC ОЧП DA нейрональных предшественников или нейробластных клеток в полосатое тело мышей NSG™

[00387] Дофаминовых нейрональных предшественников и нейробластные клетки дифференцируют из iPSC ОЧП методом, известным специалистам в данной области техники. Характеристики дофаминовых нейрональных предшественников и нейробластных клеток получают перед инъекцией в полосатое тело мышей-реципиентов NSG™. Около 150000 дофаминовых нейрональных предшественников и нейробластных клеток билатерально вводят мышам.

[00388] В день 0 и день 7 проводят иссечение полосатого тела, а образцы головного мозга обрабатывают для кПЦР в отношении содержания *Alu* приматов, чтобы выявить введенные клетки. Общую выживаемость введенных клеток определяют в оба момента времени.

[00389] Через четыре месяца после инъекции (n=10 мест инъекции) получают срезы головного мозга мышей и подвергают образцы иммуногистохимии, чтобы выявить приживленные нейроны. Исследуют наличие положительных в отношении тирозингидроксилазы (TH+) нейронов и *FoxA2* DA нейронов. Приживленные нейроны также выявляют посредством окрашивания H&E и иммуноокрашивания образцов головного мозга мышей антителом, которое специфически выявляет ядра приматов или человека.

Пример 6. Дифференцировка гипоиммуногенных iPSC и нейрональное созревание

[00390] В этом примере описано исследование для изучения плюрипотентности iPSC и нейронального созревания нейронов, дифференцированных из гипоиммуногенных iPSC. Экспрессию генов плюрипотентности оценивали в iPSC дикого типа, B2M-/-/СИТА-/- (dKO) iPSC и B2M-/-/СИТА-/-CD47Tg (dKO/CD47Tg) iPSC.

[00391] Использовали проточную цитометрию для изучения экспрессии *Nanog*, *Oct4* и *Sox2* в клоне 1-B4 с двойным нокаутом, клоне 1-B4 с объемным CD47 и клетках дикого типа (Фиг. 9). Проточную цитометрию также использовали для измерения экспрессии *FoxA2*, *Otx2*, *Nkx6.1*, *Nkx2.2*, *Sox1* и *Rax6* в дофаминовых клетках-предшественниках, дифференцированных из iPSC клона 1-B4 с двойным нокаутом, iPSC клона 1-B4 с объемным CD47 и iPSC дикого типа (Фиг. 10). Проточную цитометрию также использовали для сравнения стабильности CD47 между iPSC дикого типа и дифференцированными из них дофаминовыми клетками-предшественниками, а также iPSC клона 1-B4 с объемным CD47 и дифференцированными из них дофаминовыми клетками-предшественниками (Фиг. 11).

[00392] Анализ генной экспрессии проводили на дофаминовых клетках-предшественниках дикого типа, дифференцированных из iPSC дикого типа, и дофаминовых клетках-предшественниках, дифференцированных из клеток клона 1-B4 с

объемным CD47. Определяли экспрессию маркеров дофаминовых предшественников, таких как FoxA2 и LMX1A (Фиг. 12A), и маркеров нейронального созревания, таких как Nurr1 (Фиг. 12B). Маркеры нейронального созревания выявляли в нейральных дифференцированных клетках на неделе 1 процесса нейронального созревания.

[00393] Иммунофлуоресценцию (ИФ) проводили на нейрональных клетках на неделе 2 процесса нейронального созревания. Окрашивание в отношении FoxA2, тирозингидроксилазы (TH), engrailed-1 (EN1), гипофизарного гомеобокса 2 (Pitx2) и barH-подобного 1 (Barh1) анализировали в нейрональных клетках, дифференцированных из iPSC дикого типа или iPSC 1-B4 с объемным CD47 дикого типа (Фиг. 13). Созревающие дофаминовые нейроны представляли собой TH⁺ клетки. И созревающие нейрональные клетки не были положительными в отношении EN1, Pitx2 и Barh1.

[00394] Все заголовки и обозначения разделов используются лишь в целях ясности и отнесения и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалистам в данной области техники станет понятна полезность объединения различных аспектов из разных заголовков и разделов в соответствии с сущностью и объемом представленной технологии, описанной в данном документе.

[00395] Все ссылки, процитированные в данном документе, в полном объеме и во всех целях включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были специально и индивидуально указаны как в полном объеме и во всех целях включенные посредством ссылки.

[00396] Можно осуществлять многие модификации и вариации этой заявки без отклонения от ее сущности и объема, как очевидно для специалистов в данной области техники. Конкретные варианты осуществления и примеры, описанные в данном документе, приведены лишь в качестве примера, а заявка ограничена только в терминах прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, которые ею охвачены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования микроглиального фагоцитоза популяции нейральных клеток, вводимых пациенту, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции нейральных клеток, содержащих экзогенный полипептид CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или ГКГС класса II.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток имеет сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I или ГКГС класса II.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток имеет сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что введение включает прививание популяции нейральных клеток в центральную или периферическую нервную систему пациента.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что прививание включает инъекцию популяции нейральных клеток пациенту.

6. Способ по п. 4 или п. 5, отличающийся тем, что прививание включает нарушение гематоэнцефалического барьера пациента.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочную выживаемость после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочное функционирование после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость в организме пациента после последующего нарушения гематоэнцефалического барьера пациента, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование в организме пациента после последующего нарушения гематоэнцефалического барьера пациента, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что последующее нарушение гематоэнцефалического барьера пациента происходит в результате инфекции или инсульта.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток выживает и/или функционирует в организме пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или более после введения.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что пациенту не вводят

иммуносупрессивный агент перед ведением популяции нейральных клеток.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент после ведения популяции нейральных клеток.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что пациенту необходим сниженный уровень иммуносупрессии или практически не нужна иммуносупрессия.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

17. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника.

18. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника.

19. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что микроглиальный фагоцитоз связан с неврологическим расстройством или состоянием.

21. Способ по любому из пп. 9-20, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкоцистозов, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкоцистозов, болезни исчезающего белого вещества, адренолейкоцистоза, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метакроматической лейкоцистозии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения.

22. Способ по любому из пп. 9-20, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера.

23. Способ по любому из пп. 9-20, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий множественный склероз.

24. Способ по любому из пп. 9-20, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток экспрессирует CD47 на более высоком уровне, чем в немодифицированной плюрипотентной клетке или немодифицированной нейральной клетке.

26. Способ по любому из пп. 1-25, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток экспрессирует суицидальный ген, который активируется триггером, который вызывает гибель нейральной клетки.

27. Способ ингибирования микроглиального фагоцитоза популяции нейральных клеток, вводимых пациенту, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции нейральных клеток, содержащих экзогенный полипептид CD47 и имеющих сниженную экспрессию B2M и/или СРТА.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток имеет сниженную экспрессию B2M или СРТА.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток имеет сниженную экспрессию B2M и СРТА.

30. Способ по любому из пп. 27-29, отличающийся тем, что введение включает прививание популяции нейральных клеток в центральную или периферическую нервную систему пациента.

31. Способ по п. 30, отличающийся тем, что прививание включает инъекцию популяции нейральных клеток пациенту.

32. Способ по п. 30 или п. 31, отличающийся тем, что прививание включает нарушение гематоэнцефалического барьера пациента.

33. Способ по любому из пп. 27-32, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочную выживаемость после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

34. Способ по любому из пп. 27-33, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочное функционирование после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

35. Способ по любому из пп. 27-34, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость в организме пациента после последующего нарушения гематоэнцефалического барьера пациента, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

36. Способ по любому из пп. 27-35, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование в организме пациента после последующего нарушения гематоэнцефалического барьера пациента, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

37. Способ по любому из пп. 32-36, отличающийся тем, что последующее нарушение гематоэнцефалического барьера пациента происходит в результате инфекции или инсульта.

38. Способ по любому из пп. 27-37, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток выживает и/или функционирует в организме пациента в течение по меньшей мере

одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или более после введения.

39. Способ по любому из пп. 27-38, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент перед ведением популяции нейральных клеток.

40. Способ по любому из пп. 27-39, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент после ведения популяции нейральных клеток.

41. Способ по любому из пп. 27-40, отличающийся тем, что пациенту необходим сниженный уровень иммуносупрессии или практически не нужна иммуносупрессия.

42. Способ по любому из пп. 27-41, отличающийся тем, что нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендрокита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

43. Нейральная клетка по любому из пп. 27-42, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника.

44. Нейральная клетка по любому из пп. 27-42, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника.

45. Нейральная клетка по любому из пп. 27-42, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

46. Способ по любому из пп. 27-45, отличающийся тем, что микроглиальный фагоцитоз связан с неврологическим расстройством или состоянием.

47. Способ по любому из пп. 35-46, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкоцистозов, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкоцистозов, болезни исчезающего белого вещества, адренолейкоцистоза, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метакроматической лейкоцистозии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения.

48. Способ по любому из пп. 35-46, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера.

49. Способ по любому из пп. 35-46, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий множественный склероз.

50. Способ по любому из пп. 35-46, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

51. Способ по любому из пп. 27-50, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток экспрессирует CD47 на более высоком уровне, чем в родительской плюрипотентной клетке или немодифицированной нейральной клетке.

52. Способ по любому из пп. 27-51, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток экспрессирует суицидальный ген, который активируется триггером, который вызывает гибель нейральной клетки.

53. Способ по любому из пп. 27-52, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток представляет собой глиальные клетки-предшественники.

54. Способ получения терапевтически эффективного количества человеческих нейральных клеток из популяции человеческих плюрипотентных стволовых клеток *in vitro*, включающий этапы а) генетической модификации человеческих плюрипотентных стволовых клеток с целью i) снижения экспрессии человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС класса I и/или человеческих лейкоцитарных антигенов ГКГС класса II в человеческих плюрипотентных стволовых клетках и ii) сверхэкспрессии экзогенного полипептида CD47 в человеческих плюрипотентных стволовых клетках, б) дифференцировки человеческих плюрипотентных стволовых клеток в нейральные клетки; и с) анализа нейральных клеток в отношении фенотипа гипои́ммуногенности и/или одного или более специфических к нейральным клеткам маркеров, генной экспрессии или профиля генной экспрессии.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что этап а) дополнительно включает генетическую модификацию человеческих плюрипотентных стволовых клеток с целью снижения экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

56. Способ по п. 54, отличающийся тем, что этап а) дополнительно включает генетическую модификацию человеческих плюрипотентных стволовых клеток с целью снижения экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

57. Способ по любому из пп. 54-56, отличающийся тем, что человеческие плюрипотентные стволовые клетки с этапа а) ii) экспрессируют CD47 на уровне, более высоком, чем в популяции человеческих плюрипотентных стволовых клеток до этапа а).

58. Способ по любому из пп. 54-57, отличающийся тем, что человеческие нейральные клетки с этапа б) или с) экспрессируют CD47 на уровне, более высоком, чем в немодифицированной нейральной клетке или нейрональной клетке, генетически не модифицированной с помощью этапа а).

59. Способ по любому из пп. 54-56, отличающийся тем, что человеческие нейральные клетки с этапа б) или с) имеют сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса II по сравнению с немодифицированной человеческой нейральной клеткой или нейрональной клеткой, генетически не модифицированной с помощью этапа а).

60. Способ по любому из пп. 54-59, отличающийся тем, что этап а) дополнительно

включает iii) экспрессию суицидального гена в человеческих плюрипотентных стволовых клетках.

61. Способ по любому из пп. 54-60, отличающийся тем, что анализ человеческих нейральных клеток на этапе с) включает анализ фенотипа гипоиммуногенности методами Elispot, ELISA, FACS, ПЦР или масс-цитометрии (CYTOF).

62. Выделенная нейральная клетка, содержащая экзогенный полипептид CD47 и имеющая сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем клетка избегает иммунного распознавания при введении пациенту.

63. Выделенная нейральная клетка по п. 62, отличающаяся тем, что выделенная нейрональная клетка дополнительно имеет сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и класса II.

64. Выделенная нейральная клетка по п. 62 или п. 63, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

65. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-64, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника.

66. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-64, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника.

67. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-64, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

68. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-64, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка представляет собой церебральную эндотелиальную клетку.

69. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-64, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка представляет собой дофаминовый нейрон.

70. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-69, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка избегает иммунного распознавания *in vitro*.

71. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-70, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка избегает иммунного распознавания при прививании в центральную или периферическую нервную систему пациента.

72. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-71, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует микроглиальный фагоцитоз *in vitro*.

73. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-72, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует микроглиальный фагоцитоз при прививании в центральную или периферическую нервную систему пациента.

74. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-73, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка имеет сниженную экспрессию В2М и/или СПТА.

75. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 62-74, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка содержит один или более трансгенов CD47.

76. Выделенная нейральная клетка по п. 75, отличающаяся тем, что экспрессию одного или более трансгенов CD47 контролируют конститутивные промоторы.

77. Выделенная нейральная клетка по п. 75, отличающаяся тем, что экспрессию одного или более трансгенов CD47 контролируют нейронально-специфические промоторы.

78. Композиция, содержащая популяцию выделенных нейральных клеток по любому из пп. 62-77.

79. Композиция по п. 78, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

80. Способ лечения неврологического расстройства или состояния у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции нейральных клеток, содержащих экзогенный полипептид CD47 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I, причем популяция нейральных клеток проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз после введения.

81. Способ по п. 80, отличающийся тем, что введение включает прививание популяции нейральных клеток в центральную или периферическую нервную систему пациента.

82. Способ по п. 81, отличающийся тем, что прививание включает инъекцию популяции нейральных клеток пациенту.

83. Способ по п. 81 или п. 82, отличающийся тем, что прививание включает нарушение гематоэнцефалического барьера пациента.

84. Способ по любому из пп. 80-83, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочную выживаемость после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

85. Способ по любому из пп. 80-84, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток демонстрирует долгосрочное функционирование после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

86. Способ по любому из пп. 80-85, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость в организме пациента после последующего нарушения гематоэнцефалического барьера пациента, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

87. Способ по любому из пп. 80-86, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование в организме пациента после последующего нарушения гематоэнцефалического барьера пациента, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

88. Способ по любому из пп. 80-87, отличающийся тем, что последующее нарушение гематоэнцефалического барьера пациента происходит в результате инфекции

или инсульта.

89. Способ по любому из пп. 80-88, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток выживает и/или функционирует в организме пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или более после введения.

90. Способ по любому из пп. 80-89, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент до, во время и/или после введения популяции нейральных клеток.

91. Способ по любому из пп. 80-90, отличающийся тем, что пациенту необходим сниженный уровень иммуносупрессии или практически не нужна иммуносупрессия.

92. Способ по любому из пп. 80-91, отличающийся тем, что нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендрокита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

93. Способ по любому из пп. 80-92, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника.

94. Способ по любому из пп. 80-92, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника.

95. Способ по любому из пп. 80-92, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

96. Способ по любому из пп. 80-95, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкоцистозов, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкоцистозов, болезни исчезающего белого вещества, адренолейкоцистоза, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метакроматической лейкоцистозии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения.

97. Способ по любому из пп. 80-95, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера.

98. Способ по любому из пп. 80-95, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий множественный склероз.

99. Способ по любому из пп. 80-95, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

100. Нейральная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

101. Нейральная клетка по п. 100, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендрокита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

102. Нейральная клетка по любому из пп. 100-101, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника.

103. Нейральная клетка по любому из пп. 100-101, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника.

104. Нейральная клетка по любому из пп. 100-101, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

105. Церебральная эндотелиальная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем церебральная эндотелиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

106. Церебральная эндотелиальная клетка по п. 105, отличающаяся тем, что клетка формируют сосудистую систему при введении в головной мозг пациента.

107. Микроглиальная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем микроглиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

108. Олигодендрокит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем олигодендрокит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

109. Шванновская клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем шванновская клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

110. Астроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем астроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

111. Эпендимная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем эпендимная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

112. Нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

113. Нейрон по п. 112, отличающийся тем, что нейрон представляет собой дофаминовый нейрон.

114. Дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD47 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

115. Выделенная нейральная клетка, содержащая экзогенный полипептид CD24 и имеющая сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса II, причем выделенная нейральная клетка избегает иммунного распознавания при введении пациенту.

116. Выделенная нейральная клетка по п. 115, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

117. Выделенная нейральная клетка по п. 115 или п. 116, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника.

118. Выделенная нейральная клетка по п. 115 или п. 116, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника.

119. Выделенная нейральная клетка по п. 115 или п. 116, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

120. Выделенная нейральная клетка по п. 115 или п. 116, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой церебральную эндотелиальную клетку.

121. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 115-120, отличающаяся тем,

что нейральная клетка избегает иммунного распознавания *in vitro*.

122. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 115-121, отличающаяся тем, что нейральная клетка избегает иммунного распознавания при прививании в центральную или периферическую нервную систему пациента.

123. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 115-122, отличающаяся тем, что нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует микроглиальный фагоцитоз *in vitro*.

124. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 115-123, отличающаяся тем, что нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует микроглиальный фагоцитоз при прививании в центральную или периферическую нервную систему пациента.

125. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 115-124, отличающаяся тем, что нейральная клетка имеет сниженную экспрессию В2М и/или СІТА.

126. Выделенная нейральная клетка по любому из пп. 115-125, отличающаяся тем, что нейральная клетка содержит один или более трансгенов CD24.

127. Выделенная нейральная клетка по п. 126, отличающаяся тем, что экспрессию одного или более трансгенов CD47 контролируют конститутивные промоторы.

128. Выделенная нейральная клетка по п. 126, отличающаяся тем, что экспрессию одного или более трансгенов CD47 контролируют нейронально-специфические промоторы.

129. Композиция, содержащая популяцию выделенных нейральных клеток по любому из пп. 115-128.

130. Композиция по п. 129, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

131. Способ лечения неврологического расстройства или состояния у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества популяции нейральных клеток, содержащих экзогенный полипептид CD24 и имеющих сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или ГКГС класса II.

132. Способ по п. 131, дополнительно включающий снижение экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и ГКГС класса II.

133. Способ по п. 131 или п. 132, отличающийся тем, что введение включает прививание популяции нейральных клеток в центральную или периферическую нервную систему пациента.

134. Способ по п. 133, отличающийся тем, что прививание включает инъекцию популяции нейральных клеток пациенту.

135. Способ по п. 133 или п. 134, отличающийся тем, что прививание включает нарушение гематоэнцефалического барьера пациента.

136. Способ по любому из пп. 131-135, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

137. Способ по любому из пп. 131-136, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента.

138. Способ по любому из пп. 131-137, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочную выживаемость в организме пациента после последующего нарушения гематоэнцефалического барьера пациента, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

139. Способ по любому из пп. 131-138, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток сохраняет долгосрочное функционирование в организме пациента после нарушения гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии, которое является вторичным в отношении неврологического расстройства или состояния.

140. Способ по любому из пп. 131-139, отличающийся тем, что нарушение гематоэнцефалического барьера пациента впоследствии происходит в результате инфекции или инсульта.

141. Способ по любому из пп. 131-140, отличающийся тем, что популяция нейральных клеток выживает и/или функционирует в организме пациента в течение по меньшей мере одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или более после введения.

142. Способ по любому из пп. 131-141, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент перед ведением популяции нейральных клеток.

143. Способ по любому из пп. 131-142, отличающийся тем, что пациенту не вводят иммуносупрессивный агент после ведения популяции нейральных клеток.

144. Способ по любому из пп. 131-143, отличающийся тем, что пациенту необходим сниженный уровень иммуносупрессии или практически не нужна иммуносупрессия.

145. Способ по любому из пп. 131-144, отличающийся тем, что нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

146. Способ по любому из пп. 131-144, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника.

147. Способ по любому из пп. 131-144, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника.

148. Способ по любому из пп. 131-144, отличающийся тем, что нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

149. Способ по любому из пп. 131-148, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта, бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкоцистозов, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических

лейкодистрофий, болезни исчезающего белого вещества, аденолейкодистрофии, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метакроматической лейкодистрофии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения.

150. Способ по любому из пп. 131-148, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера.

151. Способ по любому из пп. 131-148, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий множественный склероз.

152. Способ по любому из пп. 131-148, отличающийся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

153. Нейральная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии В2М и/или СПТА, причем нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

154. Нейральная клетка по п. 153, отличающаяся тем, что выделенная нейральная клетка выбрана из группы, состоящей из церебральной эндотелиальной клетки, нейрона, эпендимной клетки, астроцита, микроглиальной клетки, олигодендроцита, шванновской клетки, их предшественников и их прекурсоров.

155. Нейральная клетка по п. 153 или п. 154, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой нейральную клетку-предшественника.

156. Нейральная клетка по п. 153 или п. 154, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой глиальную клетку-предшественника.

157. Нейральная клетка по п. 153 или п. 154, отличающаяся тем, что нейральная клетка представляет собой нейрональную клетку-предшественника.

158. Церебральная эндотелиальная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и II и/или ii) сниженные уровни экспрессии В2М и/или СПТА, причем церебральная эндотелиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

159. Церебральная эндотелиальная клетка по п. 158, отличающаяся тем, что клетка

формируют сосудистую систему при введении в головной мозг пациента.

160. Микроглиальная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем микроглиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

161. Олигодендроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем олигодендроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

162. Шванновская клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем шванновская клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

163. Астроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем астроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

164. Эпендимная клетка, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем эпендимная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

165. Нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

166. Нейрон по п. 165, отличающийся тем, что нейрон представляет собой дофаминовый нейрон.

167. Дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующая экзогенный полипептид CD24 и имеющая: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

168. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей выделенную нейральную клетку, содержащую экзогенный полипептид

CD47 и имеющую сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или класса II, причем клетка избегает иммунного распознавания при введении пациенту.

169. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей нейральную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

170. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей церебральную эндотелиальную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем церебральная эндотелиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

171. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей микроглиальную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем микроглиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

172. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей олигодендроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD47 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем олигодендроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

173. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей шванновскую клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем шванновская клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

174. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей астроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD47 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем астроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

175. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей эпендимную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD47 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем эпендимная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

176. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD47 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

177. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD47 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

178. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей выделенную нейральную клетку, содержащую экзогенный полипептид CD24 и имеющую сниженную экспрессию лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса II, причем выделенная нейральная клетка избегает иммунного распознавания при введении пациенту.

179. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей нейральную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем нейральная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

180. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей церебральную эндотелиальную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и II и/или ii) сниженные уровни экспрессии B2M и/или СРТА, причем церебральная эндотелиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

181. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей микроглиальную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii)

сниженные уровни экспрессии V2M и/или СПТА, причем микроглиальная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

182. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей олигодендроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD24 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии V2M и/или СПТА, причем олигодендроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

183. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей шванновскую клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии V2M и/или СПТА, причем шванновская клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

184. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей астроцит, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD24 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии V2M и/или СПТА, причем астроцит проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

185. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей эпендимную клетку, дифференцированную *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующую экзогенный полипептид CD24 и имеющую: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии V2M и/или СПТА, причем эпендимная клетка проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

186. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD24 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии V2M и/или СПТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

187. Применение нейральной клетки для лечения неврологического заболевания, включающей дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, экспрессирующий экзогенный полипептид CD24 и имеющий: i) сниженные уровни экспрессии лейкоцитарных антигенов человека ГКГС класса I и/или II и/или ii) сниженные уровни экспрессии V2M и/или СПТА, причем нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

188. Применение по любому из пп. 168-187, отличающееся тем, что неврологическое расстройство или состояние выбрано из группы, состоящей из инсульта,

бокового амиотрофического склероза (БАС), внутримозгового кровоизлияния, болезни Паркинсона, эпилепсии, повреждения спинного мозга, детских наследственных лейкодистрофий, врожденной дисмиелинизации, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, метаболических лейкодистрофий, болезни исчезающего белого вещества, аденолейкодистрофии, болезни Канавана, лизосомных болезней накопления, болезни Тея-Сакса, болезни Сандхоффа, болезни Краббе, болезни Баттена, метахроматической лейкодистрофии, церебрального паралича, перивентрикулярной лейкомаляции, спастической диплегии недоношенных, возрастной потери белого вещества, подкорковой деменции, сосудистых лейкоэнцефалопатий, подкоркового инсульта, диабетической лейкоэнцефалопатии, гипертензивной лейкоэнцефалопатии, повреждения спинного мозга, аутоиммунной демиелинизации, прогрессирующего рассеянного склероза, поперечного миелита, воспалительной демиелинизации, токсичности, вызванной облучением, нейродегенеративных заболеваний, болезни Хантингтона, лобно-височной деменции и нарушений мозгового кровообращения.

189. Применение по любому из пп. 165-187, отличающееся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Пелицеуса-Мерцбахера.

190. Применение по любому из пп. 165-187, отличающееся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой прогрессирующий множественный склероз.

191. Применение по любому из пп. 165-187, отличающееся тем, что неврологическое расстройство или состояние представляет собой болезнь Хантингтона.

192. Дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, причем дофаминовый нейрон экспрессирует экзогенный полипептид CD47, при этом дофаминовый нейрон имеет сниженные уровни экспрессии В2М и С1ТА и при этом дофаминовый нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

193. Дофаминовый нейрон, дифференцированный *in vitro* из стволовой клетки, причем дофаминовый нейрон экспрессирует экзогенный полипептид CD24, при этом дофаминовый нейрон имеет сниженные уровни экспрессии В2М и С1ТА и при этом дофаминовый нейрон проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз.

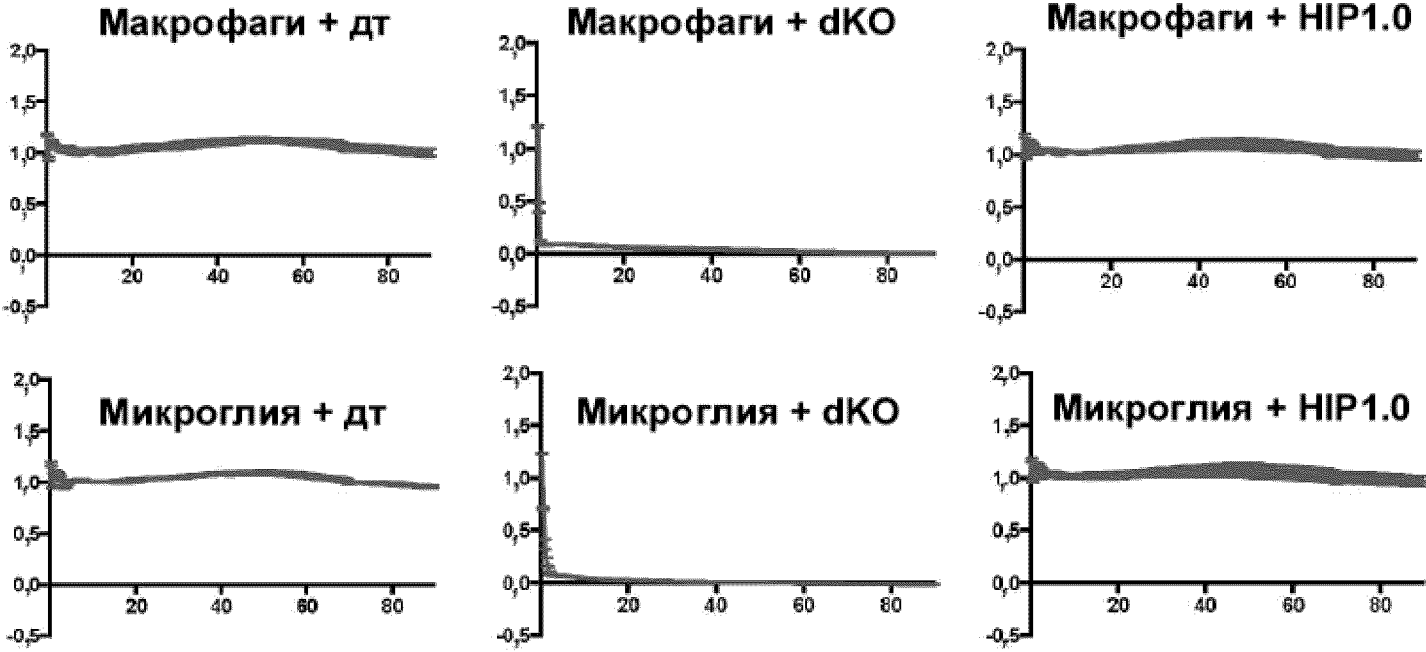
194. Глиальная клетка-предшественник, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, причем глиальная клетка-предшественник экспрессирует экзогенный полипептид CD47, при этом глиальная клетка-предшественник имеет сниженные уровни экспрессии В2М и С1ТА и при этом глиальная клетка-предшественник проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз или избегает микроглиального фагоцитоза.

195. Глиальная клетка-предшественник, дифференцированная *in vitro* из стволовой клетки, причем глиальная клетка-предшественник экспрессирует экзогенный полипептид

CD24, при этом глиальная клетка-предшественник имеет сниженные уровни экспрессии B2M и СІТА и при этом глиальная клетка-предшественник проходит, демонстрирует или стимулирует сниженный микроглиальный фагоцитоз или избегает микроглиального фагоцитоза.

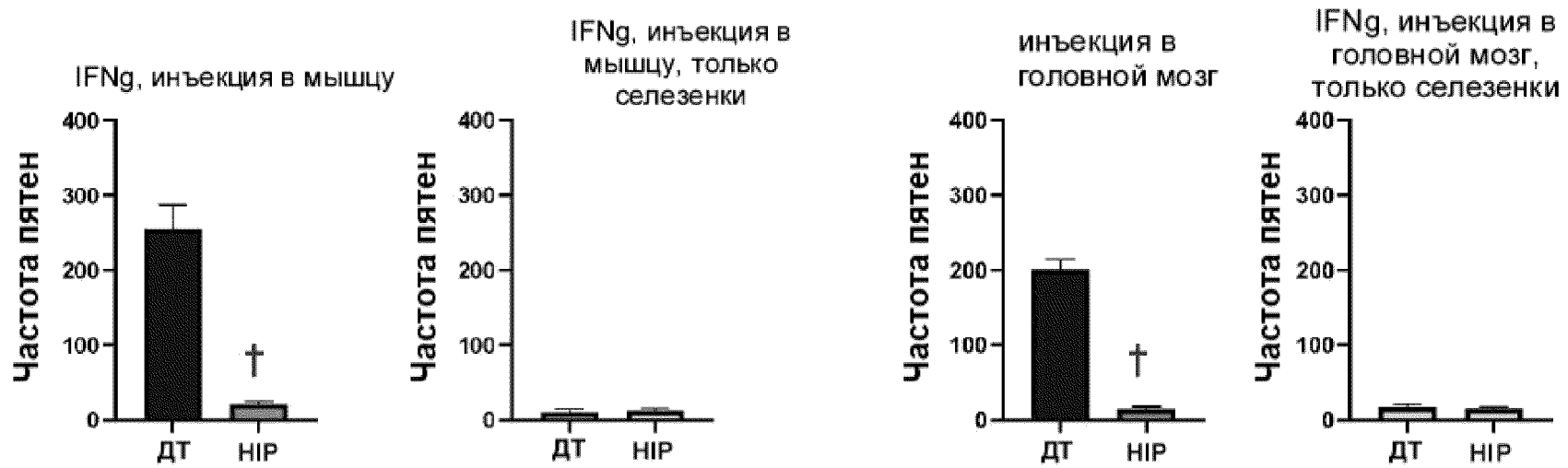
По доверенности

Фиг. 1



Фиг. 2

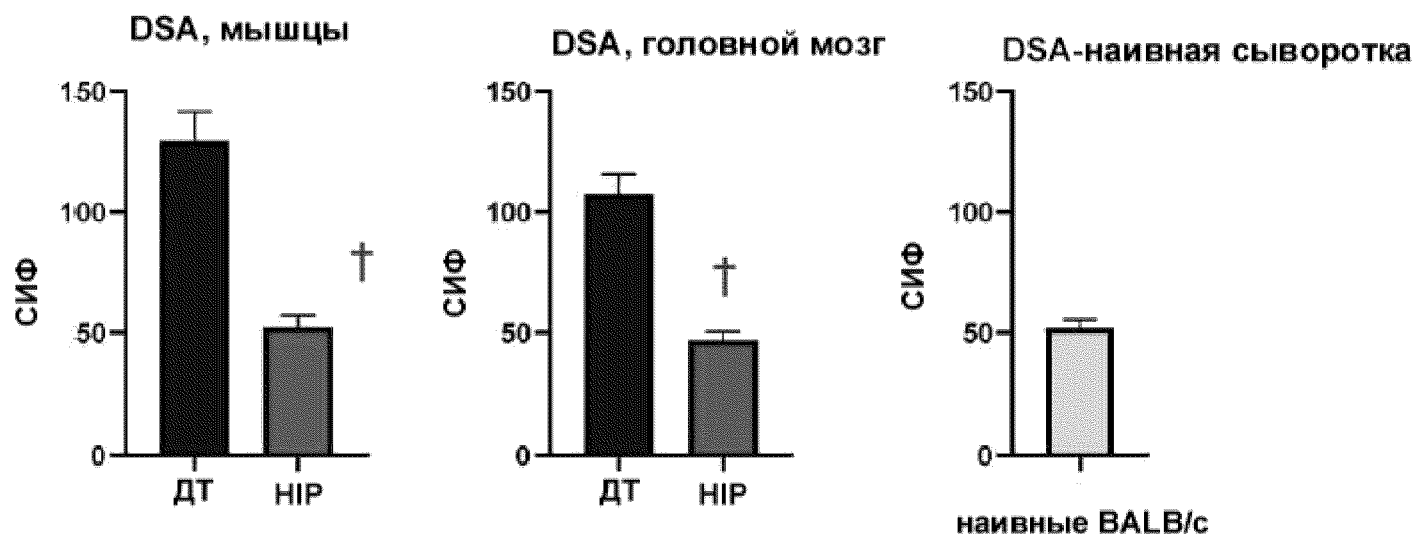
Elispot-анализ IFNg



неспаренный T-критерий † $p < 0,01$

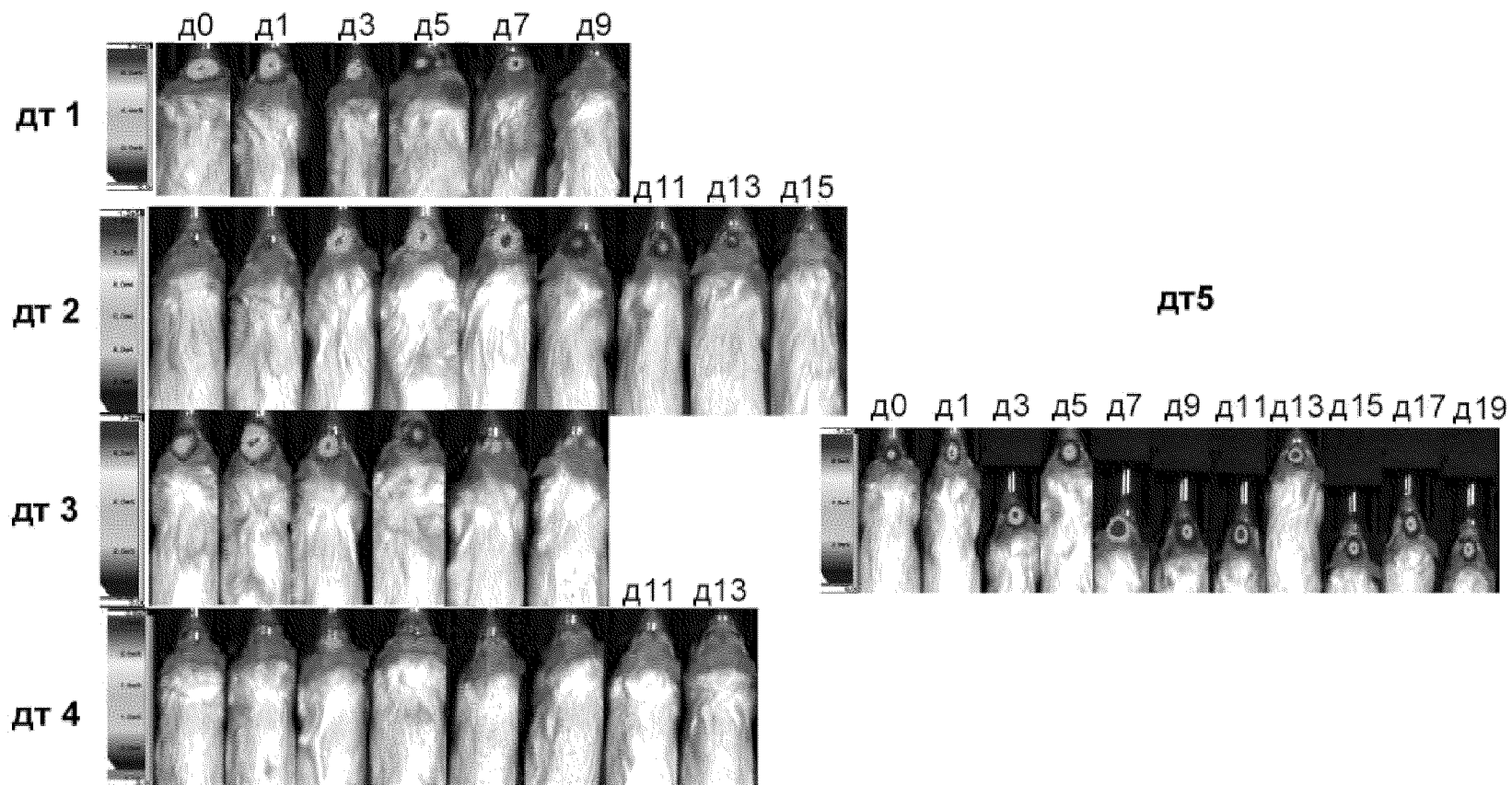
Фиг. 3

Донор-специфические антитела (DSA)

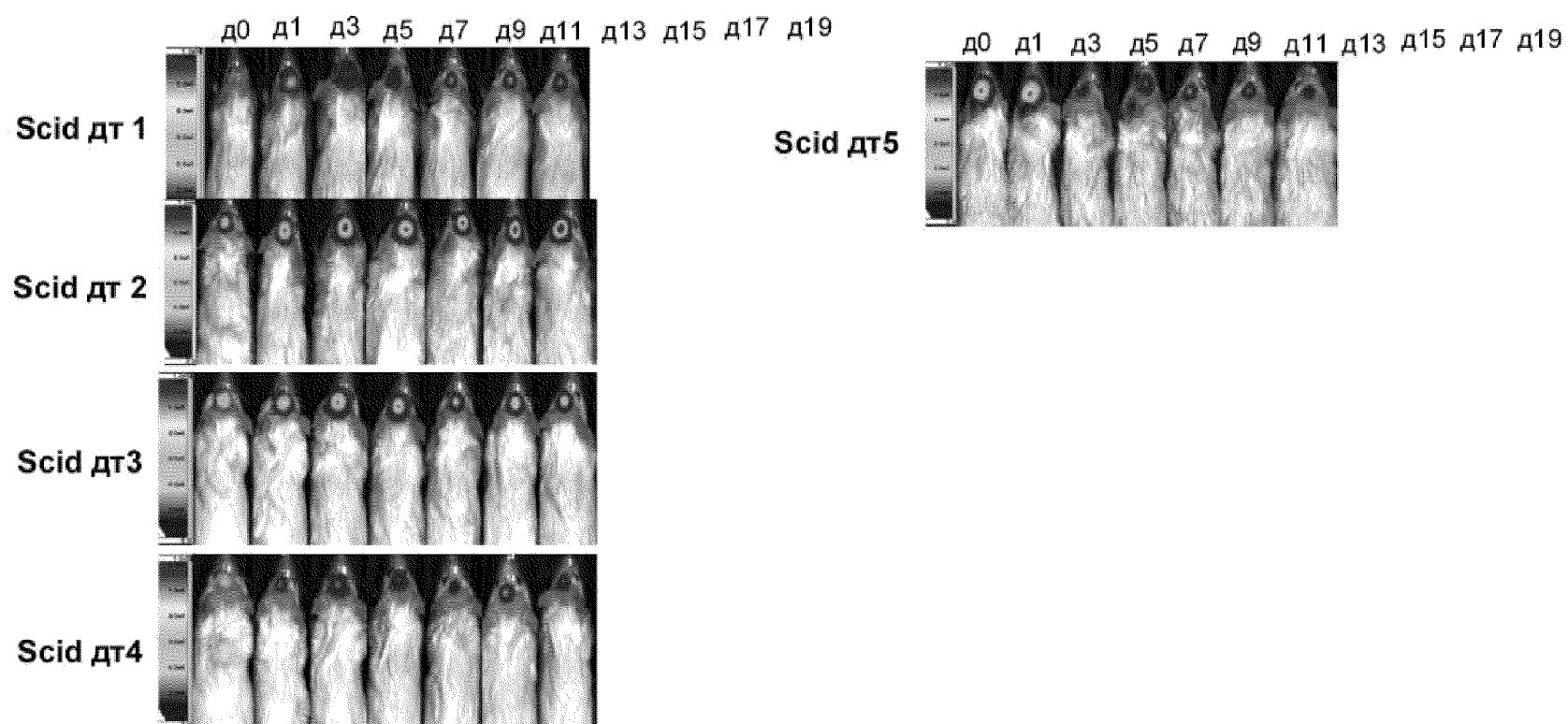


неспаренный T-критерий † $p < 0,01$

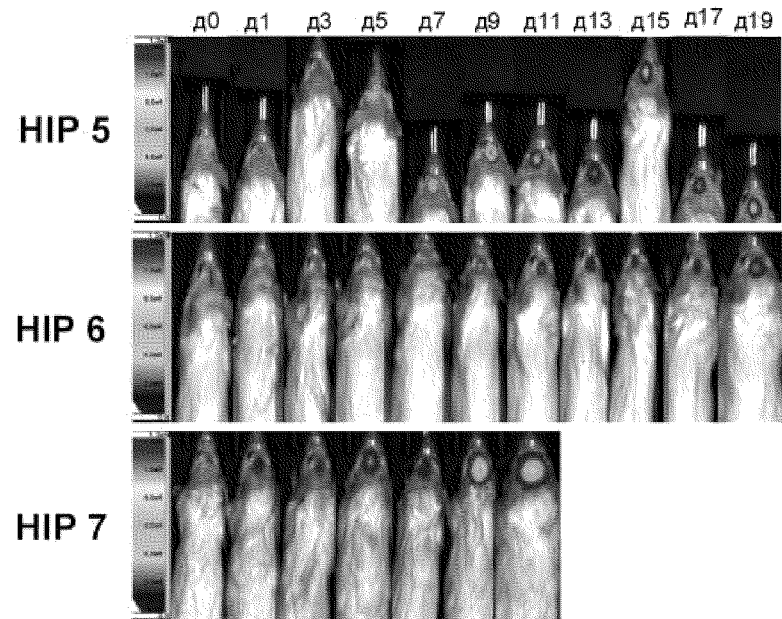
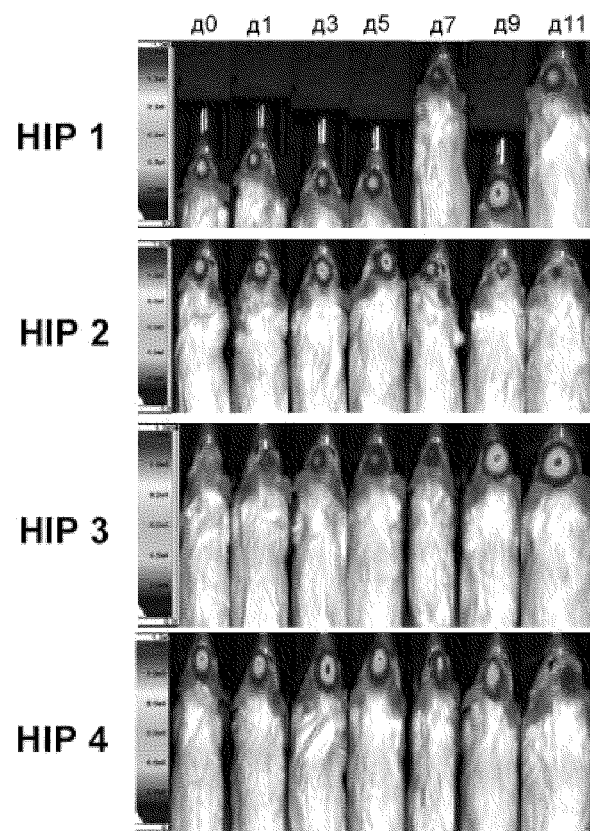
Фиг. 4



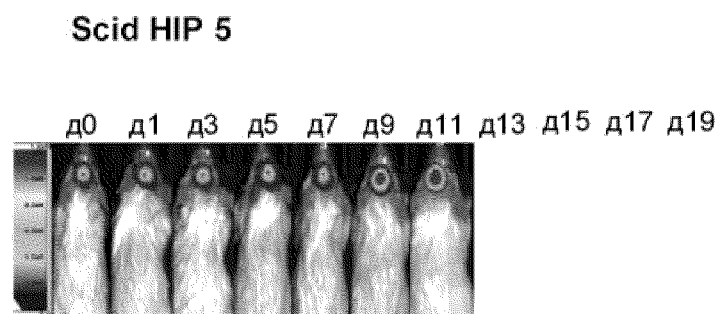
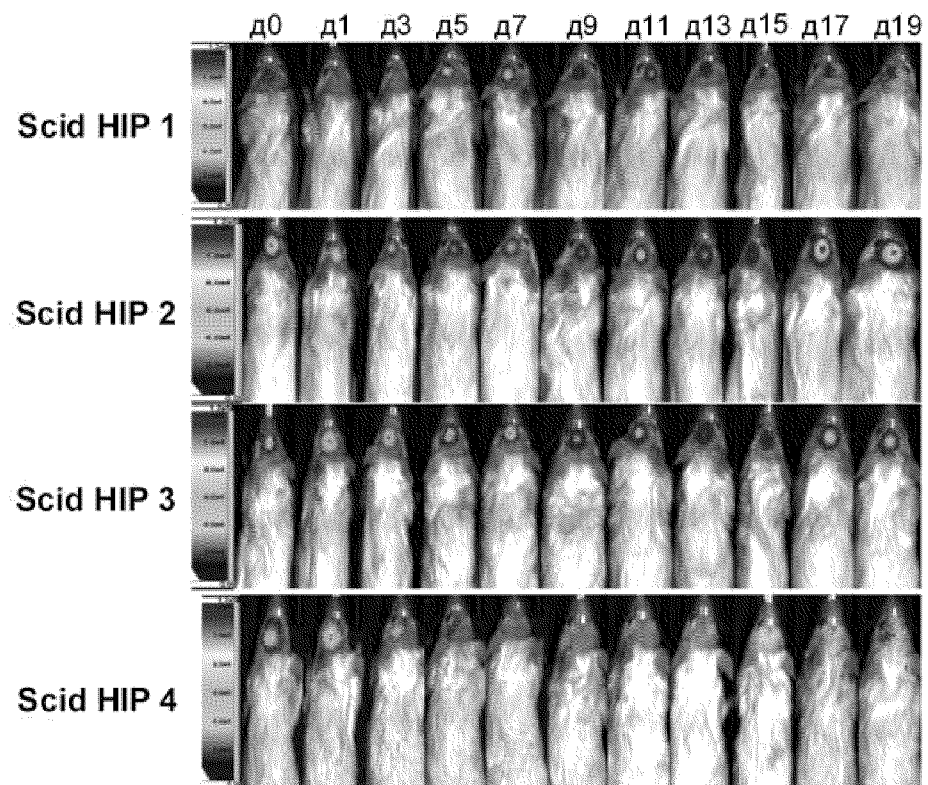
Фиг. 5



Фиг. 6



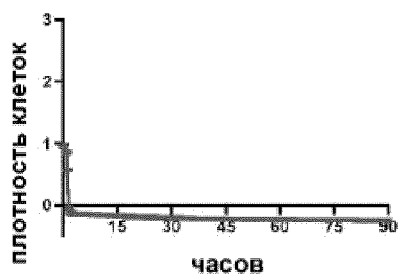
Фиг. 7



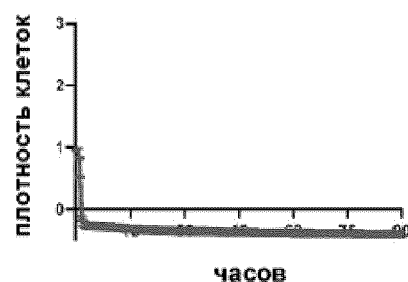
Фиг. 8А

Аллогенные

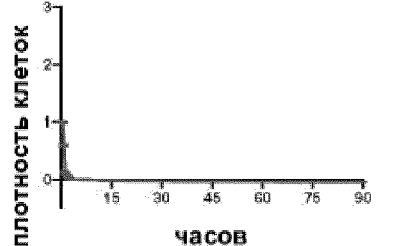
Макрофаги человека + dKO человека



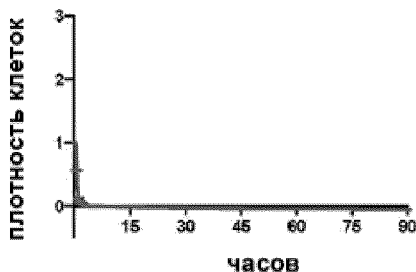
Микроглия мыши + dKO мыши



Микроглия человека + dKO человека



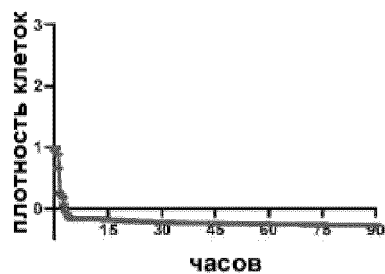
Микроглия мыши + dKO мыши



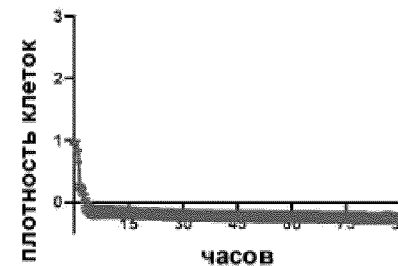
Фиг. 8В

Ксеногенные (межвидовые)

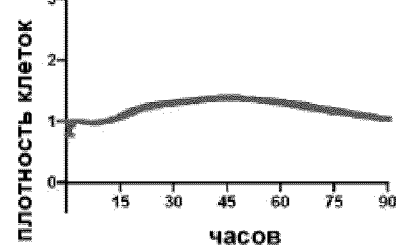
Макрофаги человека + dKO мыши



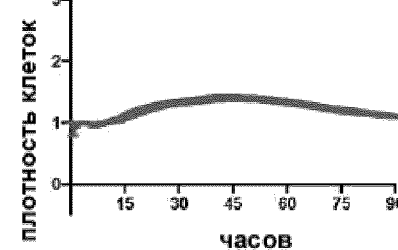
Микроглия мыши + dKO человека



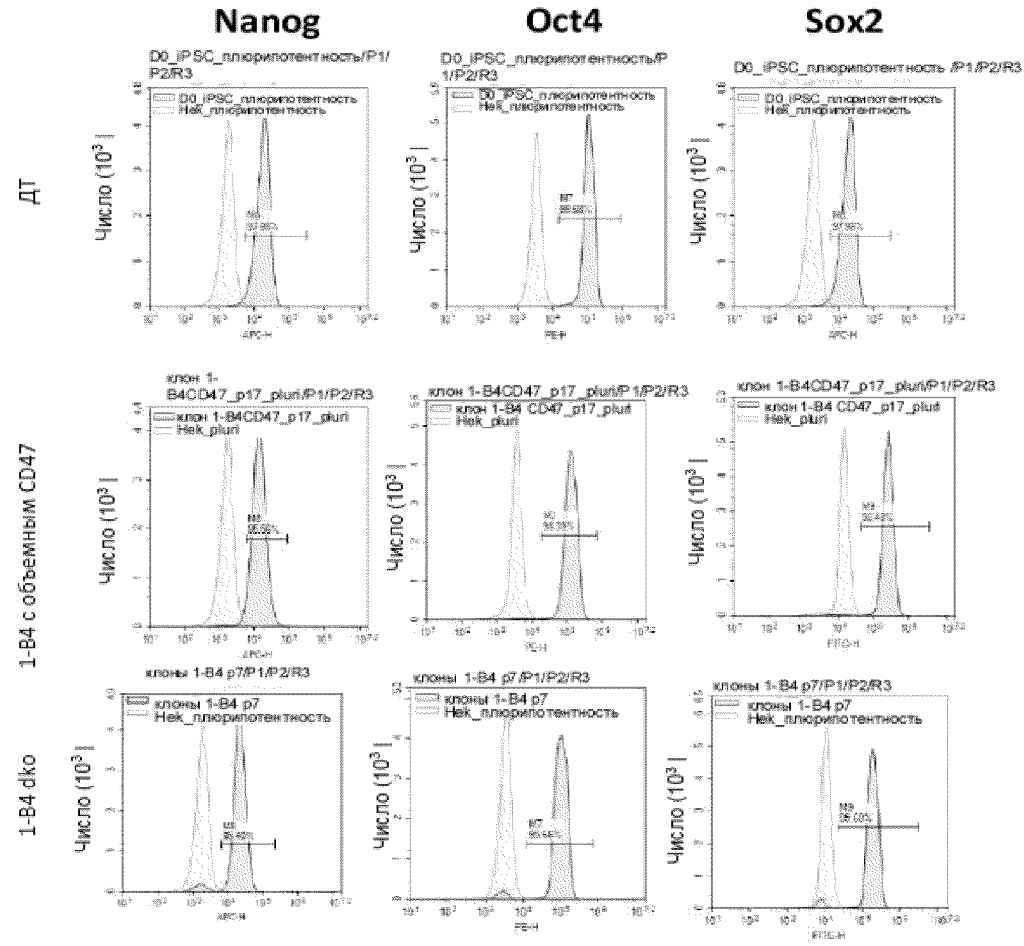
Микроглия человека + dKO мыши



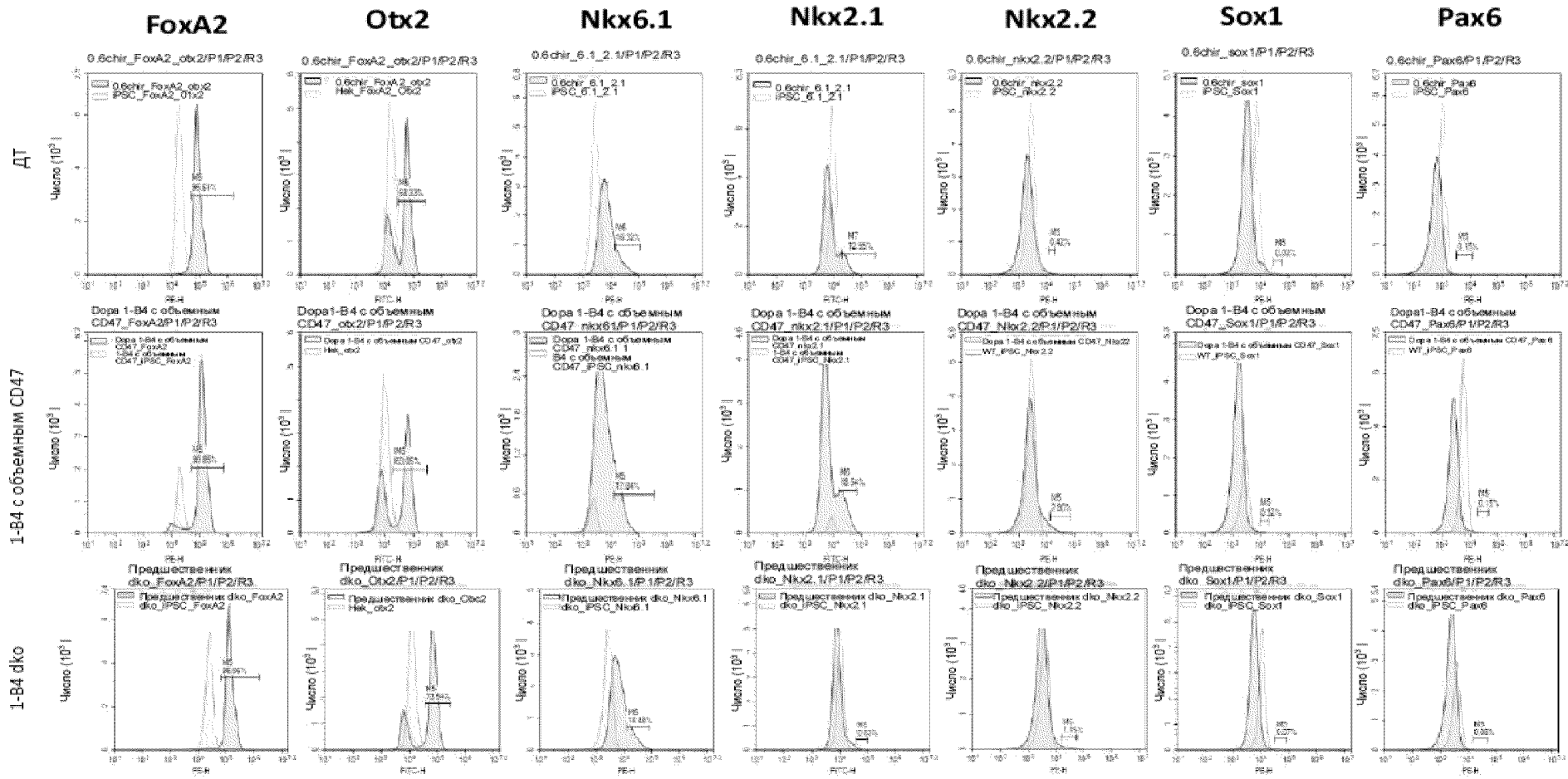
Микроглия мыши + dKO человека



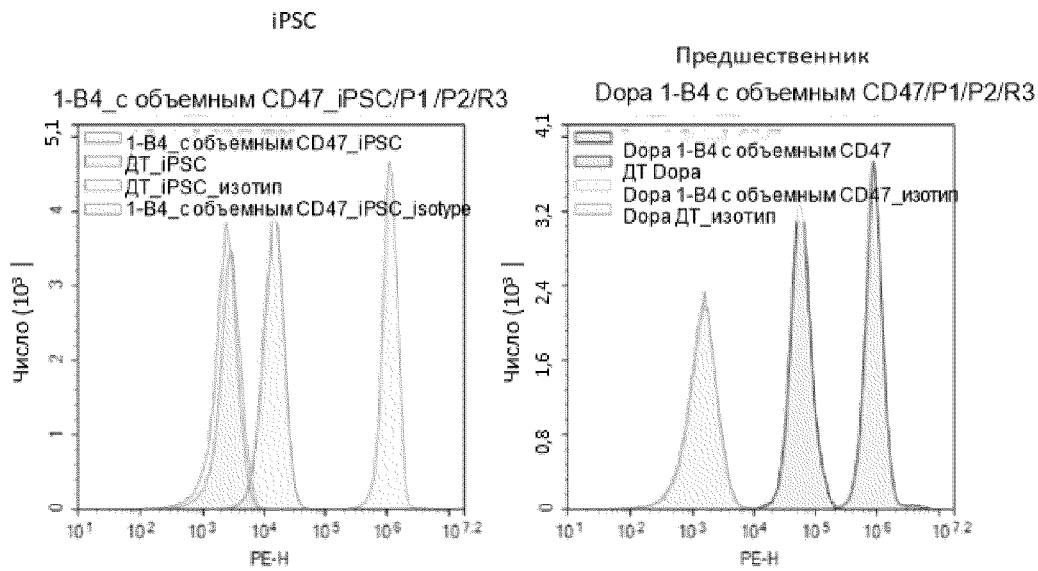
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Кратность изменения по сравнению с ДТ

Кратность

iPSC

77,82

Предшественник Дора

15,25

Кратность изменения по сравнению с изотипом

Кратность

DT iPSC

5,96

1-B4 iPSC

396,43

DT предшественник Дора

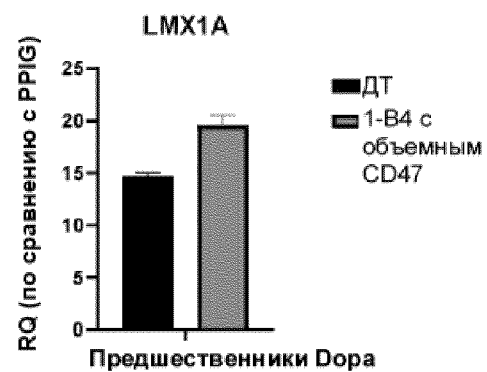
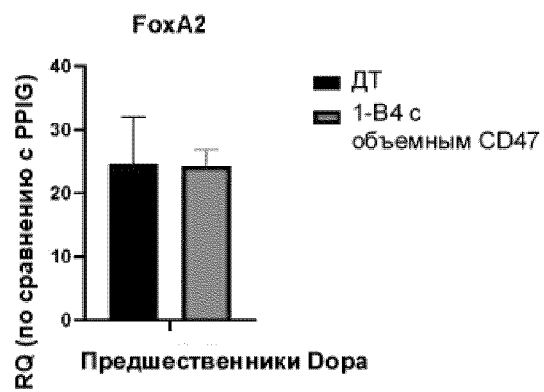
39,01

Предшественник 1-B4

599,67

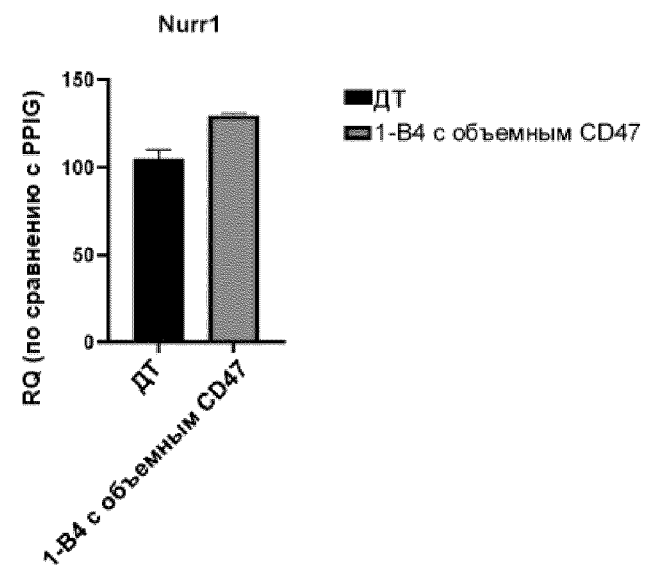
Фиг. 12А

Предшественник



Фиг. 12В

нейрональное созревание, 1 неделя



Фиг. 13

