

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201590088 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2015.04.30

(51) Int. Cl. C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2013.06.24

(54) СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КЛЕТКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНСУЛИНОЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

(31) 61/664,259

(32) 2012.06.26

(33) US

(86) PCT/US2013/047243

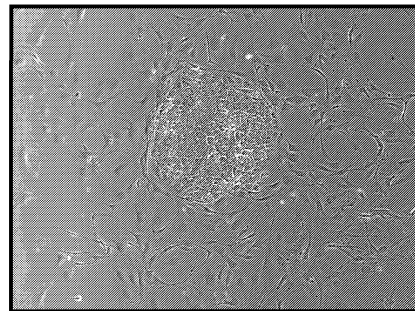
(87) WO 2014/004341 2014.01.03

(71) Заявитель:
СЕРЕКСИС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Раст Уилльям Л. (US)

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

(57) Свежую ткань поджелудочной железы человека можно использовать в качестве источника клеток для идентификации и отбора популяции нестволовых клеток, которая может стать источником суррогатных клеток поджелудочной железы, которые можно использовать для лечения инсулинозависимого сахарного диабета. Клетки-предшественники указанных суррогатных клеток поджелудочной железы не имеют репрограммирующих генов, интегрированных в их геном, дифференцируются в панкреатическом направлении в соответствии с протоколом, в котором используют только определенные реагенты, и, по существу, не способны к дифференцировке в мезодермальном направлении.



A1

201590088

201590088

A1

**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КЛЕТКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНСУЛИНОЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ НА ПАТЕНТ

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США №61/664259, поданной 26 июня 2012 года, содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

А. Востребованность панкреатических эндокринных клеток

Инсулинозависимый сахарный диабет представляет собой заболевание, характеризующееся потерей инсулинпродуцирующих клеток поджелудочной железы. Клетки, продуцирующие инсулин, также называемые "бета"-клетками, как правило, находятся в небольших сферических структурах, называемых "островками Лангерганса", которые расположены по всей поджелудочной железе. Доказано, что у людей и животных трансплантат замещающих островков Лангерганса, содержащих функциональные бета-клетки, может вылечить инсулинозависимый диабет. При данной процедуре островки выделяют из поджелудочных желез одного или более умерших доноров органов и вводят в один из различных участков организма. Некоторые островки переносят процедуру и приживаются в организме, в котором они продуцируют и секретируют инсулин. Эта процедура может быть достаточной для излечения пациента на несколько лет, до окончания продолжительности жизни пересаженных островков. См. Shapiro (2011) и Robertson (2010).

Хотя данный процесс позволяет эффективно лечить диабет, донорских поджелудочных желез достаточно для лечения только небольшой части пациентов с сахарным диабетом. В связи с этим необходимы альтернативные источники бета-клеток панкреатических островков.

В. Альтернативный источник клеток поджелудочной железы

Перспективным источником заместительных клеток поджелудочной железы, который привлек большое внимание, являются плюрипотентные стволовые клетки. Плюрипотентные

стволовые клетки получают из эмбриона, или их можно создать искусственно, путем приведения полностью дифференцированных соматических клеток в состояние, подобное эмбриотическому, то есть путем "репрограммирования" зрелых клеток в клетки, похожие на клетки, которые получают из эмбриона. Независимо от того получены ли клетки из эмбриона или созданы путем репрограммирования, все плюрипотентные стволовые клетки имеют три характеристики:

- экспрессия генов стволовых клеток: они экспрессируют гены, обычно экспрессированные на ранней стадии эмбрионального развития млекопитающих.

- бессмертие: теоретически их можно выращивать в культуре в неограниченных количествах.

- созревание по всем направлениям дифференцировки организма млекопитающего: все зрелые органы происходят из одного из трех направлений дифференцировки тканей раннего этапа эмбрионального развития. Указанные ткани представляют собой энтодерму, из которой формируются поджелудочная железа и другие органы желудочно-кишечного тракта, мезодерму, из которой образуются мышцы и скелет, и эктодерму, из которой формируется мозг и кожа. См. Yamanaka (2012), Plath (2011), Lai, (2011), и Stover (2011).

Разработаны протоколы обработки плюрипотентных стволовых клеток для получения клеток поджелудочной железы. Некоторые из указанных протоколов позволяют управлять дифференцировкой плюрипотентных стволовых клеток с получением формы, напоминающей форму фетальных предшественников островков Лангерганса. См. Kroon (2008), и Rezania (2011). Однако ни один протокол не позволяет получить панкреатические клетки, которые способны к дальнейшему созреванию в функциональные, инсулинпродуцирующие клетки, которые можно использовать в терапевтических целях упомянутым выше способом.

Обычные протоколы получения клеток-предшественников поджелудочной железы имеют ряд недочетов и недостатков, но ключевыми среди них являются следующие:

- Популяции клеток-предшественников поджелудочной железы

не являются чистыми, поскольку они загрязнены непанкреатическими клетками. Плюрипотентные стволовые клетки предрасположены к образованию всех трех зародышевых листков. Поэтому даже наиболее эффективный протокол позволяет получить популяции панкреатических клеток, смешанных с непанкреатическими клетками.

- Популяции клеток-предшественников поджелудочной железы загрязнены незрелыми клетками. Указанные клетки сохраняют свойство бессмертия и могут вызвать развитие опухоли после трансплантации пациенту.

- Клетки-предшественники поджелудочной железы не созревают в полностью функциональные инсулинпродуцирующие бета-клетки.

- В протоколах культивирования клеток используют реагенты и процедуры, которые, как правило, запрещены регулирующими органами для применения у человека.

См. Matveyenko (2010), Tahamtani (2013). См. также раздел 21 свода федеральных постановлений США, часть 1271.

C. Клеточная гетерогенность зрелой поджелудочной железы

Островки возникают во время эмбриогенеза из клеток-предшественников, которые отпочковываются от развивающихся протоков поджелудочной железы. В течение жизни здорового человека, бета-клетки производятся исключительно путем репликации существующих бета-клеток. См. Dor (2004). Процесс репликации бета-клеток происходит быстрее в течение периодов увеличения веса, беременности и восстановления после повреждения поджелудочной железы. До настоящего времени изолированные бета-клетки не реплицировались в культуре без утраты их свойств зрелых клеток. См. Paglusa (2013).

Стволовые клетки поджелудочной железы или клетки-предшественники не определялись в зрелой ткани в ходе экспериментов по отслеживанию линий дифференцировки клеток. Тем не менее, в ряде публикаций описаны клетки, выделенные из поджелудочной железы млекопитающих, которые, как считают, проявляют некоторые характеристики стволовых клеток. Указанные клетки были идентифицированы в ткани протоков, в экзокринной ткани и в самих островках. Например, см. Gong (2012), Noguchi

(2010), и Ciba (2009). Они описаны, как имеющие ограниченную способность к репликации и способные индуцироваться для экспрессии инсулина.

Кроме того, в нескольких опубликованных патентных документах описаны взрослые стволовые клетки, которые, как указано, получают непосредственно из зрелой поджелудочной железы. См. патенты США №6436704, №6815203, №7544510, №8110399 и №8377689, и также опубликованную заявку на патент США №2004/0115805.

Указанные клеточные популяции не производились в масштабе, необходимом для лечения пациента, и ни для одной из клеточных популяций не было показано, что она секретирует инсулин соответствующим образом в ответ на глюкозу. По указанным причинам данные клеточные популяции не имели клинического эффекта.

Например, в патенте США №8377689 описаны панкреатические клетки, которые как считают, размножаются в культуре, и у которых можно индуцировать экспрессию инсулина. Однако, как описывается, указанные клетки имели ограниченную репликативную способность и не созревали в полностью функциональные бета-клетки, или, по меньшей мере, были не способны вызвать регресс диабета в моделях грызунов. Другими словами, считают, что полученные результаты по существу показывают в модели "диабетической мыши", "восстановление от ... гипергликемии (>400 мг/дл) до почти нормального уровня (<300 мг/дл) в течение пяти недель, в то время как у диабетической мыши, которой не проводили трансплантацию, наблюдали гипергликемию в течение всего периода исследования." Колонка 45, после строки 18 и далее (курсив добавлен). Однако в модели диабета мышей "нормальный уровень" составляет приблизительно 150 мг/дл, тогда как устойчивый показатель свыше 250 мг/дл, как сообщалось, считается подтверждением стабильного диабетического состояния. См., например, Dang (2013).

Таким образом, потенциал стратегий лечения диабета с помощью трансплантации суррогатных бета-клеток или островков Лангерганса остался во многом нереализованными из-за отсутствия

масштабируемого источника терапевтических клеток поджелудочной железы фармацевтической степени чистоты.

Указанная часть работы отличается от изобретения, описанного в данном документе, поскольку она относится к выделению стволовой клетки из поджелудочной железы млекопитающих. Настоящее изобретение относится к выделению полностью зрелой, нестволовой клетки из поджелудочной железы или другого источника, которую обрабатывают в культуре для получения у нее характеристик стволовой клетки. Указанный способ основан на использовании генетического разнообразия зрелых клеток в пределах органов человека для идентификации субпопуляции, которую можно обработать с получением стволовой клетки для терапевтического применения. Генетическое разнообразие клеток, присутствующих в зрелых тканях человека, оценено только в последнее время, и традиционное понимание является неполным в отношении клеточной гетерогенности зрелой поджелудочной железы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как отмечалось, современные технологии создания клеток поджелудочной железы не позволяют получить эффективные суррогатные клетки поджелудочной железы, т.е. клетки, которые можно пересадить в какое-либо место в организме млекопитающего, где они приживаются и выполняют функцию естественной клетки поджелудочной железы. Настоящее изобретение позволяет преодолеть это ограничение и другие недостатки путем предоставления суррогатных клеток поджелудочной железы и композиций, содержащих клетки, которые имеют фармацевтическую степень чистоты, то есть которые одобрены для медицинского применения Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и/или другими подобными контролирующими органами. См., например, раздел 21 Свода федеральных постановлений США, часть 1271, содержание которого включено в описание посредством ссылки во всей полноте.

Что касается клеточной терапии человека, в целом, критерии приемлемости, используемые контролирующими органами во всем

мире, подчеркивают безопасность и эффективность используемых клеток. Центральными проблемами безопасности в данном контексте являются (i) склонность клеток к образованию опухоли, и (ii) риск передачи токсичных, иммуногенных или инфекционных частиц от реагентов животного происхождения, с которыми могли контактировать клетки. Критерии эффективности включают следующее: популяция клеток является активной в отношении данной клеточной функции и стабильной в течение эффективного периода лечения.

Соответственно, композиция по изобретению, содержащая суррогатные клетки поджелудочной железы, (1) не содержит клетки, не имеющие терапевтического применения, которые снижают активность или выполняют нежелательные функции, но составляющие ее клетки, имеющие терапевтическое применение, (2) культивируют с использованием определенных компонентов, неживотного происхождения, в соответствии с международными принятыми стандартами, и (3) не являются генетически модифицированными, трансформированными, кариотипически аномальными, или, в других случаях, не характеризуются недопустимо высоким риском нестабильности или онкогенности.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения, таким образом, предоставляется композиция, которая содержит неплюрипотентные клетки-предшественники суррогатных клеток поджелудочной железы. Клетки-предшественники (i) не имеют репрограммирующих генов, интегрированных в их геном, (ii) дифференцируются в панкреатическом направлении в соответствии с протоколом, в котором используют только определенные реагенты, и (iii) по существу не способны к дифференцировке в мезодермальном направлении.

Согласно другому аспекту изобретения предоставляется способ получения композиции, содержащей такие неплюрипотентные клетки-предшественники суррогатных клеток поджелудочной железы, которые используют для лечения инсулинозависимого диабета. Способ по изобретению включает:

а. получение клеток человека из живой панкреатической ткани человека в условиях минимальной культуры определенного

состава;

b. культивирование первичных клеток человека в течение периода времени продолжительностью несколько дней, который составляет меньше, чем приблизительно 9 дней; затем

c. использование репрограммирующих генов для репрограммирования первичных клеток человека из (b), в результате чего получают репрограммированные клетки, которые не имеют репрограммирующих генов, интегрированных в геном, но которые имеют морфологию стволовых клеток;

d. первичный отбор среди репрограммированных клеток, полученных в (c), в отношении способности к пролиферации без утраты морфологии стволовых клеток, в условиях минимальной среды определенного состава, в результате чего получают пролиферирующие репрограммированные клетки; и затем

e. вторичный отбор среди пролиферирующих репрограммированных клеток в отношении клеточной популяции, характеризующейся (i) способностью выживать и дифференцироваться по панкреатическому направлению дифференцировки в ходе выполнения протокола, в котором используют только определенные реагенты, и (ii) фактической неспособностью к дифференцировке в мезодермальном направлении, в результате чего получают упомянутые выше неплюрипотентные клетки-предшественники.

Другой аспект изобретения относится к композиции, содержащей суррогатные клетки поджелудочной железы, которые используют для лечения инсулинозависимого сахарного диабета, где (A) суррогатные клетки поджелудочной железы происходят из неплюрипотентных клеток-предшественников, описанных выше, и (B) более чем приблизительно 90% клеток, составляющих композицию, экспрессируют маркеры Pdx1, Nkx6.1 и NeuroD1. Изобретение дополнительно относится к способу получения таких суррогатных клеток поджелудочной железы, указанный способ включает:

a. воздействие на неплюрипотентные клетки-предшественники первой комбинацией компонентов, которые запускают дифференцировку в эндодермальном направлении, в результате чего получают эндодермальные клетки, первая комбинация не содержит

сыворотку и какого-либо члена семейства *wnt*; и затем

б. воздействие на эндодермальные клетки комбинацией компонентов, которые запускают дифференцировку по панкреатическому эндокринному направлению, в результате чего получают указанные суррогатные клетки поджелудочной железы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 показано получение клеток из органа человека. Другими словами, жизнеспособную поджелудочную железу человека измельчают на фрагменты (А), которые затем промывают и осаждают в конической пробирке (В). Адгезивные клетки (С) получают через 72 часа в культуре. В предоставляемых определенных условиях культивирования, клеточные культуры соответственно содержали смешанную популяцию клеток, которые проявляли морфологию эпителиальных и фибробластических клеток. Отсутствовали клетки с морфологией стволовых клеток или мезенхимальных клеток.

Фиг.2 схематично иллюстрирует организацию генов, включенных в эписомальные плазмиды для репрограммирования. Сокращения - CMV: промотор цитомегаловируса, 2A: саморасщепляющаяся пептидная последовательность, WPRE: посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков, SV40 Poly A: сигнал полиаденилирования, OriP: точка начала репликации, EBNA1: ядерный антиген 1 вируса Эпштейна-Барра, p53shRNA: малая шпилечная РНК, воздействующая на p53.

Фиг.3 представляет собой микрофотографию репрограммированных клеток. Фазово-контрастное изображение показывает, что клетки проявляли морфологию стволовых клеток через 20 дней после репрограммирования.

Фиг.4 представляет собой диаграмму, которая иллюстрирует пролиферацию в культуре клеточных колоний, отобранных по проявлению у них морфологии стволовых клеток. Десять колоний клеток, напоминающих стволовые клетки, показанные на фиг.3, переносили вручную в отдельные чашки для культивирования. Когда поверхность роста покрывалась непрерывным слоем стволовых клеток, клетки переносили в новые чашки для культивирования. Пролиферацию перенесенных клеток отслеживали в динамике по времени путем подсчета числа клеток, представленных в начале и

в конце трех последовательных пассажей. Количество клеток подсчитывали вручную, с помощью гемоцитометра, и рассчитывали время удвоения для каждого клона. Показали, что шесть из десяти отобранных клонов были способны пролиферировать в минимальной среде определенного состава.

Фиг.5 представляет собой микрофотографии А-Д, изображающие результаты отбора, примененного к упомянутым выше шести клонам, которые пролиферировали в минимальной среде определенного состава. Два из шести клонов выжили после процедуры дифференцировки, в которой использовали минимальные определенные реагенты. Только часть клеток (<50%) клона 9 выжила после дифференцировки, создавая небольшие скопления клеток в остальных пустых чашках для культивирования (А, С). Иммуноцитохимическое окрашивание показало, что Pdx1 экспрессировался в ядрах некоторых из указанных клеток (А), но оказывался цитоплазматическим в других клетках (С). Аналогично Nkx6.1, по-видимому, экспрессировался в ядре (С). По меньшей мере 80% клеток клона 10 выжили после процедуры дифференцировки, создавая слившийся монослой клеток (В, D) в чашках для культивирования. Pdx1 (В, D) и Nkx6.1 (D) экспрессировались в ядре >90% клеток. Таким образом, только клоны 9 и 10 выжили после процедуры дифференцировки. Клон 9 перенес процедуру плохо, и клетки не экспрессировали должным образом панкреатические гены. Данный клон был отклонен. Свыше 80% клеток клона 10 выжили после процедуры дифференцировки, и свыше 90% указанных клеток экспрессировали панкреатические гены соответствующим образом. Выбрали указанный клон.

Фиг.6 включает гистограммы, на которых представлены результаты анализов количественной ОТ-ПЦР экспрессии генов. Эмбрионидные тельца из клонов 5-9 экспрессировали гены, которые являются характерными для эндодермы, мезодермы, и эктодермы в третий и десятый дни дифференцировки. Однако клон 10 не экспрессировал гены, характерные для мезодермы. Одновременно с дифференцировкой, во всех эмбрионидных тельцах снижалась экспрессия генов, связанных с плюрипотентностью, на третий и

десятый день. Результаты нормализованы по бета-актину и представлены относительно дня 0 культивирования (недифференцированные культуры). Величины ошибок представляют собой среднеквадратическое отклонение, полученное на основе трех повторений.

На фиг.7 представлена гистограмма, показывающая экспериментальные результаты, которые подтверждают, что клон 10 не способен к дифференцировке в мезодермальном направлении. Стимулировали дифференцировку клонов 5 и 10 в мезодермальном кардиомиоцитарном направлении, в соответствии с протоколом, согласно которому получали популяцию кардиомиоцитов высокой чистоты из плюрипотентных стволовых клеток. См. Xu (2009). На 15-й день экспрессию генов специфических сердечных факторов роста (Gata4, Nkx2.5) и структурного белка (альфа МНС) оценивали количественно с помощью ОТ-ПЦР. В клоне 5 возрастала экспрессия кардиальных генов, тогда как в клоне 10 экспрессия кардиальных генов сохранялась на уровнях, сходных с уровнями, наблюдаемыми в недифференцированных клетках. Результаты представлены, как на фиг.6 (см. соответствующий комментарий выше).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

А. Подход изобретения, предоставляющий суррогатные клетки поджелудочной железы фармацевтической степени чистоты

Среди многообразия клеток, представленных в зрелой поджелудочной железе, обнаружена субпопуляция клеток, которую можно использовать для получения клетки, имеющей терапевтическое применение, которое описано выше. Указанные клетки не являются панкреатическими стволовыми клетками или клетками-предшественниками, но скорее, являются членами зрелой клеточной популяции с набором различных генов, которая содержит в себе специфический генетический набор, позволяющий проводить с ними манипуляции, подробно описанные ниже. Соответственно, ключевым аспектом изобретения является получение клеток из зрелого органа, так что сохраняется смешанная популяция, включающая субпопуляцию, идентифицированную автором настоящего

изобретения. См. пример 1, ниже.

Другим важным аспектом изобретения является репрограммирование в состояние стволовой клетки указанной выше смешанной популяции, каждую клетку которой можно размножить для анализа и селекции (см. примеры 2 и 3). Репрограммирование должно осуществляться таким способом, который не вызывает интеграции каких-либо репрограммирующих генов в геном клеток, или который иным образом не ограничивает одобрение контролирующими органами клеток для терапевтического применения у человека.

Другим важным аспектом изобретения является отбор из популяции репрограммированных клеток, стволовых клеток, которые обладают уникальным свойством, впервые выявленным автором изобретения, являясь источником суррогатных клеток поджелудочной железы фармацевтической степени чистоты. Критерии отбора отличаются от критериев отбора на плюрипотентность, которая является целью отбора в обычной методике. В результате получают клетки согласно изобретению, которые не являются плюрипотентными, и при этом могут более эффективно применяться в клинике (см. пример 4).

Использование репрограммирующих генов для получения плюрипотентных стволовых клеток является неэффективным процессом, приводящим к репрограммированию только от 0,01 до 0,0001% клеток, которые отвечают критериям плюрипотентности. В научной литературе эти клетки обозначают как "индуцированные плюрипотентные стволовые клетки" или клетки iPS. В традиционных подходах клетки, которые не соответствуют критериям плюрипотентности, отбраковывают; указанные клетки обычно обозначают как "не полностью репрограммированные" или "частично репрограммированные".

Генотип колонии клеток iPS может содержать определенную генетическую вариацию, которая присутствует в родительской клеточной популяции только с очень низкой частотой. Соответственно, процесс репрограммирования позволяет идентифицировать и выбрать генотипы, представленные лишь в незначительном меньшинстве в исходной клеточной популяции.

На основании фактов, (i) что репрограммирование является неэффективным процессом и (ii) что клеточные генотипы iPS часто отличаются от генотипа клетки, являющейся типичным представителем исходной популяции, автор настоящего изобретения предположил, что специфическое генетическое изменение может создавать предрасположенность клетки к успешному репрограммированию в клетку iPS. Таким образом, автор изобретения понял, что клетки, ранее отвергаемые, как не полностью репрограммированные, могут содержать редкое генетическое изменение, которое обеспечивает их предрасположенность к фенотипу не-iPS клеток, нераспознанное до настоящего времени в этом качестве, которое, тем не менее, имеет значение для терапевтической цели настоящего изобретения.

Клеточные популяции, свежeweделенные из органов человека, имеют значительно больший диапазон клеточного разнообразия, чем популяции клеток, культивируемых в течение длительного периода времени. Автор изобретения использовал репрограммирующие гены в популяциях свежeweделенных клеток для идентификации и отбора клетки с особым клиническим применением, указанным выше. Клетка, идентифицированная таким образом, не является панкреатической стволовой клеткой, о чем свидетельствуют следующие факты, идентифицированные клетки (1) не способны к репликации и, напротив, прекращают существование при длительном культивировании, (2) не проявляют морфологии стволовых клеток, и (3) могут быть выделены из тканей, которые не содержат предполагаемых стволовых клеток поджелудочной железы. (Предполагаемые стволовые клетки поджелудочной железы, как считают, существуют в протоках поджелудочной железы.) См. пример 1, ниже.

Клетки по настоящему изобретению, которые получают из зрелой поджелудочной железы, не требуют сыворотки для своего выделения, не проявляют морфологии стволовых клеток, и не требуют выделения из конкретных фракций очищенных субпопуляций клеток поджелудочной железы. Все указанное резко контрастирует с тем, что описано, например, в патенте США №8377689.

Согласно изобретению, таким образом, свежую ткань

поджелудочной железы человека можно использовать в качестве источника клеток, из которого идентифицируют и выделяют популяцию стволовых клеток, которая может стать источником суррогатных клеток поджелудочной железы, способных лечить инсулинозависимый сахарный диабет. В частности, как подробно описано ниже, клетки можно репрограммировать в течение одной недели после выделения из органа с введением их в состояние стволовых клеток.

Полученные стволовые клетки отбирали, исходя из их способности (1) эффективно дифференцироваться в панкреатические эндокринные клетки-предшественники, которые сами способны лечить инсулин-зависимый сахарный диабет, как описано выше, и (2) выживать и дифференцироваться в условиях минимальной культуральной среды, которые являются как масштабируемыми, так и в целом соответствующими требованиям контролирующих органов. "Эффективно" в указанном отношении означает получение клеточной популяции в конце процедуры дифференцировки, которая содержит по меньшей мере приблизительно 80% эндокринных клеток-предшественников; более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 90% эндокринных клеток-предшественников. "Эндокринные клетки-предшественники" представляют собой клетки, которые будут созревать в гормонпродуцирующие клетки островков Лангерганса. Указанные клетки характеризуются, например, одновременной экспрессией генов, Pdx1, Nkx6.1 и NeuroD1. В этом отношении "выживание" означает способность по меньшей мере приблизительно 80% исходной жизнеспособной клеточной популяции, и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90%, сохранять жизнеспособность в конце процедуры дифференцировки.

Более подробно, соединения, которые обуславливают дифференцировку в эндодермальном направлении, являются токсичными для плюрипотентных стволовых клеток. В общепринятых протоколах используют сыворотку для повышения выживаемости клеток, в связи с этим при использовании сыворотки выживаемость клеток может превышать 50%. Однако сыворотка является нестандартизированным реагентом, использование которого в культуре терапевтических клеток человека обычно является

нежелательным, согласно контролирующим органам.

В отличие от общепринятых протоколов, способ по настоящему изобретению исключает использование сыворотки, в результате чего полученные клетки можно считать подходящими для клеточной терапии человека. В общепринятых протоколах также используют wnt, фактор роста, который является дорогостоящим и крайне нестойким. Изобретение устраняет использование wnt, тем самым предоставляет способ, который является последовательным и масштабируемым.

Способ по изобретению, в котором не используют ни сыворотку, ни wnt, не эффективен в стимулировании эффективной дифференцировки плюрипотентной стволовой клетки. С другой стороны, клетки композиции согласно изобретению выбирают так, чтобы они соответствовали новому способу и выживали после него. Таким образом, более чем приблизительно 80% клеток, отобранных в соответствии с изобретением, предпочтительно более чем приблизительно 90% клеток выживают после процедуры дифференцировки. Кроме того, из сохранившихся клеток более чем примерно 80%, предпочтительно более чем примерно 90%, экспрессируют одновременно Pdx1, Nkx6.1 и NeuroD1, маркеры панкреатического эндокринного направления дифференцировки (см. пример 3, последний параграф).

Во время процедуры идентификации и выбора по данному изобретению, критерии отбора плюрипотентных стволовых клеток игнорируются, и клетки, созданные согласно изобретению, в действительности не являются плюрипотентными; то есть, они не способны дифференцироваться в значительной степени в непанкреатическом направлении. "В значительной степени" в данном контексте означает, что по меньшей мере приблизительно 5%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10%, и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 20% популяции дифференцированных клеток проявляют характеристики, специфичные для непанкреатического направления дифференцировки.

Например, клетки, полученные согласно изобретению, использовали в протоколе, обычно применяемом для получения смеси клеток, относящихся к трем направлениям дифференцировки,

мезодермальному, эндодермальному и эктодермальному. Для демонстрации способности дифференцироваться в смесь клеток, относящихся к трем направлениям дифференцировки, существует общепринятая практика предоставления среды, которая не вызывает дифференцировки одной клеточной линии за счет другой, такой как сыворотка, суспензии кластеров стволовых клеток, которые способны к самопроизвольному росту и дифференцировке. В таких условиях культивирования кластеры стволовых клеток будут дифференцироваться в соответствии со своими генетическими программами, не направляемые специфически предоставляемыми условиями культивирования. Кластеры, сформированные таким образом, называют "эмбрионидными тельцами" из-за их сходства с эмбрионом млекопитающего на ранней стадии развития. См. Rust (2006). Плюрипотентные клетки будут производить эмбрионидные тельца, которые содержат как и эмбрион млекопитающего, все три зародышевых листка: эктодерму, эндодерму и мезодерму. В отличие от плюрипотентных стволовых клеток, однако, смесь, полученная из клеток по настоящему изобретению, не содержала клеток мезодермального направления дифференцировки (см. пример 4, например, пятый параграф).

Клетки по изобретению также использовали в протоколе, обычно применяемом для дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты, которые являются клетками мезодермального направления дифференцировки. Также в отличие от плюрипотентных стволовых клеток, клетки по изобретению не экспрессировали гены, связанные с кардиомиоцитами, в ответ на протокол дифференцировки. Визуальный осмотр показал, что ни одна из клеток, описанных в настоящем изобретении, не проявляла типичной морфологии кардиомиоцитов, свидетельствующей об их сократимости. Таким образом, менее чем приблизительно 5% клеток ответили на протокол, используемый в данной области для получения кардиомиоцитов из плюрипотентных стволовых клеток (см. пример 4, например, шестой и седьмой параграфы).

Стволовые клетки, полученные в соответствии с настоящим изобретением, имеют следующие свойства, не описанные до настоящего времени:

- представляют собой обновляемую популяцию стволовых клеток, полученную из свежей поджелудочной железы человека;

- предрасположены к эффективной дифференцировке в практически чистые популяции (т.е. $\geq 80\%$ или $\geq 90\%$) суррогатных панкреатических клеток, которые можно использовать в лечении инсулинозависимого сахарного диабета;

- не имеют интегрированных в геном экзогенных генов; и

- их получают, репрограммируют и культивируют с помощью реагентов и способов, которые в целом рассматриваются контролирующими органами как допустимые для применения у человека.

Суррогатные клетки поджелудочной железы, полученные согласно изобретению, также обладают свойствами, которые не были описаны ранее. Указанные свойства включают следующее, клетки

- представляют собой по существу чистую популяцию терапевтических клеток (т.е. $\geq 80\%$ или $\geq 90\%$), без примеси стволовых клеток с онкогенным потенциалом;

- дифференцировались с помощью реагентов и способов, которые в целом рассматриваются контролирующими органами, как допустимые для применения у человека, и которые являются масштабируемыми; и

- не имеют интегрированных в геном экзогенных генов

В. Руководство по осуществлению способа изобретения

1. Получение нативных панкреатических клеток без потери их многообразия

Современные способы получения клеток из органов требуют культивирования клеток в течение долгого времени. В результате, субпопуляция пролиферирующих клеток, которые приспосабливаются к условиям культивирования, находится в более выгодном положении и перегоняет в росте популяцию, которая создает однородную клеточную культуру. Указанный феномен, часто называемый "дрейфом культуры", возникает лишь при десяти удвоениях популяции.

В отличие от этого, настоящее изобретение предусматривает,

что клетки, полученные из зрелого органа, не должны культивироваться в течение длительного периода времени, предпочтительно в течение одной недели или меньше, с менее чем, чем 5 удвоениями популяции. Напротив, в настоящем изобретении указано, что клетки, полученные из зрелого органа, не нужно культивировать в течение длительного периода времени, предпочтительно их культивируют в течение одной недели или меньше, с менее чем 5 удвоениями популяции. Такое культивирование предотвращает адаптацию клеточной популяции к условиям культивирования и минимизирует возможность того, что быстрорастущие клетки обгонят в росте популяцию и снижат в общем разнообразии популяции.

2. Репрограммирование клеток без интеграции или продолжительной экспрессии репрограммирующих генов

Четыре гена, Oct4, Sox2, Klf4, и Мус, будут вызывать у зрелой клетки появление свойств стволовой клетки. Указанные "репрограммирующие гены" должны экспрессироваться в той самой клетке, которую необходимо репрограммировать, и обычно их доставляют с помощью вирусов, которые вставляют гены в геном хозяина, где они могут экспрессироваться.

Клетки, которые содержат гены, вставленные в их геном случайным образом, обычно не допускаются контролирующими органами для трансплантации человеку. Это связано с тем, что клетки, модифицированные таким образом, имеют более высокий риск онкогенности, чем необработанные клетки.

Настоящее изобретение предполагает доставку репрограммирующих генов в плаزمиды, которые не интегрируют гены в геном и, следовательно, обеспечивают только временную экспрессию указанных генов. Тогда как в ядре гены, доставленные плазмидой, могут быть транскрибированы нуклеарными транскрипционными комплексами хозяина. См. Takacs (2010).

В предпочтительном варианте осуществления гены доставляют в эписомальных плаزمиды.

Термин "эписомальные" относится к плазмидам, которые могут существовать в ядре клетки, но которые не включаются в какую-либо хромосому клетки (Takacs, выше). Со временем эписомальные

плазмиды удаляются из клеточной популяции, поскольку они не реплицируются и отделяются во время митоза. Кроме того, эписомальные плазмиды могут быть удалены из ядра или могут быть разрушены.

Член семейства мус, обычно используемый для репрограммирования, С-мус, является известным онкогеном. В предпочтительном варианте осуществления в настоящем изобретении используют L-мус, который не является онкогеном, вместо С-мус. См. Nakagawa (2010).

3. Отбор клеток, подходящих для терапевтического применения

Клетки, которые репрограммируются, отличаются от не репрограммированных клеток тем, что они проявляют типичную морфологию стволовых клеток. Типичные стволовые клетки представляют собой мелкие клетки округлой формы, имеют крупное ядро и небольшую цитоплазму, и образуют при росте компактные кластеры.

Относительно небольшая, но распознаваемая фракция указанных репрограммированных клеток является источником суррогатных клеток поджелудочной железы фармацевтической степени чистоты, согласно настоящему изобретению. Указанную фракцию идентифицируют на основании соответствия критериям, подробно описанным ниже.

- Способность пролиферировать в условиях среды, содержащей определенные компоненты неживотного происхождения.

- Способность отвечать на минимальный дифференцирующий протокол путем дифференцировки в практически чистую популяцию клеток поджелудочной железы, т.е. популяцию, содержащую по меньшей мере приблизительно 80%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 90% клеток, которые экспрессируют гены, характерные для панкреатических эндокринных клеток-предшественников и которые могут созревать в гормонпродуцирующие клетки островков Лангерганса. Протокол по изобретению предназначен для направления клеток, поддающихся воздействию, по пути дифференцировки, который воспроизводит путь, который проходят стволовые клетки организма человека при

развитии поджелудочной железы. Соответственно, протокол имитирует развитие человека с достаточной точностью для получения панкреатической клетки, которая не отличается от панкреатической клетки, которую выделяют из развивающегося плода человека или новорожденного. В отличие от обычных способов, в протоколе согласно изобретению, также используют только определенные компоненты неживотного происхождения, которые могут применяться в масштабируемом фармацевтическом производственном процессе. То есть, в протоколе по изобретению не используется ни сыворотка, используемая до сих пор для повышения выживаемости клеток, ни член семейства *wnt*, фактор роста, который является чрезвычайно нестабильным и дорогостоящим.

- Способность популяции выживать после процедуры дифференцировки, в результате чего может быть успешно получена большая популяция панкреатических клеток. Как указано, термин "выживание" означает, что, по меньшей мере, приблизительно 80% исходной жизнеспособной клеточной популяции, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 90% популяции, сохраняет жизнеспособность в конце процедуры дифференцировки.

Согласно изобретению, отбор клеток, которые предрасположены к образованию панкреатических клеток, направлен против клеток, которые имеют свойство плюрипотентности, основанное на эффективном созревании клеток по всем трем направлениям дифференцировки в организме человека. В частности, клетки, составляющие вышеупомянутую фракцию, которая соответствует указанным критериям, не являются плюрипотентными, поскольку они по существу не способны дифференцироваться в клетки мезодермального направления, т.е. по меньшей мере приблизительно 5%, предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10%, и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 20% популяции дифференцированных клеток проявляют характеристики, специфичные для мезодермального направления дифференцировки.

С. Примеры

1. Получение первичных панкреатических клеток с

использованием только определенных реагентов неживотного происхождения

Поджелудочную железу человека тщательно промывали средой DMEM, дополненной 5X антибиотиком/противогрибковым средством (пенициллин, стрептомицин, амфотерицин. Life Technologies). Небольшую часть ткани измельчали на кусочки размером не более 2 мм в диаметре. Измельченную ткань переносили в 50 мл коническую пробирку и давали осесть под действием силы тяжести (фиг.1 А, В).

Среду заменяли свежей средой DMEM, дополненной 5X антибиотика/противогрибкового средства, и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Затем среду заменяли первичной культуральной средой, содержащей DMEM/F12, L-аскорбиновая кислота-2-фосфат (64 мг/л), селенит натрия (14 мкг/л), инсулин (19,4 мг/л), NaHCO_3 (543 мг/л), трансферрин (10,7 мг/л), TGF бета 1 (2 мкг/л), bFGF (10 мкг/л), гепарин (50 мкг/л), и гидрокортизон (100 нМ). Среду доводили до значений pH 7,4 и 340 мОсм.

В варианте вышеприведенного протокола использовали среду Essential 8 (Life Technologies), дополненную EGF (100 мкг/л), тромбином (1 Ед/мл) и гидрокортизоном (100 нМ). В другом варианте осуществления фракционированную ткань поджелудочной железы, приобретенную в Prodo Labs (Irvine, CA), использовали вместо целой поджелудочной железы человека; то есть ткань поджелудочной железы фракционировали на препараты островков и препаратов протоков. В другом варианте использовали чрезкожную пункционную биопсию. В указанных вариантах не наблюдали существенного изменения результата.

Коллагеназу неживотного происхождения, марки АГА (Worthington Biochemical) в количестве 50 мг/мл добавляли к среде, и чашку Петри помещали на ночь в инкубатор с увлажнением при 37°C. На следующий день остальные клеточные скопления разбивали с помощью ресуспендирования. Раствор переносили в коническую пробирку и центрифугировали в течение 4 минут при 200XG. Среду отсасывали и клеточный осадок ресуспендировали в

среде для первичной культуры. Затем клетки переносили в чашку Петри с предварительно нанесенным субстратом CELLstart (Invitrogen) и возвращали в инкубатор. Через 24 часа клетки прикреплялись к чашке Петри, и начали размножаться (см. фиг.1, изображение С).

В варианте указанного протокола коллагеназу заменяли 1X TrypLE Select (Life Technologies). В другом варианте чашки Петри с CELLstart заменяли чашками Петри, покрытыми субстратом 1X VitronectinXF (Stem Cell Technologies). Ни в одном из вариантов не наблюдали значительного изменения.

Когда рост клеточной культуры почти достигал степени слияния монослоя на всей поверхности роста, клетки отделяли путем добавления TrypLE Select (Life Technologies) и собирали для репрограммирования. Указанный процесс, начиная с получения поджелудочной железы, продолжался не более 9 дней. Неиспользованные клетки подвергали криоконсервации в Synth-a-freeze CTS (Life Technologies), в соответствии с инструкциями производителей. В варианте, не вызвавшем значительного изменения, неиспользованные клетки подвергали криоконсервации в среде для первичной культуры, дополненной 10% DMSO.

2. Репрограммирование клеток поджелудочной железы с использованием только векторов, не интегрирующих гены, и определенных реагентов неживотного происхождения.

Клеточные культуры разъединяли на отдельные клетки с помощью реагента TrypLE Select. Подсчет клеток в суспензии отдельных клеток осуществляли с помощью гемоцитометра. Переносили $1,5 \times 10^6$ клеток в новую коническую пробирку и центрифугировали в течение 4 минут при 200XG. Осадок ресуспендировали в растворе V (Lonza), дополненном 7,5 мкг плазмиды для репрограммирования 1 и 12,5 мкг плазмиды для репрограммирования 2 (фиг.2), и добавляли в кювету для электропорации. Плазмиды для репрограммирования 1 и 2 являются эписомальными, не интегрирующимися в геном плазмидами. Гены, использованные в плазмидах для репрограммирования, описаны, например, Takahashi (2006). L-мус использовали вместо C-мус, известного онкогена. См. Nakagawa (2010). Кювету быстро

вставляли в нуклеофектор Lonza и проводили электропорацию с помощью программы T-024.

Электропорированные клетки разводили в культуральной среде для репрограммирования и переносили в чашки, предварительно покрытые CELLstart. Культуральная среда для репрограммирования состояла из DMEM/F12, L-аскорбиновой кислоты-2-фосфата (64 мг/л), селенита натрия (14 мкг/л), инсулина (19,4 мг/л), NaHCO_3 (543 мг/л), трансферрина (10,7 мг/л), TGF бета 1 (2 мкг/л), bFGF (10 мкг/л), и гепарина (50 мкг/л). Среду доводили до значений pH 7,4 и 340 мОсм. Альтернативно электропорированные клетки разводили в среде Essential 6 (Life Technologies), дополненной 100 нг/мл bFGF (Sigma), 100 мкМ бутирата натрия (Sigma) и 100 нМ гидрокортизона (Sigma).

Среду меняли каждые 2 дня. Необязательно среду дополняли 2 мМ вальпроевой кислоты (Sigma) в дни 4-10. Клетки пассировали, когда они достигали степени слияния монослоя, с помощью TrypLE. К 20 дню появлялись колонии клеток с морфологией стволовых клеток (фиг.3).

3. Идентификация и отбор клеток, используемых для лечения инсулинозависимого диабета

Десять колоний клеток с морфологией стволовых клеток вручную отделяли от субстрата в виде небольших скоплений клеток и переносили в новые чашки Петри, с предварительно нанесенным CELLstart, и культивировали с культуральной средой для репрограммирования. В варианте протокола колонии с морфологией стволовых клеток переносили на чашки Петри с предварительно нанесенным субстратом Vitronectin XF (Stem Cell Technologies).

Из полученных таким образом десяти колоний, шесть колоний продолжали размножаться без изменения морфологии. Время удвоения популяции клеток рассчитывали в течение пассажей 1-3 (фиг.4).

Затем колонии пролиферирующих клеток переносили в лунки шестилуночных культуральных планшетов, предварительно покрытых CELLstart, и оставляли расти почти до слияния монослоя. При достижении почти полного слияния монослоя клетки использовали в протоколе прямой дифференцировки клеток в панкреатическом

направлении. Альтернативно, клетки переносили в лунки шестилуночных тканевых планшетов с предварительно нанесенным субстратом Vitronectin XF (Stem Cell Technologies).

Новый протокол для стимуляции дифференцировки стволовых клеток в панкреатическом направлении: среду заменяли DMEM/F-12, дополненной 0,2% человеческого сывороточного альбумина (HSA), 0,5XN2 (Life Technologies), 0,5XB27 (Life Technologies), 100 нг/мл активина А, и 1 мкМ вортманнина (Sigma). Среду меняли через 2 дня. К 4-му дню клетки экспрессировали гены, характерные для эндодермального направления дифференцировки, Sox 17, HNF3 β и HNF4 α . На 5-й день среду заменяли IMDM/F-12, дополненной 0,5% HSA, 2 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma), 50 нг/мл Noggin, 10 нг/мл FGF7/KGF, и 0,5% инсулин-трансферрин-селен (BD Biosciences). Среду меняли на 7-й день. На девятый день, среду заменяли средой DMEM, дополненной 1% ITS, 1XN2, и 50 нг/мл EGF. Среду меняли в дни 11 и 13. К 15-му дню клетки одновременно экспрессировали гены, характерные для панкреатических клеток, из которых происходит эндокринная ткань поджелудочной железы, Pdx1, Nkx6.1, и NeuroD.

Из шести колоний только две смогли выжить после процедуры дифференцировки. Выживание определяют как сохранение после дифференцировки по меньшей мере 80% клеток, подвергнутых процедуре дифференцировки. На пятнадцатый день две выжившие культуры фиксировали с использованием 4% параформальдегида и подготавливали для иммуноцитохимического окрашивания. Экспрессию белков Pdx1 и Nkx6.1 визуализировали с помощью первой инкубации с антителами анти-Pdx1 и анти-Nkx6.1, и второй инкубации с вторичными антителами, соединенными с флуоресцентным красителем. Из двух культур только одна сохранилась в виде почти сплошного слоя клеток культуры, состоящего почти исключительно из Pdx1 и Nkx6.1 бипозитивных клеток (фиг.5). Подсчет ядер на нескольких флуоресцентных изображениях клона 10 показал, что >95% клеток экспрессировали Pdx1 и Nkx6.1.

4. Тесты на плюрипотентность

Клоны клеток 5-10 дифференцировали в три первичных зародышевых листка, чтобы определить, являлись ли указанные стволовые клетки плюрипотентными. Протокол дифференцировки, обычно используемый специалистами в данной области, позволяет проводить дифференцировку стволовых клеток в "эмбрионидные тельца". См. [Rust 2006]. Дифференцировку оценивали с помощью анализа экспрессии генов в RT-qPCR.

Две лунки шестилуночных планшетов, содержащие клетки каждого из клонов 5-10, культивировали с диспазой в течение пяти минут (Stem Cell Technologies) и вручную отделяли клетки путем соскабливания наконечником автоматической пипетки. Среду, содержащую скопления клеток, переносили в коническую пробирку и центрифугировали при 90XG в течение 5 минут. Клеточный осадок отмывали средой DMEM (Gibco) и ресуспендировали в среде RPMI, дополненной 20% заменителем сыворотки (Invitrogen) и 0,5% об/об пенициллина/стрептомицина (Gibco).

Клеточные осадки переносили в лунки шестилуночного планшета с низкой адсорбцией и культивировали в течение 15 дней. Среду меняли каждые 2-3 дня. Через два дня начинали формироваться эмбрионидные тельца. Аликвоты эмбриональных телеч собирали в дни 0, 3 и 10, и проводили анализ с помощью ОТ-ПЦР. Общую РНК выделяли с помощью набора RNeasy (Qiagen), обрабатывали ДНКазой на фильтре и проводили количественное определение путем измерения поглощения в УФ-области. Согласно инструкциям производителя, всего 1 мкг РНК переводили в кДНК с использованием обратной транскриптазы вируса мышинного лейкоза Молони (M-MuLV) (New England Biolabs) и гексамерных праймеров со случайной последовательностью.

Количественную ПЦР осуществляли с 50 нг обратной транскриптазы в каждой реакции, 250 нМ каждого праймера, и реакционной смеси 1XSYBR green PCR (Bio-RAD) и анализировали с помощью термоциклера iCycler (Bio-RAD). Пары праймеров перечислены в таблице 1. Экспрессию рассчитывали на основании стандартной кривой, нормализованной по бета-актину, и относительно дня 0 (недифференцированные клетки).

Таблица 1

Праймеры, использованные в количественной ОТ-ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
Oct4	GGCAACCTGGAGAATTTGTT	GCCGGTTACAGAACCACACT
Nanog	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT	TGCGTCACACCATTGCTATT
Sox17	CCAGAATCCAGACCTGCACAA	CTCTGCCTCCTCCACGAA
AFP	GTAGCGCTGCAAACAATGAA	TCCAACAGCCTGAGAAATC
HNf3 бета	GGAGCGGTGAAGATGGAA	TACGTGTTTCATGCCGTTTAT
SHH	CCAATTACAACCCCTACATC	CAGTTTCACTCCTGGCCACT
Tbx6	AGTGCTGAGGCCTACCTCCT	CCAGAAATGCAGCCGAGTAG
Нестин	GCCCTGACCACTCCAGTTTA	GGAGTCCTGGATTTCTTCC
NeuroD	GCCCCAGGGTTATGAGACTA	GTCCAGCTTGGAGGACCTT
Nkx2.5	AGGACCCTAGAGCCGAAAAG	GTTGTCCGCCTCGTCTTCT
GATA4	GGAAGCCCAAGAACCTGAAT	GGGAGGAAGGCTCTCACTG
альфаMHC	ATTGCTGAAACCGAGAATGG	CGCTCCTTGAGGTTGAAAAG
бета Актин	CAATGTGGCCGAGGACTTTG	CATTCTCCTTAGAGAGAAGTGG

Очевидна корреляция между высокой эффективностью дифференцировки клеток в панкреатическом направлении и низкой эффективностью дифференцировки клеток в мезодермальном направлении (фиг.6). По мере прохождения дифференцировки все клоны проявляли сниженную экспрессию генов, связанных с плюрипотентностью, и повышенную экспрессию генов, характерных для клеток эндодермы и эктодермы. В клонах 5–9 наблюдали увеличение экспрессии генов, характерных для клеток мезодермы. В клоне 10 не наблюдали существенной экспрессии генов, характерных для клеток мезодермы.

Для подтверждения указанного последнего результата, клоны 5 и 10 использовали в протоколе, созданном для стимуляции дифференцировки плюрипотентных клеток в мезодермальные кардиомиоциты [Xu 2009]. Вкратце, клоны пассировали на планшеты с низкой адсорбцией для формирования клеточных кластеров, как описано выше, за исключением того, что использовали культуральную среду для репрограммирования. После инкубации в течение ночи, среду заменяли средой, состоящей из DMEM, IX заменимых аминокислот (Gibco), 2 mM L-глутамина (Gibco), 5,5 мкг/мл трансферрина (Sigma), 5 нг/мл селенита натрия (Sigma), 0,1 mM бета-меркаптоэтанола (Gibco), и IX пенициллина/стрептомицина (Gibco). Среду меняли каждые 3–4 дня.

Спонтанное разрушение клеточных кластеров, содержащих

мезодермальные кардиомиоциты, наблюдали приблизительно на 12 день в культурах клона 5. К 15 дню по меньшей мере 50% клеточных кластеров спонтанно уменьшалось по меньшей мере с одной стороны. Эмбрионидные тельца собирали на 15-й день и осуществляли анализ ОТ-ПЦР в отношении генов, типичных для кардиомиоцитов.

Гены кардиомиоцитов экспрессировались в больших количествах клоном 5, т.е. по меньшей мере в 5 раз больше, чем у недифференцированных клеток (фиг.7). В то же время спонтанное разрушение клеточных кластеров не обнаруживали в культуре клона 10 ни на 12-й день, ни на 15-й день дифференцировки. Анализ ОТ-ПЦР экспрессии генов клеточных кластеров показал, что уровни экспрессии генов кардиомиоцитов не превышали уровни, наблюдаемые в недифференцированных стволовых клетках.

Таким образом, клон 10 по существу был не способен дифференцироваться в клетки мезодермальной кардиальной линии. Поскольку не обнаружили спонтанного распада клеточных кластеров, и поскольку гены кардиомиоцитов не экспрессировались в количествах, превышающих уровни экспрессии в недифференцированных клеточных популяциях, пришли к выводу, что менее приблизительно 5% клеток отвечали на протокол, обычно используемый для дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в кардиомиоциты.

Несмотря на то, что конкретные варианты осуществления настоящего изобретения описаны выше, они являются только иллюстративными и не ограничивают изобретение. Рассмотрение данного описания сделает многие варианты изобретения очевидными для специалистов в области, к которой относится изобретение. Полный объем изобретения следует определять, основываясь на формуле изобретения, приведенной ниже, наряду с полным набором эквивалентов, и с описанием, вместе с указанными вариантами.

ЦИТИРОВАННЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

Патентные документы США

6,436,704 B1	8/2002	Roberts and Mather
6,815,203 B1	11/2004	Bonner-Weir and Taneja
7,544,510 B2	6/2009	Habener et al.
7,604,991 B2	10/2009	Bouwens and Baeyens
8,110,399 B2	2/2012	Habener et al.
2004/0115805 A1	6/2004	Tsang et al.
8,377,689 B2	2/2013	Tsang et al.

Другие публикации

- Shapiro, A.M. 2011 *Curr Opin Organ Transplant* 16(6), 627-31
- Robertson, R.P. 2010 *Endocrinol Metab Clin N Am* 39, 655-67
- Yamanaka, S. 2012 *Cell Stem Cell* 10, 678-84
- Plath, K. 2011 *Nat Rev Genet.* 12(4), 253-65
- Lai, M.I. 2011 *J Assist Reprod Genet* 28, 291-301
- Stover, A.E., et al. 2011 *Methods Mol Biol* 767, 391-8
- Kroon, E., et al. 2008 *Nat Biotechnol* 26(4), 443-52
- Rezania, A., et al. 2012 *Diabetes* 61(8), 2016-29
- Matveyenko, A.V., et al. 2010 *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E713-20
- Tahamtani, Y., et al 2013 *Stem Cells and Dev* 22(9), 1419-32
- Title 21, U.S. Code of Federal Regulations, part 1271
- Dor Y., et al. 2004 *Nature* 429(6987), 41-6
- Pagluca, F.W. and Melton, D.A. 2013 *Dev* 140, 2472-83
- Gong J, et al. 2012 *J Mol Histol* 43(6), 745-50
- Noguchi H, et al. 2010 *Cell Transplant* 19(6), 879-86
- Ciba P, et al. 2009 *Ann Anat* 191(1), 94-103
- Dang T.T., et al. 2013 *Biomaterials* 34, 5792-801
- Xu X.Q., et al. 2009 *Stem Cells.* 27(9), 2163-74
- Rust W.L., et al. 2006 *Stem Cells Dev* 15(6), 889-904
- Takacs M, et al. 2010 *Biochim Biophys Acta* 1799(3-4), 228-35
- Nakagawa M, et al. 2010 *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(32), 14152-7
- Takahashi K and Yamanaka S. 2006 *Cell* 126(4), 663-76

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SERAXIS, INC.

<120> СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И КЛЕТКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНСУЛИНОЗАВИСИМОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

<130> 105305-0103

<140> PCT/US2013/047243

<141> 2013-06-24

<150> 61/664,259

<151> 2012-06-26

<160> 26

<170> Патент в версии 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 1

ggcaacstgg agaatttggt

20

<210> 2

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 2

gscggttaca gaaccasact

20

<210> 3

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 3

tacstcagcc tccagcagat

20

<210> 4

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 4
tgcgtcacac cattgctatt 20

<210> 5
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 5
ссagaatсса gacstgcаса а 21

<210> 6
<211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 6
ctctgcstcc tссасгаа 18

<210> 7
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 7
gtagcgstgc aaасаатгаа 20

<210> 8
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 8

tccaacagcc tgagaaatc

19

<210> 9

<211> 18

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 9

ggagcsgtga agatgga

18

<210> 10

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 10

tacgtgttca tgccgttcat

20

<210> 11

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 11

ccaattacaа ccstacatc

20

<210> 12

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 12

cagtttcast cctggccast

20

<210> 13

<211> 20

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 13
agtgctgagg cctacstcct 20

<210> 14
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 14
ссагааатгс агссгagtаg 20

<210> 15
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 15
gссстgaccа ctccagttta 20

<210> 16
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 16
ggagtсctgg atttcsttcc 20

<210> 17
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 17
gccccagggt tatgagacta 20

<210> 18
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 18
gtccagcttg gaggacctt 19

<210> 19
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 19
aggacstag agccgaaaag 20

<210> 20
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 20
gttgtccgss tcgtcttct 19

<210> 21
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 21
ggaagssaa gaacctgaat 20

<210> 22
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник

<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 22
gggaggaagg ctctcactg 19

<210> 23
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 23
attgctgaaa ccgagaatgg 20

<210> 24
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 24
cgctccttga ggttgaaaag 20

<210> 25
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 25
caatgtggcc gaggactttg 20

<210> 26
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /замечание="описание искусственной последовательности: синтетический праймер"

<400> 26
cattctcctt agagagaagt gg 22

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая неплюрипотентные клетки-предшественники суррогатных клеток поджелудочной железы, которые используются для лечения инсулинозависимого сахарного диабета, где клетки-предшественники (i) не имеют репрограммирующих генов, интегрированных в их геном, (ii) дифференцируются в панкреатическом направлении в соответствии с протоколом, в котором используют только определенные реагенты, и (iii) по существу не способны к дифференцировке в мезодермальном направлении.

2. Способ получения композиции, содержащей неплюрипотентные клетки-предшественники суррогатных клеток поджелудочной железы, которые используют для лечения инсулинозависимого диабета, включающий:

a. получение клеток человека из живой панкреатической ткани человека в условиях минимальной культуры определенного состава;

b. культивирование первичных клеток человека в течение периода времени продолжительностью несколько дней, который составляет меньше, чем приблизительно 9 дней; затем

c. использование репрограммирующих генов для репрограммирования первичных клеток человека из (b), в результате чего получают репрограммированные клетки, которые не имеют репрограммирующих генов, интегрированных в геном, но которые имеют морфологию стволовых клеток;

d. первичный отбор среди репрограммированных клеток, полученных в (c), в отношении способности к пролиферации без утраты морфологии стволовых клеток, в условиях минимальной среды определенного состава, в результате чего получают пролиферирующие репрограммированные клетки; и затем

e. вторичный отбор среди пролиферирующих репрограммированных клеток в отношении клеточной популяции, характеризующейся (i) способностью выживать и дифференцироваться по панкреатическому направлению в ходе выполнения протокола, в котором используют только определенные реагенты, и (ii) фактической неспособностью к дифференцировке в

мезодермальном направлении, в результате чего получают упомянутые выше неплюрипотентные клетки-предшественники.

3. Композиция, содержащая суррогатные клетки поджелудочной железы, которые используют для лечения инсулинозависимого сахарного диабета, где (А) суррогатные клетки поджелудочной железы происходят из неплюрипотентных клеток-предшественников п.1 и (В) более чем приблизительно 90% клеток, составляющих композицию, экспрессируют маркеры Pdx1, Nkx6.1, и NeuroD1.

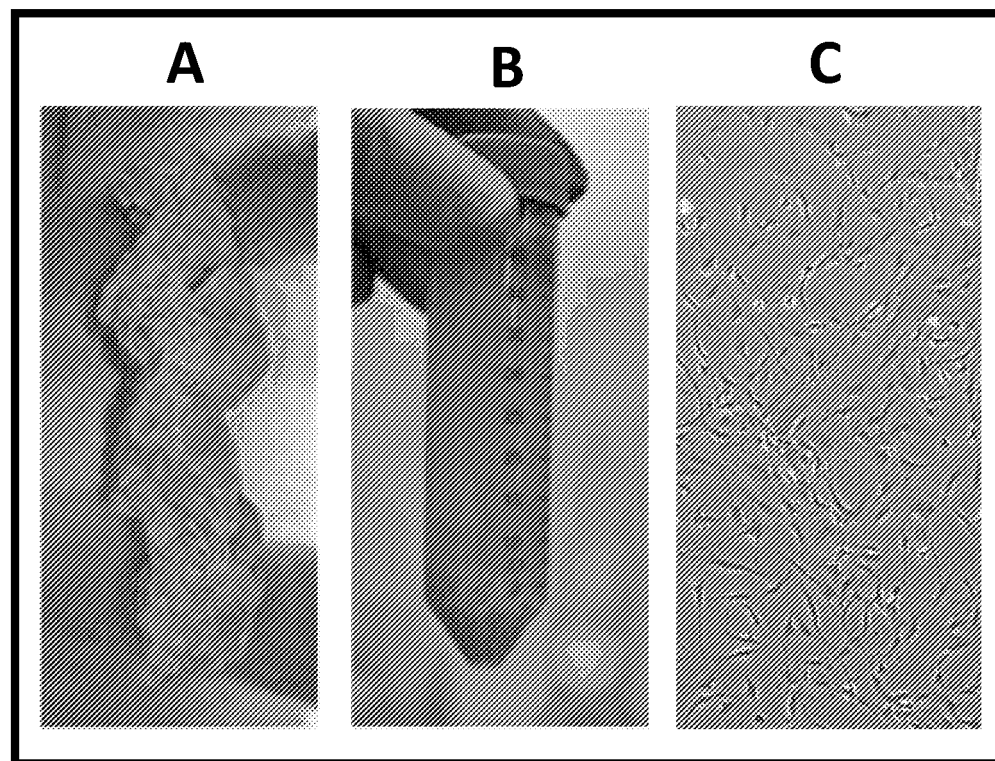
4. Способ получения суррогатных клеток поджелудочной железы, которые используют для лечения инсулинозависимого сахарного диабета, включающий:

а. воздействие на неплюрипотентные клетки-предшественники по п.1 первой комбинацией компонентов, которые запускают дифференцировку в эндодермальном направлении, в результате чего получают эндодермальные клетки, указанная первая комбинация не содержит сыворотку и какого-либо члена семейства wnt; и затем

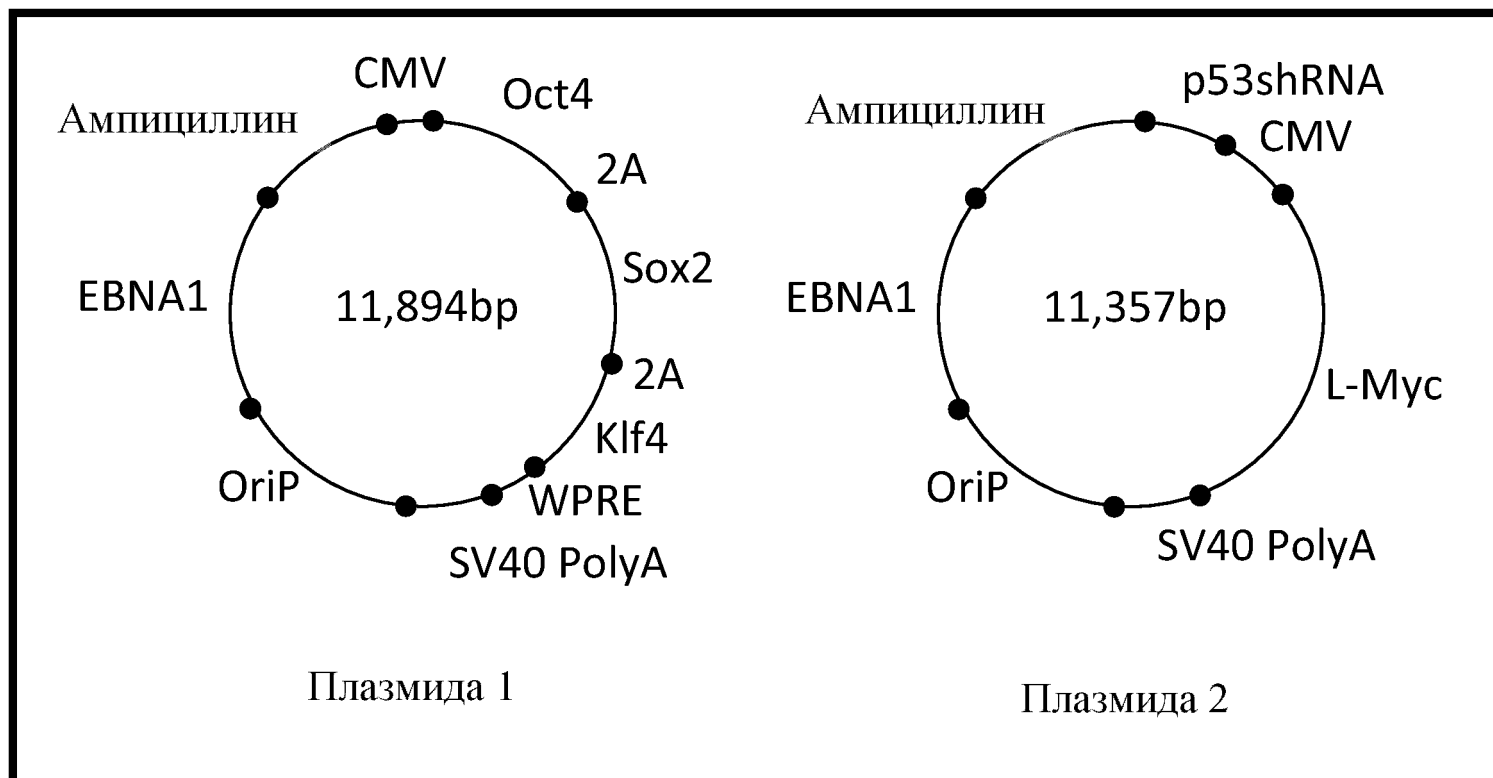
б. воздействие на указанные эндодермальные клетки комбинацией компонентов, которые запускают дифференцировку по панкреатическому эндокринному направлению, в результате чего получают указанные суррогатные клетки поджелудочной железы.

По доверенности

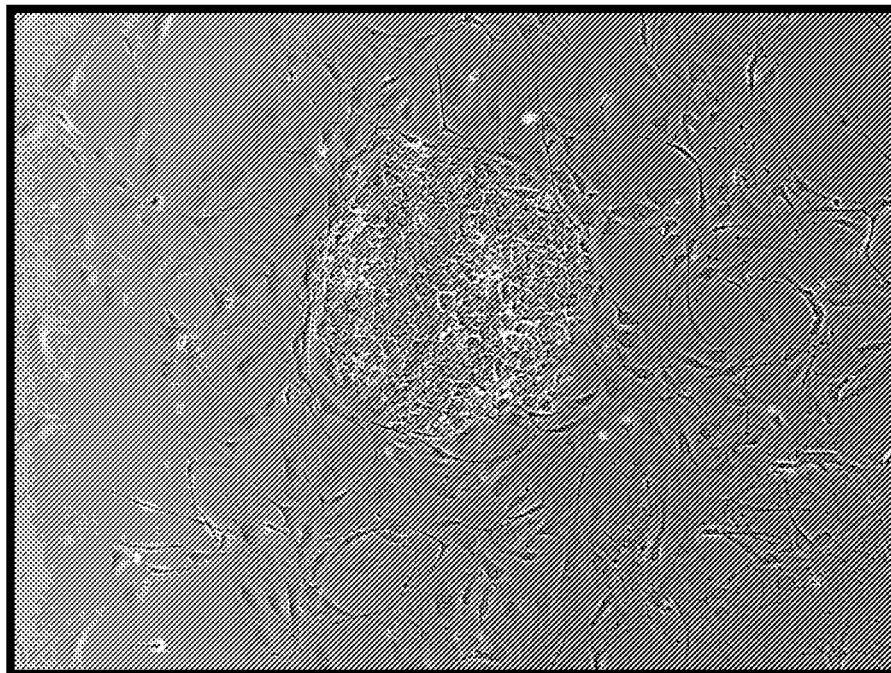
ФИГ.1



ФИГ.2



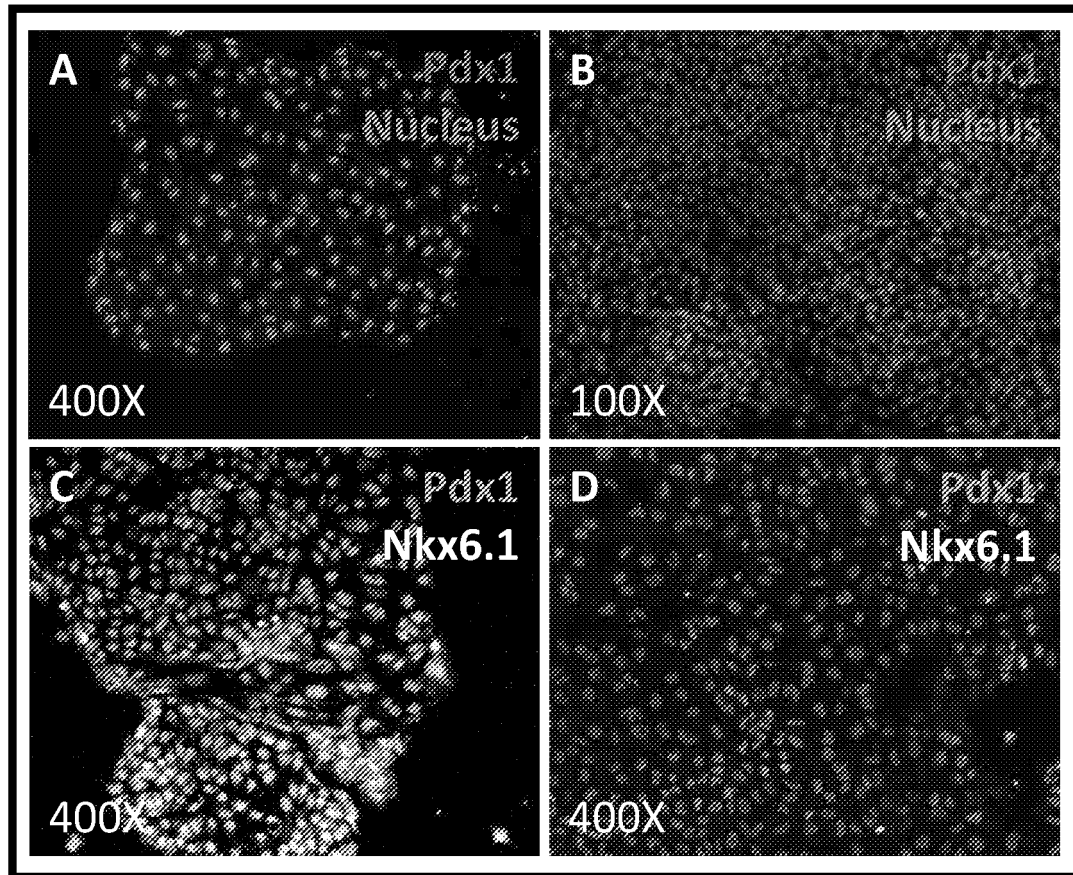
ФИГ.3



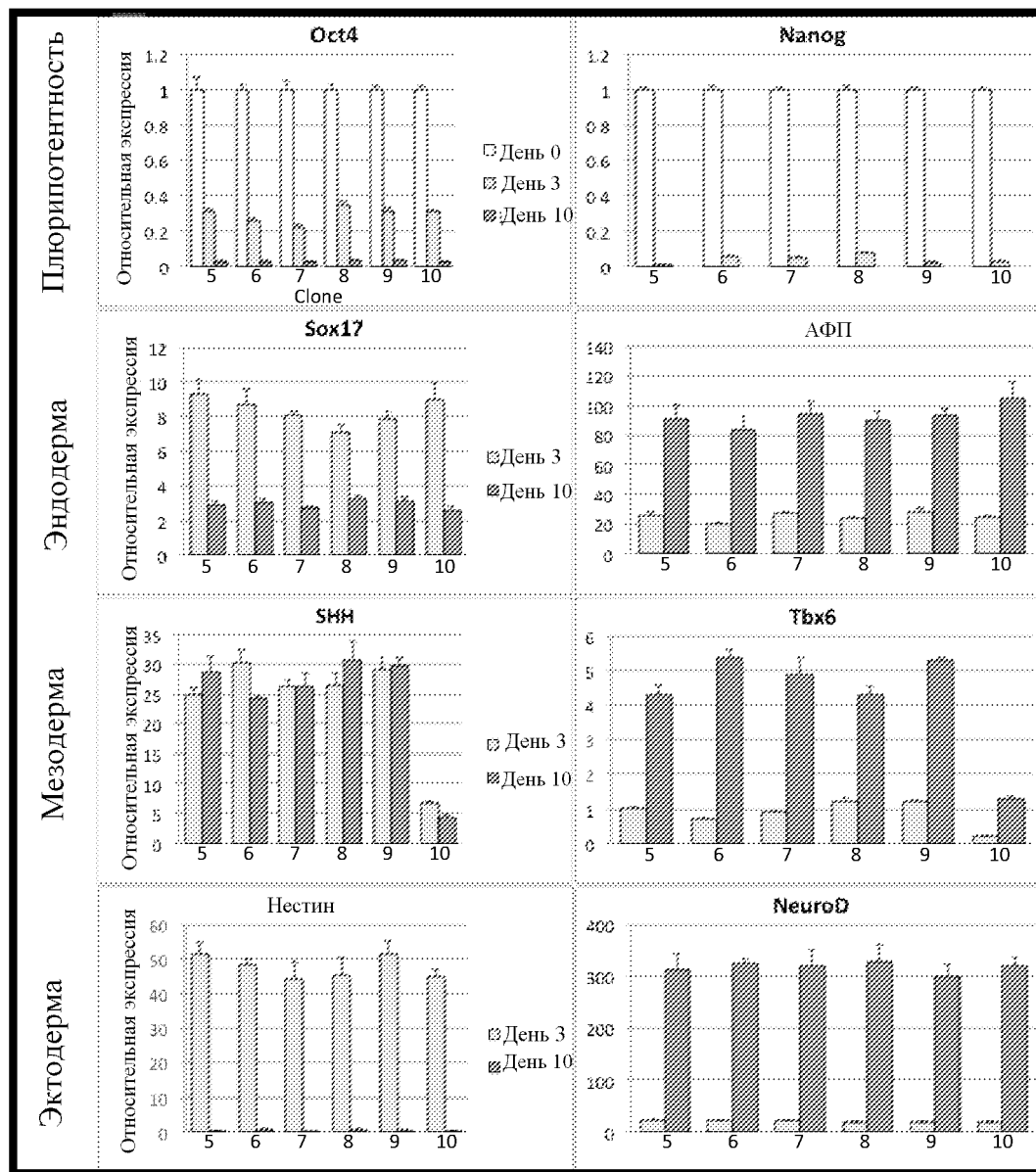
ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

