

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390412** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.03.29

(22) Дата подачи заявки
2021.07.30

(51) Int. Cl. *C12N 5/071* (2010.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/40 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

(54) **ОРГАНОИД МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) **2020-129498**

(32) **2020.07.30**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2021/028394**

(87) **WO 2022/025269 2022.02.03**

(71) Заявитель:

**РИКЕН; ОЦУКА
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (JP)**

(72) Изобретатель:

**Такасато Минору, Офудзи Кадзухиро,
Вимерш Филип Йос (JP)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Целью настоящего изобретения является создание органоида вентральной части задней кишки для получения органоида мочевого пузыря, который содержит слоистую структуру эпителиальных клеток мочевого пузыря различных типов, подобных мочевому пузырю. Одним из аспектов настоящего изобретения является способ получения органоида вентральной части задней кишки, включающий культивирование плюрипотентной стволовой клетки в индукторной среде А, содержащей активин А и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы, и культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза, а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза для образования органоида вентральной части задней кишки.

A1

202390412

202390412

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576900EA/071

ОРГАНОИД МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

Область техники

[0001]

Настоящее изобретение относится к органоиду вентральной части задней кишки, к органоиду мочевого пузыря или к способу их получения. Настоящее изобретение также относится к млекопитающему, не являющемуся человеком и содержащему органоид вентральной части задней кишки или мочевого пузыря в почке или в мочевом пузыре или в их периферической области, или к способу получения такого органоида. Настоящее изобретение относится к способу оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом в органоиде вентральной части задней кишки, в органоиде мочевого пузыря или у млекопитающего, не являющегося человеком. Настоящее изобретение также относится к регенеративной лекарственной композиции, содержащей органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря.

Предпосылки создания изобретения

[0002]

Мочевой пузырь является органом, происходящим от эмбриональной эндодермы и, как известно, он происходит от задней кишки, расположенной в самой задней части исходной кишечной трубки, проходящей через вентральную клоаку. Мочевой пузырь представляет собой мешкообразный орган, временно удерживающий мочу, которая доставляется из почки через мочеточник и выводится через мочеиспускательный канал. Функции мочевого пузыря по удержанию или выделению мочи могут снижаться или теряться при повреждении ткани мочевого пузыря при лучевой терапии, при разрыве мочевого пузыря, при диабете и т.п.

[0003]

Исследования в области регенеративной медицины проводятся с целью регенерации дисфункциональных органов, лечения трудноизлечимых заболеваний или компенсации хронической нехватки доноров для трансплантации органов. В технической области регенеративной медицины исследуются органоподобные клеточные агрегаты, называемые органоидами и генерируемые *in vitro* из плюрипотентных стволовых клеток, таких как ES-клетки или iPS-клетки.

[0004]

В непатентном документе 1 указывается, что эпителий мочевого пузыря индуцировали и дифференцировали путем культивирования мышинных ES-клеток *in vitro*. В непатентных документах 2-4 указывается, что эпителий мочевого пузыря индуцировали и дифференцировали путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток человека *in vitro*. В непатентном документе 5 указывается, что эпителий мочевого пузыря индуцировали и дифференцировали путем культивирования ES-клеток мыши в коллагеновой матрице *in vitro*, а затем их трансплантировали под почечную капсулу

мышь.

Список цитируемой литературы

[0005]

Непатентный документ 1: Mauney JR, et. al., All-Trans Retinoic Acid Directs Urothelial Specification of Murine Embryonic Stem Cells via GATA4/6 Signaling Mechanisms. PLoS One 2010, 5:e11513.

Непатентный документ 2: Osborn SL, et. al., Induction of human embryonic and induced pluripotent stem cells into urothelium. Stem Cells Transl Med 2014, 3:610-9.

Непатентный документ 3: Suzuki K, et. al., Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into mature stratified bladder urothelium. Sci Rep 2019, 9:1-13.

Непатентный документ 4: Kang M, et. al., Generation of Bladder Urothelium from Human Pluripotent Stem Cells under Chemically Defined Serum- and Feeder-Free System. Int J Mol Sci 2014, 15:7139-7157.

Непатентный документ 5: Ootamasathien S, et. al., Directed differentiation of embryonic stem cells into bladder tissue. Dev Biol 2007, 304:556-566.

Сущность изобретения

Техническая проблема

[0006]

Индукция дифференцировки эпителия мочевого пузыря, описанное в непатентных документах 1-4, не имитирует фактический процесс развития мочевого пузыря и не индуцирует дифференцировку в системе трехмерного культивирования. Эпителиальные органоиды мочевого пузыря, индуцированные и дифференцированные как описано в непатентных документах 1-4, не имеют слоистой структуры, присущей эпителиальным клеткам мочевого пузыря определенного типа, как это наблюдалось в мочевом пузыре. Эпителиальные органоиды мочевого пузыря, индуцированные и дифференцированные как описано в непатентном документе 5, не охарактеризованы с точки зрения трехслойной структуры, подобной структуре мочевого пузыря.

[0007]

Авторы настоящего изобретения исследовали различные условия для формирования органоидов мочевого пузыря из плюрипотентных стволовых клеток. Так, например, авторы настоящего изобретения исследовали условия для конструирования трехмерной системы культивирования, которая имитирует фактический процесс развития мочевого пузыря. Одной из целей настоящего изобретения является создание нового органоида вентральной части задней кишки для получения органоида мочевого пузыря со слоистой структурой эпителиальных клеток мочевого пузыря, подобной структуре мочевого пузыря. Одной из целей настоящего изобретения является создание нового органоида мочевого пузыря со слоистой структурой эпителиальных клеток мочевого пузыря, подобной структуре мочевого пузыря, или разработка способа его получения. Одной из целей настоящего изобретения является создание нового млекопитающего, не являющегося человеком и содержащего органоид вентральной части задней кишки или

мочевого пузыря в почке или в мочевом пузыре или в их периферической области, или разработка способа его создания. Одной из целей настоящего изобретения является создание новой регенеративной лекарственной композиции, которая содержит органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря. Одной из целей настоящего изобретения является разработка нового способа оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом в органоиде вентральной части задней кишки, в органоиде мочевого пузыря или у млекопитающего, не являющегося человеком.

Решение проблемы

[0008]

Настоящее изобретение включает следующие аспекты:

[Пункт A1]

Способ получения органоида вентральной части задней кишки, включающий:

культивирование плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой А, содержащей активин А и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы;

культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β , и затем их культивирование в геле внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в органоид задней кишки; и

культивирование органоида задней кишки в геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b2, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза с образованием органоида вентральной части задней кишки.

[Пункт A2] Органоид вентральной части задней кишки, экспрессирующий P63, CDX2, NOXA13 и KRT8, но не экспрессирующий SOX2.

[Пункт A2-1] Органоид вентральной части задней кишки, экспрессирующий P63, CDX2, NOXA13 и KRT8, но практически не экспрессирующий SOX2.

[Пункт A3] Органоид вентральной части задней кишки в соответствии с пунктом A2, где уровень экспрессии CDX2 в органоиде вентральной части задней кишки меньше, чем уровень экспрессии CDX2 в органоиде задней кишки, или CDX2 не экспрессируется в органоиде вентральной части задней кишки.

[Пункт A3-1] Органоид вентральной части задней кишки в соответствии с пунктом A2, где уровень экспрессии CDX2 в органоиде вентральной части задней кишки меньше, чем уровень экспрессии CDX2 в органоиде задней кишки, или CDX2 по существу не экспрессируется в органоиде вентральной части задней кишки.

[Пункт A4] Способ получения органоида мочевого пузыря, включающий культивирование органоида вентральной части задней кишки, полученного способом в соответствии с пунктом A1, или органоида вентральной части задней кишки в соответствии с пунктом A2 или пунктом A3, в геле внеклеточного матрикса с индукторной средой С, содержащей ретиноевую кислоту, фактор роста фибробластов и белок остеогенеза.

[0009]

[Пункт А5] Органоид мочевого пузыря, содержащий первый клеточный слой, локализованный вдоль самой внешней периферии органоида мочевого пузыря, где первый клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5; второй клеточный слой, локализованный внутри первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK2; и третий клеточный слой, локализованный внутри второго клеточного слоя, где третий клеточный слой содержит клетки, экспрессирующие UPK2, но не экспрессирующие P63.

[Пункт А5-1] Органоид мочевого пузыря, содержащий первый клеточный слой, локализованный вдоль самой внешней периферии органоида мочевого пузыря, где первый клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5; второй клеточный слой, локализованный внутри первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK2; и третий клеточный слой, локализованный внутри второго клеточного слоя, где третий клеточный слой содержит клетки, экспрессирующие UPK2, но практически не экспрессирующие P63.

[Пункт А6] Способ получения органоида мочевого пузыря, включающий введение органоида вентральной части задней кишки, полученного способом в соответствии с пунктом А1, или органоида вентральной части задней кишки, полученного способом в соответствии с пунктом А2 или пунктом А3, в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область человека или млекопитающего, не являющегося человеком.

[Пункт А7] Органоид мочевого пузыря, имеющий просвет, содержащий первый клеточный слой, локализованный вдоль самой внешней периферии органоида мочевого пузыря, где первый клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5; второй клеточный слой, локализованный внутри первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK2; и третий клеточный слой, локализованный внутри второго клеточного слоя и расположенный лицом к просвету, где третий клеточный слой содержит клетки, экспрессирующие UPK2, но не экспрессирующие P63.

[Пункт А7-1] Органоид мочевого пузыря, имеющий просвет, содержащий первый клеточный слой, локализованный вдоль самой внешней периферии органоида мочевого пузыря, где первый клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5; второй клеточный слой, локализованный внутри первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK2; и третий клеточный слой, локализованный внутри второго клеточного слоя и расположенный лицом к просвету, где третий клеточный слой содержит клетки, экспрессирующие UPK2, но практически не экспрессирующие P63.

[0010]

[Пункт А8] Способ создания млекопитающего, не являющегося человеком и содержащего органоид мочевого пузыря в почке или в мочевом пузыре или в их периферической области, где указанный способ включает введение органоида

вентральной части задней кишки, полученного способом в соответствии с пунктом А1, органоида вентральной части задней кишки в соответствии с пунктом А2, пунктом А2-1, пунктом А3 или пунктом А3-1, органоида мочевого пузыря, полученного способом в соответствии с пунктом А4 или пунктом А6, или органоида мочевого пузыря в соответствии с пунктом А5, пунктом А5-1, пунктом А7 или пунктом А7-1, в почку или мочевой пузырь или в их периферическую область млекопитающего, не являющегося человеком.

[Пункт А9]

Млекопитающее, не являющееся человеком и содержащее органоид вентральной части задней кишки, полученный способом в соответствии с пунктом А1, органоид вентральной части задней кишки в соответствии с пунктом А2, пунктом А2-1, пунктом А3 или пунктом А3-1, органоид мочевого пузыря, полученный способом в соответствии с пунктом А4 или пунктом А6, или органоид мочевого пузыря в соответствии с пунктом А5, пунктом А5-1, пунктом А7 или пунктом А7-1 в почке или в мочевом пузыре или в их периферической области.

[Пункт А10] Регенеративная лекарственная композиция для лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря, содержащая органоид вентральной части задней кишки, полученный способом в соответствии с пунктом А1, органоид вентральной части задней кишки в соответствии с пунктом А2, пунктом А2-1, пунктом А3 или пунктом А3-1, органоид мочевого пузыря, полученный способом в соответствии с пунктом А4 или пунктом А6, или органоид мочевого пузыря в соответствии с пунктом А5, пунктом А5-1, пунктом А7 или пунктом А7-1.

[Пункт А11] Способ оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом, включающий:

контактирование тестируемого вещества с органоидом вентральной части задней кишки, полученным способом в соответствии с пунктом А1, органоидом вентральной части задней кишки в соответствии с пунктом А2, пунктом А2-1, пунктом А3 или пунктом А3-1, органоидом мочевого пузыря, полученным способом в соответствии с пунктом А4 или пунктом А6, органоидом мочевого пузыря в соответствии с пунктом А5, пунктом А5-1, пунктом А7 или пунктом А7-1, или с млекопитающим, не являющимся человеком в соответствии с пунктом А9; и

оценку взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом в органоиде вентральной части задней кишки, в органоиде мочевого пузыря или у млекопитающего, не являющегося человеком.

[Пункт А12] Способ лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря, включающий введение органоида вентральной части задней кишки, полученного способом в соответствии с пунктом А1, органоида вентральной части задней кишки в соответствии с пунктом А2, пунктом А2-1, пунктом А3 или пунктом А3-1, органоида мочевого пузыря, полученного способом в соответствии с пунктом А4 или пунктом А6, или органоида мочевого пузыря в соответствии с пунктом А5, пунктом А5-1, пунктом А7

или пунктом А7-1 в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область млекопитающего, нуждающегося в этом.

[0011]

[Пункт В1]

Способ получения органоида вентральной части задней кишки, включающий:

культивирование плюрипотентной стволовой клетки с индукторной средой А, содержащей активин А и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы и

культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и, необязательно, дополнительно содержащей белок остеогенеза, а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза, с образованием органоида вентральной части задней кишки.

[Пункт В2]

Способ в соответствии с пунктом В1, где

образование органоида вентральной части задней кишки включает, после культивирования зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В с образованием органоида задней кишки и культивирование органоида задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В с образованием органоида вентральной части задней кишки,

индукторная среда В для образования органоида задней кишки содержит фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β , а индукторная среда В для образования органоида вентральной части задней кишки содержит фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза.

[Пункт В3]

Способ в соответствии с пунктом В1, где индукторная среда В для формирования органоида вентральной части задней кишки содержит фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза.

[Пункт В4]

Органоид вентральной части задней кишки, полученный способом в соответствии с любым из пунктов В1-В3.

[0012]

[Пункт В5]

Органоид вентральной части задней кишки, экспрессирующий маркер вентральной части задней кишки P63, экспрессирующий HOXA13 и CK8/KRT8, и практически не экспрессирующий маркер SOX2 дорсальной части задней кишки.

[Пункт В5-1]

Органоид вентральной части задней кишки, экспрессирующий маркер вентральной части задней кишки P63, экспрессирующий HOXA13 и CK8/KRT8, практически не экспрессирующий маркер дорсальной части задней кишки SOX2 и/или CDX2, или даже если SOX2 и/или CDX2 экспрессируются, то уровень экспрессии SOX2 и/или CDX2 ниже, чем уровень SOX2 и/или CDX2 в органоиде задней кишки.

[Пункт B6]

Органоид вентральной части задней кишки с просветом, экспрессирующий по меньшей мере один маркер вентральной части задней кишки, выбранный из группы, состоящей из P63, DN63, GATA3, ISL1 и SATB2, экспрессирующий по меньшей мере один маркер, выбранный из группы, состоящей из фосфо-Smad1/5/8, HOXA13, FOXA2, CK8/KRT8 и ECAD, и практически не экспрессирующий по меньшей мере один маркер дорсальной части задней кишки, выбранный из группы, состоящей из SOX2, T и CDX2.

[Пункт B7]

Способ получения органоида мочевого пузыря, включающий:

культивирование органоида вентральной части задней кишки, полученного способом в соответствии с любым из пунктов B1-B3, или органоида вентральной части задней кишки в соответствии с любым из пунктов B4-B6 в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной культурой C, содержащей ретиноевую кислоту, фактор роста фибробластов и белок остеогенеза;

введение органоида вентральной части задней кишки в почку или мочевой пузырь или в их периферическую область у человека или млекопитающего, не являющегося человеком; или

культивирование органоида вентральной части задней кишки в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток.

[Пункт B8] Органоид мочевого пузыря, полученный способом по пункту B7.

[0013]

[Пункт B9]

Органоид мочевого пузыря, содержащий:

первый клеточный слой, содержащий клетки, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и практически не экспрессируют P63; и

второй клеточный слой, локализованный снаружи от первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2;

где органоид мочевого пузыря может дополнительно содержать третий клеточный слой, локализованный снаружи от второго клеточного слоя, где третий клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5.

[Пункт B10]

Органоид мочевого пузыря в соответствии с пунктом B9, содержащий просвет, окруженный первым клеточным слоем.

[Пункт В11]

Органоид мочевого пузыря в соответствии с пунктом В9 или В10, содержащий четвертый клеточный слой, локализованный снаружи от третьего клеточного слоя, четвертый клеточный слой, содержащий клетки, подобные стромальным клеткам, и необязательно дополнительно содержащий пятый клеточный слой, локализованный снаружи от четвертого клеточного слоя, где пятый клеточный слой содержит клетки гладких мышц.

[Пункт В12]

Способ получения млекопитающего, не являющегося человеком и содержащего органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря в почке или мочевом пузыре или в их периферической области, где указанный способ включает введение органоида вентральной части задней кишки, полученного способом в соответствии с любым из пунктов В1-В3, органоида вентральной части задней кишки в соответствии с любым из пунктов В4-В6, органоида мочевого пузыря, полученного способом в соответствии с пунктом В7, или органоида мочевого пузыря в соответствии с любым из пунктов В8-В11, в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область у млекопитающего, не являющегося человеком.

[0014]

[Пункт В13]

Млекопитающее, не являющееся человеком и содержащее органоид вентральной части задней кишки, полученный способом в соответствии с любым из пунктов В1-В3, органоид вентральной части задней кишки в соответствии с любым из пунктов В4-В6, органоид мочевого пузыря, полученный способом в соответствии с пунктом В7, или органоид мочевого пузыря в соответствии с любым из пунктов В8-В11 в почке или в мочевом пузыре или в их периферической области.

[Пункт В14]

Регенеративная лекарственная композиция для лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря, содержащая органоид вентральной части задней кишки, полученный способом в соответствии с любым из пунктов В1-В3, органоид вентральной части задней кишки в соответствии с любым из пунктов В4-В6, органоид мочевого пузыря, полученный способом в соответствии с пунктом В7, или органоид мочевого пузыря в соответствии с любым из пунктов В8-В11.

[Пункт В15]

Способ оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом, включающий:

контактирование тестируемого вещества с органоидом вентральной части задней кишки, полученным способом в соответствии с любым из пунктов В1-В3, органоидом вентральной части задней кишки в соответствии с любым из пунктов В4-В6, органоидом мочевого пузыря, полученным способом в соответствии с пунктом В7, органоидом мочевого пузыря в соответствии с любым из пп. 8-11, у млекопитающего, не являющегося

человеком, и полученного способом в соответствии с пунктом В12, или у млекопитающего, не являющегося человеком, и полученного способом в соответствии с пунктом В13, и

оценку взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом в органоиде вентральной части задней кишки, в органоиде мочевого пузыря или у млекопитающего, не являющегося человеком.

[Пункт В16]

Способ лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря, включающий введение органоида вентральной части задней кишки, полученного способом в соответствии с любым из пунктов В1-В3, органоида вентральной части задней кишки в соответствии с любым из пунктов В4-В6, органоида мочевого пузыря, полученного способом в соответствии с пунктом В7, или органоида мочевого пузыря в соответствии с пунктами В8-В11, в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область у млекопитающего, нуждающегося в этом.

Краткое описание чертежей

[0015]

Фигура 1 представляет собой блок-схему, иллюстрирующую обзор получения органоидов мочевого пузыря в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.

Фигура 2a представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение SATB2 в кишечноподобных органоидах. Фигура 2b представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение CDX2 в кишечноподобных органоидах. Фигура 2c представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение ECAD в кишечноподобных органоидах. Фигура 2d представляет собой изображение окрашивания DAPI в кишечноподобных органоидах.

Фигура 3a представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение UPK2 в органоиде мочевого пузыря. Следует обратить внимание, что белые сигналы, наблюдаемые на самой внешней периферии органоида мочевого пузыря, указывают на неспецифические сигналы, полученные от Matrigel®. Фигура 3b представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение P63 в органоиде мочевого пузыря. Фигура 3c представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение KRT5 в органоиде мочевого пузыря. Фигура 3d представляет собой наложенное изображение, иллюстрирующее распределение UPK2, P63 и KRT5 в органоиде мочевого пузыря. Следует обратить внимание, что белые сигналы, наблюдаемые на самой внешней периферии органоида мочевого пузыря, являются неспецифическими сигналами, полученными от Матригеля. Фигура 3e представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение ECAD в органоиде мочевого пузыря. Фигура 3f представляет собой изображение окрашивания DAPI в органоиде мочевого пузыря.

Фигура 4a представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение UPK2 в клеточной структуре, индуцированное индукторной средой В и средой, которая

представляет собой индукторную среду С без BMP4. Следует обратить внимание, что белые сигналы, наблюдаемые на самой внешней периферии клеточной структуры, являются неспецифическими сигналами, полученными от Матригеля. Фигура 4b представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение P63 в клеточной структуре, индуцированное индукторной средой В и средой, которая представляет собой индукторную среду С без BMP4. Фигура 4c представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение ECAD в клеточной структуре, индуцированное индукторной средой В и средой, которая представляет собой индукторную среду С без BMP4. Фигура 4d представляет собой изображение окрашивания DAPI в клеточной структуре, индуцированного средой, которая является индукторной средой С без BMP4.

Фигура 5a представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение UPK2 в органоиде мочевого пузыря, введенном млекопитающему, не являющемуся человеком. Фигура 5b представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение P63 в органоиде мочевого пузыря, введенном млекопитающему, не являющемуся человеком. Фигура 5c представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение KRT5 в органоиде мочевого пузыря, введенном млекопитающему, не являющемуся человеком. Фигура 5d представляет собой изображение окрашивания DAPI в органоиде мочевого пузыря. Фигура 5e представляет собой наложенное изображение, иллюстрирующее распределение окрашивания P63, KRT5 и DAPI в органоиде мочевого пузыря, введенном млекопитающему, не являющемуся человеком. Фигура 5f представляет собой изображение, иллюстрирующее распределение окрашивания UPK2, P63 и DAPI в органоиде мочевого пузыря, введенном млекопитающему, не являющемуся человеком. Фигура 5g представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую слоистую структуру типов клеток в мочевом пузыре живого организма.

Фигура 6 представляет собой блок-схему, иллюстрирующую обзор получения органоида мочевого пузыря в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения.

Фигуры 7a1-a11 представляют собой флуоресцентные изображения органоидов задней кишки после индуцирования дифференцировки задней кишки на стадии b1 (11-й день после индуцирования дифференцировки). Фигуры 7b1-b11 представляют собой флуоресцентные изображения органоидов вентральной части задней кишки во время индуцирования дифференцировки вентральной части задней кишки на стадии b3 (11-й день после индуцирования дифференцировки). Фигуры 7a1 и 7b1 представляют собой изображения, иллюстрирующие распределение эпителиального маркера KRT8 в органоидах задней кишки и в органоидах вентральной части задней кишки, соответственно. Фигуры 7a2 и 7b2 представляют собой изображения, иллюстрирующие распределение вентрального маркера GATA3 в органоидах задней кишки и в органоидах вентральной части задней кишки, соответственно. Фигуры 7a3 и 7b3 представляют собой изображения, иллюстрирующие распределение маркера SOX2 дорсальной части задней кишки в органоидах задней кишки и органоидах вентральной части задней кишки,

соответственно. Фигуры 7a5 и 7b5 представляют собой изображения, иллюстрирующие распределение маркера CDX2 дорсальной части задней кишки в органоидах задней кишки и органоидах вентральной части задней кишки, соответственно. Фигуры 7a6 и 7b6 представляют собой изображения, иллюстрирующее распределение маркера SOX2 дорсальной части задней кишки в органоидах задней кишки и органоидах вентральной части задней кишки, соответственно. Фигуры 7a7 и 7b7 представляют собой изображения, иллюстрирующее распределение маркера T дорсальной части задней кишки в органоидах задней кишки и в органоидах вентральной части задней кишки, соответственно. Фигуры 7a9 и 7b9 представляют собой изображения, иллюстрирующее распределение кишечного маркера FOXA2 в органоидах задней кишки и в органоидах вентральной части задней кишки, соответственно. Фигуры 7a10 и 7b10 представляют собой флуоресцентные изображения, иллюстрирующее распределение эпителиального маркера ECAD в органоидах задней кишки и органоидах вентральной части задней кишки, соответственно. На фигурах 7a4, 7a8 и 7a11 представлены изображения окрашивания DAPI в органоидах задней кишки. Фигуры 7b4, 7b8 и 7b11 представляют собой изображения окрашивания DAPI в органоидах вентральной части задней кишки.

Фигуры 8a1 и 8a2 представляют собой флуоресцентные изображения, иллюстрирующие распределение маркеров дорсальной части задней кишки CDX2 и SOX2, соответственно, в органоидах вентральной части задней кишки во время индуцирования дифференцировки вентральной части задней кишки (14-й день после индуцирования дифференцировки). Фигура 8a3 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера вентральной части задней кишки GATA3. Фигура 8a4 представляет собой изображение окрашивания DAPI в органоидах вентральной части задней кишки. Фигура 8a5 представляет собой наложенное изображение окрашивания CDX2, SOX2, GATA3 и DAPI. Фигура 8b1 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение раннего эпителиального маркера кишечника FOXA2. Фигуры 8b2 и 8b3 представляют собой флуоресцентные изображения, иллюстрирующие распределение маркеров вентральной части задней кишки ΔNP63 и GATA3, соответственно, в органоидах вентральной части задней кишки. Фигура 8b4 представляет собой изображение окрашивания DAPI органоидов вентральной части задней кишки. Фигура 8b5 представляет собой наложенное изображение окрашивания FOXA2, ΔNP63, GATA3 и DAPI. Фигура 8c1 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение эпителиального маркера кишечника CK8. Фигура 8c2 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение вентрального маркера задней кишки SATB2. Фигура 8c3 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение апикального маркера плотного соединения ZO1. Фигура 8c4 представляет собой изображение окрашивания DAPI в органоидах вентральной части задней кишки. Фигура 8c5 представляет собой наложенное изображение окрашивания CK8, SATB2, ZO1 и DAPI. Фигура 8d1 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее

распределение маркера ISL1 вентральной части задней кишки. Фигура 8d2 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера вентральной части задней кишки и области клоаки, фосфо-Smad1/5/8. Фигура 8d3 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера эпителиальных клеток ECAD. На фигуре 8d4 показано окрашивание DAPI органоидов вентральной части задней кишки. Фигура 8d5 представляет собой наложенное изображение окрашивания ISL1, фосфо-Smad1/5/8, ECAD и DAPI. Фигура 8e1 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера вентральной части задней кишки GATA3. Фигура 8e2 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера SOX2 в дорсальной части задней кишки. Фигура 8e3 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера эпителиальных клеток мочевого пузыря UPK2. Фигура 8e4 представляет собой изображение окрашивания DAPI органоидов вентральной части задней кишки. Фигура 8e5 представляет собой наложенное изображение окрашивания GATA3, SOX2, UPK2 и DAPI. Фигура 8f1 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера CDX2 в дорсальной части задней кишки. Фигура 8f2 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера задней части кишечника HOXA13. Фигура 8f3 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера эпителиальных клеток мочевого пузыря KRT5. Фигура 8f4 представляет собой изображение DAPI-окрашивания органоидов вентральной части задней кишки. Фигура 8f5 представляет собой наложенное изображение окрашивания CDX2, HOXA13, KRT5 и DAPI.

На фигурах 9a-d представлены изображения органоидов мочевого пузыря в ярком поле во время индуцирования дифференцировки эпителия мочевого пузыря путем совместного культивирования органоидов вентральной части задней кишки и мезенхимальных клеток мочевого пузыря (20-й день после индуцирования дифференцировки).

Фигуры 10a1-a3 представляют собой флуоресцентные изображения, иллюстрирующие распределение маркеров эпителиальных клеток мочевого пузыря, UPK2, ANP63 и KRT5, соответственно, в органоиде мочевого пузыря во время индуцирования дифференцировки органоида мочевого пузыря (24-й день после индуцирования дифференцировки). Фигура 10a4 представляет собой изображение окрашивания DAPI в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10a5 представляет собой наложенное изображение окрашивания UPK2, ANP63, KRT5 и DAPI. Фигура 10b1 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера эпителиальных клеток ECAD в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10b2 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение hLNB1, предполагающее наличие клеток человеческого происхождения в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10b3 представляет собой флуоресцентное изображение,

иллюстрирующее распределение маркера мезенхимальных клеток VIM в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10b4 представляет собой изображение окрашивания DAPI в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10b5 представляет собой наложенное изображение окрашивания ECAD, hLNB1, VIM и DAPI. Фигура 10c1 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера эпителиальных клеток ECAD в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10c2 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера клеток гладких мышц α SMA в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10c3 представляет собой изображение окрашивания DAPI в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10c4 представляет собой наложенное изображение окрашивания ECAD, α SMA и DAPI. Фигура 10d1 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера развивающихся эпителиальных клеток мочевого пузыря FOXA2 в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10d2 представляет собой флуоресцентное изображение, иллюстрирующее распределение маркера эпителиальных клеток мочевого пузыря GATA3 в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10d3 представляет собой изображение окрашивания DAPI в органоиде мочевого пузыря. Фигура 10d4 представляет собой наложенное изображение окрашивания FOXA2, GATA3 и DAPI.

Фигуры 11a1 и 11b1 представляют собой флуоресцентные изображения, иллюстрирующие распределение UPK1B и UPK2 в органоидах мочевого пузыря во время индуцирования дифференцировки органоидов мочевого пузыря (42-й день после индуцирования дифференцировки), соответственно. Фигуры 11a2 и 11b2 представляют собой флуоресцентные изображения, иллюстрирующие распределение Δ NP63 в органоидах мочевого пузыря. Фигуры 11a3 и 11b3 представляют собой флуоресцентные изображения, иллюстрирующие распределение KRT5 в органоидах мочевого пузыря. Фигуры 11a4 и 11b4 представляют собой изображения окрашивания DAPI в органоидах мочевого пузыря. Фигура 11a5 представляет собой наложенное изображение окрашивания UPK1B, Δ NP63, KRT5 и DAPI. Фигура 11b5 представляет собой наложенное изображение окрашивания UPK2, Δ NP63, KRT5 и DAPI.

Описание вариантов осуществления изобретения

[0016]

[Органоид вентральной части задней кишки или способ его получения]

В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения органоида вентральной части задней кишки. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к органоиду вентральной части задней кишки.

[0017]

Используемый здесь термин «органоид» относится к трехмерному тканеподобному клеточному агрегату, образованному *in vitro*, или к клеточному агрегату, дополнительно культивируемому *in vivo*. Так, например, большинство клеток, образующих органоид, могут дифференцироваться и размножаться. В настоящем описании, органоид, экспрессирующий специфический маркер, относится к органоиду,

содержащему клетки, экспрессирующие специфический маркер в заранее определенном процентном соотношении. Заданный процент может составлять, например, не менее, чем 3%, не менее, чем 5%, не менее, чем 10% или не менее, чем 15% клеток, образующих органоид.

[0018]

Используемый здесь термин «по существу не экспрессирующий» специфический маркер означает, что уровень экспрессии специфического маркера является настолько низким, что он не может быть охарактеризован. В одном аспекте изобретения, органоид, «по существу не экспрессирующий» специфический маркер, может представлять собой органоид, в котором уровень экспрессии специфического маркера снижен до менее, чем 70%, менее, чем 80%, менее, чем 90% или менее, чем 95% по сравнению с уровнем экспрессии специфического маркера в сравниваемом органоиде. Так, например, уровни экспрессии маркеров могут быть оценены с помощью количественной ПЦР или иммунологического окрашивания. Уровень экспрессии маркера, оцениваемый с помощью количественной ПЦР, может, например, представлять собой уровень экспрессии мРНК, кодирующей заданный маркер. Уровень экспрессии маркера при иммунологическом окрашивании может, например, представлять собой интенсивность сигнала (например, интенсивность флуоресценции), полученную от вещества (например, флуоресцентного вещества), способного продуцировать сигнал, где указанное вещество прямо или опосредованно связано с антителом, связывающимся с заданным маркером. Вещество, способное генерировать сигнал и опосредованно связывающееся с антителом, связывающимся с желаемым маркером (первым антителом), может представлять собой, например, вещество, способное генерировать сигнал, и непосредственно связанное со вторым антителом, которое может связываться с первым антителом.

[0019]

В одном варианте осуществления изобретения, органоид вентральной части задней кишки, по существу не экспрессирующий SOX2, имеет сниженный уровень экспрессии SOX2 в органоиде задней кишки до менее, чем 70% по сравнению с уровнем экспрессии SOX2 в органоиде задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, органоид вентральной части задней кишки, по существу не экспрессирующий какой-либо из по меньшей мере одного (например, одного, двух или трех, а предпочтительно трех) маркера, выбранного из группы, состоящей из маркеров дорсальной части задней кишки SOX2, T и CDX2, имеет сниженный уровень маркера дорсальной части задней кишки в органоиде задней кишки менее, чем на 70% по сравнению с уровнем экспрессии соответствующего маркера в органоиде задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, органоид задней кишки представляет собой органоид задней кишки, образованный путем проведения Стадии А и Стадии b1 (например, Стадии А и Стадии b1 в Примерах), в которых были использованы плюрипотентные стволовые клетки такого же вида, как и клетки, образующие органоид вентральной части задней кишки.

[0020]

Используемый здесь термин «органойд вентральной части задней кишки» относится к органойду, который экспрессирует по меньшей мере один маркер вентральной части задней кишки согласно изобретению и практически не экспрессирует по меньшей мере один маркер дорсальной части задней кишки согласно изобретению, или даже если маркер дорсальной части задней кишки экспрессируется, то его уровень экспрессии ниже, чем уровень экспрессии в органойде задней кишки. Органойд вентральной части задней кишки может быть получен, например, способом получения органойда вентральной части задней кишки в соответствии с настоящим изобретением. Если получают органойд задней кишки, а затем органойд вентральной части задней кишки подвергают вентрализации с образованием органойда вентральной части задней кишки в соответствии со способом получения органойда вентральной части задней кишки, то органойд вентральной части задней кишки может упоминаться здесь как «вентрализованный органойд задней кишки». Органойды вентральной части задней кишки могут иметь большой диаметр не менее, чем 80 мкм, не менее, чем 100 мкм или не менее, чем 120 мкм. Так, например, органойды вентральной части задней кишки могут быть использованы для получения органойдов мочевого пузыря, описанных ниже. Так, например, органойды вентральной части задней кишки могут быть использованы для оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом. Так, например, органойды вентральной части задней кишки могут быть использованы в качестве активного ингредиента регенеративной лекарственной композиции в соответствии с настоящим изобретением.

[0021]

Органойд вентральной части задней кишки согласно варианту осуществления изобретения экспрессирует маркер P63 вентральной части задней кишки; экспрессирует HOXA13 и CK8/KRT8; и практически не экспрессирует маркер дорсальной части задней кишки SOX2. Органойд вентральной части задней кишки согласно варианту осуществления изобретения, экспрессирует маркер P63 вентральной части задней кишки; экспрессирует HOXA13 и CK8/KRT8; практически не экспрессирует маркер дорсальной части задней кишки SOX2; и практически не экспрессирует маркер дорсальной части задней кишки CDX2, или даже если CDX2 экспрессируется, то уровень его экспрессии ниже, чем уровень экспрессии CDX2 в органойде задней кишки. Органойд вентральной части задней кишки согласно варианту осуществления изобретения экспрессирует маркер P63 вентральной части задней кишки; экспрессирует HOXA13 и CK8/KRT8; и практически не экспрессирует маркер дорсальной части задней кишки SOX2 и/или CDX2, или даже если SOX2 и/или CDX2 экспрессируются, то уровень их экспрессии ниже, чем уровень экспрессии SOX2 и/или CDX2 в органойде задней кишки. Органойд вентральной части задней кишки в соответствии с вариантом осуществления изобретения дополнительно характеризуется более высоким уровнем экспрессии P63, чем в органойде задней кишки. Органойд вентральной части задней кишки в соответствии с вариантом осуществления изобретения дополнительно характеризуется тем, что отношение уровня

экспрессии CDX2 к уровню экспрессии P63 ниже, чем отношение уровня экспрессии CDX2 к уровню экспрессии P63 в органоиде задней кишки. Органоид вентральной части задней кишки согласно варианту осуществления изобретения дополнительно характеризуется тем, что в этом случае транскрибируется HOXA13.

[0022]

Органоид вентральной части задней кишки согласно варианту осуществления изобретения имеет просвет; экспрессирует по меньшей мере один маркер вентральной части задней кишки (например, одного вида, двух видов, трех видов или четырех видов или более), выбранный из группы, состоящей из P63, Δ N63, GATA3, ISL1 и SATB2; экспрессирует по меньшей мере один маркер (например, одного вида, двух видов, трех видов, четырех видов или пяти видов или более), выбранный из группы, состоящей из фосфо-Smad1/5/8, HOXA13, FOXA2, CK8/KRT8 и ECAD; по существу не экспрессирует по меньшей мере один маркер дорсальной части задней кишки (например, одного вида, двух видов или трех видов или более), выбранный из группы, состоящей из SOX2, T и CDX2. Органоид вентральной части задней кишки в соответствии с вариантом осуществления изобретения дополнительно содержит слой клеток, совместно экспрессирующих CK8/KRT8 и ZO1, где указанный слой обращен к вышеописанному просвету.

[0023]

Органоид вентральной части задней кишки согласно варианту осуществления изобретения имеет просвет; экспрессирует маркер вентральной части задней кишки GATA3; экспрессирует по меньшей мере один маркер (например, одного вида, двух видов или трех видов), выбранный из группы, состоящей из FOXA2, CK8/KRT8 и ECAD; и практически не экспрессирует по меньшей мере один маркер (например, одного вида, двух видов или трех видов, а предпочтительно трех видов), выбранный из группы, состоящей из SOX2, T и CDX2. Органоид вентральной части задней кишки экспрессирует, например, FOXA2, CK8/KRT8 и ECAD.

[0024]

Органоид вентральной части задней кишки согласно варианту осуществления изобретения имеет просвет; содержит слой клеток, совместно экспрессирующих CK8/KRT8 и ZO1, где указанный слой обращен к просвету; экспрессирует по меньшей мере один маркер вентральной части задней кишки (например, одного вида, двух видов или трех видов или более), выбранный из группы, состоящей из Δ N63, GATA3, ISL1 и SATB2; экспрессирует по меньшей мере один маркер (например, одного вида, двух видов, трех видов или четырех видов или более), выбранный из группы, состоящей из фосфо-Smad1/5/8, HOXA13, CK8/KRT8, FOXA2 и ECAD; и практически не экспрессирует маркер по меньшей мере одного вида (например, одного вида, двух видов или трех видов, а предпочтительно трех видов), выбранный из группы, состоящей из SOX2, T и CDX2. Органоид вентральной части задней кишки предпочтительно экспрессирует GATA3. Органоид вентральной части задней кишки дополнительно экспрессирует, например,

$\Delta N63$, ISL1 и SATB2. Органоид ventральной части задней кишки дополнительно экспрессирует, например, фосфо-Smad1/5/8, HOXA13, CK8/KRT8, FOXA2 и ECAD.

[0025]

Используемый здесь термин «просвет» относится к внутреннему пространству трубчатой или мешковидной клеточной структуры. Просвет может быть, например, заполнен жидкостью. В одном варианте осуществления изобретения, просвет органоида мочевого пузыря представляет собой внутреннее пространство мешкообразной клеточной структуры.

[0026]

Термин «P63», если он относится к органоиду ventральной части задней кишки, означает гомолог гена-супрессора опухоли P53 и белок, участвующий в дифференцировке, пролиферации и сохранении эпителия. P63 может быть использован в качестве маркера эпителиальных клеток мочевого пузыря или маркера ventральной части задней кишки/клоаки. P63, экспрессируемый в клетках или в органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против P63 (например, кроличьим моноклональным антителом против P63 (EPR5701)).

[0027]

Используемый здесь термин « $\Delta N P63$ » относится к изоформе p63, в которой отсутствует N-концевой трансактивирующий домен (TN). $\Delta N P63$ может быть использован в качестве маркера эпителиальных клеток мочевого пузыря или маркера ventральной части задней кишки. $\Delta N P63$, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, с помощью иммунологического окрашивания антителом против $\Delta N P63$ (например, кроличьим антителом против $\Delta N P63$ (Cell signaling, #67825)).

[0028]

Используемый здесь термин «GATA3» относится к фактору транскрипции, который связывается с последовательностью ДНК-мишени, состоящей из «GATA» ДНК, и регулирует включение/выключение гена. GATA3 может быть использован в качестве маркера ventральной части задней кишки или маркера эпителиальных клеток мочевого пузыря. GATA3, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против GATA3 (например, козым антителом против GATA3 (R&D Systems, #AF2605)).

[0029]

Используемый здесь термин «UPK1B» относится к мембранному гликопротеину, участвующему в образовании переходных клеток с эпителиальным покрытием, которые образуют уроэпителий в системе мочевыводящих путей вместе с уроплакином Ia, II и III и усиливают проницаемость и барьерную функцию клеток с покрытием. UPK1B может быть использован в качестве маркера эпителия мочевого пузыря или маркера эпителиальной ткани. UPK1B, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом

против UPK1B (моноклональным мышинным антителом против UPK1B (клоном 1E1) (Sigma-Aldrich, #WH0007348M2).

[0030]

Используемый здесь термин «ISL1» относится к фактору транскрипции с гомеодоменом LIM, который действует на область регуляции экспрессии гена инсулина. ISL1 может быть использован в качестве маркера вентральной части задней кишки. ISL1, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против ISL1 (мышинным антителом против ISL1&2 (DSHB, #39.4D5)).

[0031]

Используемый здесь термин «SATB2» относится к ДНК-связывающему белку, который связывается с АТ-богатой последовательностью. SATB2 может быть использован в качестве маркера толстой или прямой кишки или маркера вентральной части задней кишки. SATB2, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против SATB2 (кроличьим антителом против SATB2 (CELL MARQUE, #384R-14)).

[0032]

Используемый здесь термин «CDX2» относится к белку гомеобокса, кодируемому геном CDX2. CDX2 может быть использован в качестве маркера средней/задней кишки. CDX2, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против CDX2 (например, мышинным моноклональным антителом против CDX2 (CX2-88)).

[0033]

Используемый здесь термин «SOX2» относится к фактору транскрипции, необходимому для поддержания самообновления недифференцированных ES-клеток, и также называется SRY ((областью Y, определяющей пол) боксом 2). SOX2 может быть использован в качестве маркера дорсальной части задней кишки или маркера линии дифференцировки легких и желудка. Экспрессия SOX2 в клетках или в органоидах может быть обнаружена или оценена, например, с помощью иммунологического окрашивания антителом против SOX2 (например, поликлональным козым антителом против SOX2 (R&D Systems, #AF2018)).

[0034]

Используемый здесь термин «Т» относится к фактору транскрипции, который связывается с последовательностью ДНК, называемой палиндромным Т-сайтом, посредством N-концевой области, называемой Т-боксом, и влияет на транскрипцию генов, необходимых для образования и дифференцировки мезодермы, и также называется фактором транскрипции Т-бокса Т (ТВХТ). Т, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, с помощью иммунологического окрашивания анти-Т антителом (например, козым антителом против Т/Brachyury (R&D Systems, #AF2085)).

[0035]

Используемый здесь термин «ZO1» относится к мембранному фосфопротеину, экспрессируемому в области плотного соединения эпителиальных и эндотелиальных клеток. ZO1 может быть использован в качестве маркера плотного соединения. Экспрессия ZO1 в клетках или в органоидах может быть обнаружена или оценена, например, с помощью иммунологического окрашивания антителом против ZO1 (козьим антителом против ZO1 (ThermoFisher, #PA5-19090)).

[0036]

Используемый здесь термин «цитокератин 8 (KRT8 или CK8)» относится к подтипу белка кератина с молекулярной массой приблизительно 45 кД, экспрессируемого в миепителиальных клетках и базальных клетках мембраны. CK8/KRT8 может быть использован в качестве маркера кишечного эпителия. CK8/KRT8, экспрессированные в клетках или органоидах, могут быть обнаружены или оценены, например, с помощью иммунологического окрашивания крысиным моноклональным антителом против цитокератина-8 (TROMA-1).

[0037]

Используемый здесь термин «FOXA2» относится к фактору транскрипции, который играет важную роль на стадиях развития, и представляет собой аббревиатуру для обозначения белка вильчатого бокса A2. FOXA2 может быть использован в качестве раннего маркера эпителия кишечника или маркера развивающихся эпителиальных клеток мочевого пузыря. FOXA2 может быть обнаружен или оценен, например, с помощью иммунологического окрашивания антителом против FOXA2 (мышиним антителом против FOXA2 (Santa Cruz Biotechnology, #sc-101060)).

[0038]

Используемый здесь термин «ECAD» относится к трансмембранному гликопротеину, который присутствует на клеточной поверхности и участвует в клеточной адгезии, и также называется эпителиальным кадгеринном. ECAD может быть использован в качестве маркера эпителиальной ткани. ECAD, экспрессируемый в клетках или в органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против ECAD (например, козьим антителом против ECAD (R&D SYSTEMS, #AF648)).

[0039]

Используемый здесь термин «НОХА13» относится к белку гомеобокса, кодируемому геном НОХА13 у человека. НОХА13, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, с помощью количественной ПЦР.

[0040]

Используемый здесь термин «фосфо-Smad1/5/8» относится к факторам транскрипции, которые играют важную роль во внутриклеточном сигнальном пути TGF-β. Фосфо-Smad1/5/8 может быть использован в качестве маркера вентральной части задней

кишки и области клоаки. Фосфо-Smad1/5/8, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против smad1/5/8 (например, кроличьим антителом против pSmad1/5/8 (Cell signaling, #13820)).

[0041]

Органоид вентральной части задней кишки в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения может быть получен способом, включающим Стадию А, то есть, культивирование плюрипотентной стволовой клетки с индукторной средой А, содержащей активин А и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы, и Стадию В, то есть, культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза, с последующим их культивированием в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза для образования органоида вентральной части задней кишки.

[0042]

В одном из вариантов осуществления изобретения, Стадия В включает Стадию b1, то есть, культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β (в индукторной среде b), с последующим их культивированием в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В (индукторной средой b1) для образования органоида задней кишки, и Стадию b2, то есть, культивирование органоида задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (с индукторной средой b2) для образования органоида вентральной части задней кишки. В одном из вариантов осуществления изобретения, Стадия В включает Стадию b3, то есть, культивирование зрелых клеток эндодермы в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза (индукторная среда b), с последующим их культивированием в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b3), для образования органоида вентральной части задней кишки.

[0043]

Органоид вентральной части задней кишки в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения может быть получен способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой А для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы, Стадию b1, то есть, культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β (индукторной средой b), с последующим их

культивированием в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В (индукторной средой b1) с образованием органоида задней кишки, и Стадию b2, то есть, культивирование органоида задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (с индукторной средой b2) для образования органоида вентральной части задней кишки.

[0044]

Органоид вентральной части задней кишки в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения может быть получен способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой А, содержащей активин А и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы, и Стадию b3: культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β , и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза (с индукторной средой b), с последующим их культивированием в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (с индукторной средой b3) для образования органоида вентральной части задней кишки.

[0045]

Стадия А: Индуцирование дифференцировки в зрелые клетки эндодермы

Стадия А включает культивирование плюрипотентной стволовой клетки с индукторной средой А, содержащей активин А и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы.

[0046]

Используемый здесь термин «плюрипотентная стволовая клетка» относится к стволовой клетке, способной дифференцироваться в ткани, происходящие из трех зародышевых слоев (эктодермы, мезодермы и эндодермы), то есть, к стволовой клетке, обладающей плюрипотентностью, и эта клетка может быть культивирована *in vitro*. Плюрипотентные стволовые клетки могут быть получены, например, из оплодотворенных яйцеклеток, клонированных эмбрионов, стволовых клеток зародышевой линии или стволовых клеток в тканях. В одном варианте осуществления изобретения, плюрипотентные стволовые клетки представляют собой эмбриональные стволовые клетки (ES-клетки), сконструированные плюрипотентные стволовые клетки, индуцированные из соматических клеток (iPS-клетки), эмбриональные клетки карциномы (EC-клетки) или эмбриональные зародышевые клетки (EG-клетки). Плюрипотентные стволовые клетки предпочтительно представляют собой ES-клетки или iPS-клетки.

[0047]

Используемый здесь термин «ES-клетка» относится к плюрипотентной стволовой клетке, происходящей из раннего эмбриона, способной к саморепликации и являющейся плюрипотентной. В одном варианте осуществления изобретения, ES-клетки представляют

собой ES-клетки человека.

[0048]

Используемый здесь термин «iPS-клетка» относится к плюрипотентной стволовой клетке, индуцированной из соматической клетки, сконструированной путем инициализации соматической клетки, чтобы сообщить плюрипотентность, напоминающую плюрипотентность эмбриональных стволовых клеток. iPS-клетки могут быть созданы, например, путем инициализации дифференцированных клеток, таких как фибробласты, в которых экспрессируются такие гены, как Oct3/4, Sox2, Klf4 и Msc. В одном варианте осуществления изобретения, iPS-клетки представляют собой iPS-клетки человека, созданные путем инициализации дифференцированных клеток человека, таких как фибробласты.

[0049]

«Индукторная среда А» включает базальную среду и дополнительные агенты, содержащие активин А и ингибитор GSK3 β . Так, например, индукторная среда А может быть получена путем добавления добавок (твердых или жидких) к базальной среде (жидкой). Концентрации дополнительных агентов, добавляемых в индукторную среду А, должны соответствующим образом регулироваться специалистом в данной области с учетом видов животных, у которых берут клетки для культивирования. «Базальная среда» может представлять собой среду для культивирования клеток, приготовленную в соответствии с известными протоколами, или имеющуюся в продаже среду для культивирования клеток. Базальной средой может быть, например, модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (DMEM), минимальная поддерживающая среда (MEM), базальная среда Игла (BME), любая известная среда для стволовых клеток или любая известная среда для дифференцировки стволовых клеток. Базальная среда предпочтительно представляет собой среду для дифференцировки стволовых клеток, например, среду STEMdiff APEL2 (STEMCELL Technologies). Культуральная среда для дифференцировки стволовых клеток может быть приготовлена, например, согласно Nature Protocols, vol.3, No.5, pp. 768-776, 2008. Индукторная среда А может дополнительно содержать среду, не содержащую белков (например, PFHM-II), антибиотики (например, пенициллин/стрептомицин, гентамицин) или смесь, содержащую антибиотики-противогрибковые средства (например, антибиотики-фунгициды) или их комбинацию.

[0050]

Используемый здесь термин «активин А» относится к фактору, принадлежащему к суперсемейству TGF β , и представляет собой белок, который способствует секреции фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) передней долей гипофиза. Активин А выполняет различные функции, а именно, регулирует дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и канцерогенез клеток. Индукторная среда А может содержать активин А, например, в количестве 10-500 нг/мл, 30-250 нг/мл или 50-150 нг/мл.

[0051]

Используемый здесь термин «ингибитор GSK3 β » относится к соединению, которое

ингибирует действие серин-треониновой протеинкиназы β , участвующей в различных сигнальных путях, включая путь wnt/ β -катенин. Ингибитором GSK3 β может быть, например, CHIR-99021, SB216763, CHIR-98014, стауроспорин, K252A, WNT (предпочтительно WNT3A) или TWS119 или их комбинация. Ингибитор GSK3 β предпочтительно представляет собой CHIR-99021 или WNT (предпочтительно WNT3A). Индукторная среда А может содержать ингибитор GSK3 β в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и эффект, оказываемый CHIR-99021 при концентрации 0,1-5 мкМ, 0,3-2,5 мкМ или 0,5-1,5 мкМ. «GSK3 β -ингибирующая активность» может быть оценена, например, на основе транскрипционной активности путем переноса β -катенина в ядро в присутствии заданного количества ингибитора GSK3 β . Транскрипционная активность путем переноса β -катенина в ядро может быть оценена известными способами (например, с помощью анализа на люциферазную активность). Транскрипционная активность путем переноса β -катенина в ядро может быть оценена, например, с помощью имеющихся в продаже наборов (например, набора для проведения анализа на репортер Wnt LEADING LIGHT®). Используемый здесь термин «эффект в той же степени» относится к эффекту в пределах $\pm 30\%$, $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$ по сравнению с эффектом, служащим в качестве контроля. В одном варианте осуществления изобретения, эффект в той же степени представляет собой эффект в пределах $\pm 30\%$ по сравнению с эффектом, служащим в качестве контроля.

[0052]

Индукторная среда А может содержать ингибитор GSK3 β (предпочтительно CHIR-99021) в концентрации 0,1-5 мкМ, 0,3-2,5 мкМ или 0,5-1,5 мкМ. Индукторная среда А может содержать ингибитор GSK3 β в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и эффект, оказываемый CHIR-99021 в концентрации 0,1-5 мкМ, 0,3-2,5 мкМ или 0,5-1,5 мкМ. Индукторная среда А может содержать WNT (предпочтительно WNT3A) в качестве ингибитора GSK3 β в концентрации 0,2-200 нг/мл, 10-100 нг/мл или 2-20 нг/мл. Если индукторная среда А содержит WNT (предпочтительно WNT3A) в качестве ингибитора GSK3 β , то индукторная среда А может содержать WNT (предпочтительно WNT3A) в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и эффект, оказываемый CHIR-99021 в концентрации 0,1-5 мкМ, 0,3-2,5 мкМ или 0,5-1,5 мкМ.

[0053]

Описанная ниже индукторная среда b2 может содержать ингибитор GSK3 β в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и эффект, оказываемый CHIR-99021 в концентрации 1-50 мкМ, 3-25 мкМ или 5-15 мкМ. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b2 может содержать 2-2000 нг/мл, 100-1000 нг/мл или 20-200 нг/мл WNT (предпочтительно WNT3A). Индукторная среда b3, описанная ниже, может содержать ингибитор GSK3 β в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и эффект, оказываемый CHIR-99021 в концентрации 0,5-25 мкМ, 1-15 мкМ или 2-8 мкМ. В

одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b3 может содержать 1-1000 нг/мл, 50-500 нг/мл или 10-100 нг/мл WNT (предпочтительно WNT3A).

[0054]

Культивирование плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой A может быть проведено в известных условиях культивирования клеток. Известные условия культивирования клеток могут заключаться в хранении при 37°C при 5% CO₂. Температура для культивирования не ограничивается 37°C, и может быть использована любая температура, известная специалистам в области культивирования клеток. Концентрация CO₂ не ограничивается 5%, и может быть использована любая концентрация CO₂, известная специалистам в области культивирования клеток. Культивирование плюрипотентных стволовых клеток может быть проведено в течение 2-5 дней, 2-4 дней или трех дней.

[0055]

«Зрелые клетки эндодермы» могут быть индуцированы путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой A, содержащей активин A и ингибитор GSK3β.

[0056]

Плюрипотентные стволовые клетки, культивируемые в индукторной среде A, могут быть предварительно культивированы в любой известной среде для стволовых клеток. Такие плюрипотентные стволовые клетки могут быть предварительно культивированы, например, со средой StemFit AK02N (REPROCELL) в сосуде для культивирования клеток, покрытом iMatrix-511. Предварительно культивированные плюрипотентные стволовые клетки можно отделить от сосуда для культивирования клеток известными способами или с помощью имеющихся в продаже реагентов (например, TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific)). Очищенные клетки могут быть суспендированы в культуральной среде (например, StemFit AK02N (10 мкМ Y-27632) с добавлением iMatrix-511 (ippi) в конечной концентрации 0,25 мкг/см²).

[0057]

В одном варианте осуществления изобретения, культивирование плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой A включает посев суспензии предварительно культивированных плюрипотентных стволовых клеток (например, клеток iPS или ES человека) в концентрации 30000-90000 клеток/см² на 6-луночный планшет и культивирование их при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение одного дня. Затем, среду заменяют на индукторную среду A, среду STEMdiff APEL2 (STEMCELL Technologies) (с добавлением 100 нг/мл активина A, 1-1,25 мкМ CHIR99021, 2% PFHM-II и антибиотика-фунгицида) и инкубируют в течение 3-5 дней. Культивирование индуцирует дифференцировку эмбриональной эндодермы. Затем, через 2 дня, среду заменяют, например, ежедневно. При этом, желательно проверить, экспрессируют ли клетки маркеры эмбриональной эндодермы FOXA2 и SOX17. Слишком длительный срок для индуцирования эмбриональной эндодермы может иметь тенденцию к увеличению доли

клеток клона передней кишки (ALB+, AFP+, PDX1+), участвующих в последующем процессе индуцирования задней кишки (постериоризация). Следовательно, предпочтительно скорректировать время индуцирования эмбриональной эндодермы для экспрессии FOXA2 и SOX17 и для уменьшения большей части клеток линии дифференцировки передней кишки, участвующих в последующем процессе индуцирования задней кишки. Плотность засеянных клеток предпочтительно выбрать так, чтобы клетки колониеподобной популяции распространялись наружу на 2-й день после индуцирования дифференцировки и достигали 100% конфлюэнтности в пластинчатой форме на 3-й день после индуцирования дифференцировки. Кроме того, предпочтительно выбрать условия, подходящие для получения плавающих сфероидов в максимальном количестве во время индуцирования задней кишки. Низкая или высокая плотность клеток может приводить к тому, что в результате будет сложнее получить плавающие сфероиды.

[0058]

Стадия b1: Индуцирование дифференцировки задней кишки

Стадия b1 включает культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β (индукторная среда b), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β (индукторная среда b1) с образованием органоида задней кишки.

[0059]

«Индукторная среда В» включает базальную среду и дополнительные агенты, включающие фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащие белок остеогенеза. Индукторная среда В согласно варианту осуществления изобретения содержит базальную среду и дополнительные агенты, содержащие фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β , и используется для образования сфероида из зрелых клеток эндодермы. Индукторная среда В, используемая для образования сфероидов, также может упоминаться здесь как «индукторная среда b». Индукторная среда В согласно варианту осуществления изобретения содержит базальную среду и дополнительные агенты, содержащие фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β , и используется для образования органоида задней кишки. Индукторная среда В, используемая для образования органоида задней кишки из сфероидов, также упоминается здесь как «индукторная среда b1». Индукторная среда В, используемая для образования, из органоида задней кишки, органоида вентральной части задней кишки, описанного ниже, также упоминается здесь как «индукторная среда b2». Индукторная среда В, используемая для образования, из зрелых клеток эндодермы или сфероидов, органоида вентральной части задней кишки, описанного ниже, также упоминается здесь как «индукторная среда b3».

[0060]

Индукторная среда В может быть приготовлена, например, путем добавления добавок (твердых или жидких) к базальной среде (жидкой). Определение базальной среды

для индукторной среды А применимо и к базальной среде для индукторной среды В. Концентрации добавок, добавляемых к индукторной среде В, соответствующим образом регулируются специалистом в данной области с учетом видов животных, от которых берут клетки, используемые для культивирования. Индукторная среда В может дополнительно содержать среду, не содержащую белков (например, PFHM-II), антибиотики (например, пенициллин/стрептомицин, гентамицин) или смесь, содержащую антибиотики-противогрибковые средства (например, антибиотики-фунгициды) или их комбинацию.

[0061]

«Индукторная среда b» или «индукторная среда b1» включает базальную среду и дополнительные агенты, содержащие FGF и ингибитор GSK3 β . Индукторная среда b или b1 может быть приготовлена, например, путем добавления добавок (твердых или жидких) к базальной среде (жидкой). Определение базальной среды для индукторной среды А соответственно применимо и к базальной среде для индукторной среды b или b1. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b или b1 содержит фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β и по существу не содержит белок остеогенеза. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b или b1, практически не содержащая белок остеогенеза, полностью не содержит белок остеогенеза. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b, по существу не содержащая белок остеогенеза, может содержать белок остеогенеза в концентрации, которая не ингибирует образование сфероида из зрелых клеток эндодермы, и, например, может содержать белок остеогенеза в концентрации менее 1 нг/мл, менее 0,5 нг/мл или менее 0,1 нг/мл. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b1, по существу не содержащая белок остеогенеза, может содержать белок остеогенеза в концентрации, которая не ингибирует образование органоида задней кишки из сфероида зрелых клеток эндодермы, и, например, может содержать белок остеогенеза в концентрации менее, чем 1 нг/мл, менее, чем 0,5 нг/мл или менее, чем 0,1 нг/мл.

[0062]

Используемый здесь термин «фактор роста фибробластов (FGF)» здесь относится к белку с молекулярной массой 16000-20000, который способствует пролиферации фибробластов или эндотелиальных клеток. Так, например, FGF (например, FGF4) добавляют к индукторной среде В для подавления контаминации клетками, происходящими от передней эндодермы. Так, например, FGF (например, FGF4) добавляют в индукторную среду В с образованием сфероида задней кишки. FGF может представлять собой, например, FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF5, FGF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22 или FGF23 или их комбинацию. FGF предпочтительно представляет собой FGF4 или FGF7 или их комбинацию.

[0063]

Индукторная среда b или b1 может содержать FGF (предпочтительно FGF4) в

концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. Индукторная среда b или b1 может содержать FGF7 в концентрации 10-500 нг/мл, 30-250 нг/мл или 50-150 нг/мл или FGF4 в концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. Индукторная среда b или b1 содержит FGF в концентрации, вызывающей подавление экспрессии маркера клеток передней эндодермы (например, маркера печеночной линии дифференцировки ALB, маркера линии дифференцировки поджелудочной железы PDX1 или маркера линии дифференцировки легкого и желудка SOX2), сравнимой с экспрессией в клетках или в органоидах, культивируемых с индукторной средой b или b1, содержащей FGF4 в концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. В этом контексте, клетки, культивируемые в индукторной среде b, могут представлять собой зрелые клетки эндодермы, индуцированные и дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток в стадии A в соответствии с настоящим изобретением. В этом контексте, клетки, культивируемые в индукторной среде b1, могут представлять собой сфероиды, образованные из зрелых клеток эндодермы на стадии b1 согласно настоящему изобретению. Экспрессия маркера клеток передней эндодермы может быть оценена, например, с помощью иммунологического окрашивания. В методе иммунологического окрашивания, экспрессия маркера клеток передней эндодермы может быть оценена, например, с помощью имеющегося в продаже антитела. Используемый здесь термин «подавление экспрессии в той же степени» относится к уровню экспрессии в пределах $\pm 30\%$, $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$ по сравнению с уровнем экспрессии, служащим в качестве контроля. В одном варианте осуществления изобретения, сравниваемым эффектом является уровень экспрессии в пределах $\pm 30\%$.

[0064]

Используемый здесь термин «ALB» относится к альбумину, то есть, к белку, состоящему приблизительно из 600 аминокислот с молекулярной массой приблизительно 66000. ALB может быть использован, например, в качестве маркера линии дифференцировки печени. ALB, экспрессируемые в клетках или в органоидах, могут быть обнаружены или оценены, например, путем иммунологического окрашивания антителом против альбумина.

[0065]

Используемый здесь термин «фактор-1 гомеобокса поджелудочной железы и двенадцатиперстной кишки (PDX1)» относится к гомеодоменному белку, который связывается с промоторной областью гена инсулина и участвует в специфической экспрессии гена инсулина в бета-клетках поджелудочной железы. PDX1 может быть использован, например, в качестве маркера линии дифференцировки поджелудочной железы. PDX1, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, с помощью иммунологического окрашивания антителом против PDX1.

[0066]

Индукторная среда b или b1 может содержать FGF в концентрации, влияющей на пролиферацию фибробластов в той же степени, что и эффект, оказываемый FGF4 в

концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. «Эффект, оказывающий влияние на пролиферацию фибробластов» может быть оценен, например, по количеству [³H]тимидина, поглощаемого фибробластами из внеклеточной части во внутриклеточную часть в присутствии заданного количества FGF.

Фибробласты могут представлять собой, например, мышечные фибробласты NR6R-3T3. Количество тимидина, перешедшего из внеклеточной части во внутриклеточную часть, может быть определено известными способами (например, способом, описанным в *Methods in Enzymology*, Volume 109, 1985, Pages 749-773).

[0067]

В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b или b1 содержит FGF в концентрации, оказывающей влияние на пролиферацию фибробластов в той же степени, что и эффект, сообщаемый FGF4 в концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл.

[0068]

Индукторная среда b или b1 может содержать ингибитор GSK3 β (предпочтительно CHIR-99021) в концентрации 1-50 мкМ, 3-25 мкМ, 5-10 мкМ, 0,5-16 мкМ, 3-12 мкМ или 6-10 мкМ. Индукторная среда b или b1 может содержать WNT (предпочтительно WNT3A) в концентрации 2-2000 нг/мл, 100-1000 нг/мл или 20-200 нг/мл. Индукторная среда b или b1 может содержать ингибитор GSK3 β в концентрации 1-50 мкМ, 3-25 мкМ, 5-10 мкМ, 0,5-16 мкМ, 3-12 мкМ или 6-10 мкМ или в концентрации, вызывающей ингибирование GSK3 β в той же степени, что и эффект, оказываемый CHIR-99021 в концентрации 0,1-5 мкМ, 0,3-2,5 мкМ или 0,5-1,5 мкМ. Если индукторная среда b или b1 содержит WNT (предпочтительно WNT3A) в качестве ингибитора GSK3 β , то индукторная среда b3 содержит WNT (предпочтительно WNT3A) в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и эффект, проявляемый CHIR-99021 в концентрации 1-50 мкМ, 3-25 мкМ, 5-10 мкМ, 0,5-16 мкМ, 3-12 мкМ или 6-10 мкМ.

[0069]

Компоненты и/или дозы индукторной среды b могут быть такими же, как и в случае индукторной среды b1, или отличаться от них. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b имеет такие же компоненты и/или дозы, как и индукторная среда b1.

[0070]

«Органоид задней кишки» может быть получен, например, путем культивирования зрелых клеток эндодермы с индукторной средой B согласно изобретению. В одном варианте осуществления изобретения, органоиды задней кишки могут быть получены путем культивирования зрелых клеток эндодермы, например, с индукторной средой b, содержащей FGF и ингибитор GSK3 β , с последующим их трехмерным культивированием в геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b1, содержащей FGF и ингибитор GSK3 β . Органоиды задней кишки в геле внеклеточного матрикса могут быть собраны в соответствии с известными способами или с помощью коммерчески доступного реагента.

Органоиды задней кишки в геле внеклеточного матрикса могут быть собраны, например, путем осторожного разрушения геля внеклеточного матрикса металлопротеиназой.

[0071]

В одном варианте осуществления изобретения, органоиды задней кишки могут быть получены путем культивирования зрелых клеток эндодермы, например, с индукторной средой b, содержащей FGF и ингибитор GSK3 β , с последующим их культивированием на геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b1, содержащей FGF и ингибитор GSK3 β . В одном варианте осуществления изобретения, органоиды задней кишки могут быть получены путем культивирования зрелых клеток эндодермы, например, с индукторной средой b, содержащей FGF и ингибитор GSK3 β , с последующим их культивированием в индукторной среде b1, содержащей FGF, ингибитор GSK3 β , и внеклеточный матрикс в качестве диспергирующего компонента.

[0072]

Используемый здесь термин «внеклеточный матрикс (ECM)» включает, но не ограничивается ими, воду, полисахарид, эластин, интегрин и гликопротеин. Гликопротеин включает, например, коллаген, энтактин (найдоген), фибронектин и ламинин. ECM может быть получен, например, путем культивирования клеток, продуцирующих ECM (например, эпителиальных клеток, эндотелиальных клеток, клеток, подобных париетальной эндодерме, или фибробластов) *in vitro* с последующим удалением ECM из клеток. Клетками, продуцирующими ВКМ, могут быть, например, хрящевые клетки, которые продуцируют в основном коллаген и протеогликаны; фибробласты, которые продуцируют в основном коллаген типа IV, ламинин, интерстициальный проколлаген и фибронектин; и миофибробласты толстой кишки, которые продуцируют в основном коллаген (типа I, III и V), хондроитинсульфатные протеогликаны, гиалуроновую кислоту, фибронектин и тенасцин-С. ECM имеется в продаже. Коммерчески доступный внеклеточный матрикс может представлять собой, например, белок внеклеточного матрикса (Invitrogen), препараты базальной мембраны из клеток мышины саркомы Энгельбрета-Хольма-Свама (EHS) (например, экстракта базальной мембраны Cultrex® (Trevigen, Inc.) или Matrigel® (Corning Inc.)). ECM может представлять собой синтетический внеклеточный матрикс (например, ProNectin (Sigma Z378666)). Внеклеточный матрикс может представлять собой внеклеточный матрикс одного вида или смесь двух или более видов. В одном варианте осуществления изобретения, ECM представляет собой матригель.

[0073]

Гель внеклеточного матрикса для получения органоида задней кишки предпочтительно является таким же эластичным, как и гель, образованный раствором матригеля, концентрация белка в котором составляет 1-8 мг/мл, 1,5-6 мг/мл, 2,5 мг/мл или 5 мг/мл. Гель внеклеточного матрикса для образования органоида задней кишки предпочтительно получают с использованием матригеля, концентрация белка в котором составляет 1-8 мг/мл, 1,5-6 мг/мл, 1,5-3,5 мг/мл или 4-6 мг/мл. В случае получения

органоида мочевого пузыря путем проведения Стадии с2, описанной ниже, гель внеклеточного матрикса предпочтительно представляет собой гель, обладающий эластичностью в той же степени, что и гель, образованный раствором матригеля, концентрация белка в котором составляет 1-4 мг/мл, 2-3 мг/мл или 2,5 мг/мл. Используемый здесь термин «эластичность в той же степени» относится к эластичности в пределах $\pm 30\%$, $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$ от эластичности, служащей в качестве контроля. В одном варианте осуществления изобретения, эластичность в той же степени находится в пределах $\pm 30\%$ от эластичности контроля. Гель внеклеточного матрикса для получения органоида мочевого пузыря предпочтительно получают с использованием матригеля, концентрация белка в котором составляет 1-4 мг/мл, 2-3 мг/мл или 2,5 мг/мл.

[0074]

Так, например, внеклеточный матрикс как «диспергирующий компонент» присутствует в диспергированном или растворенном состоянии в индукторной среде. При наличии в качестве диспергирующего компонента, внеклеточный матрикс присутствует, например, в количестве не более, чем 10% об/об, не более, чем 7% об/об, не более, чем 5% об/об или не более, чем 2,5% об/об по объему индукторной среды. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда содержит внеклеточный матрикс в количестве 0,1-10% об/об, 0,1-7% об/об, 0,1-5% об/об, 1-10% об/об, 1-7% об/об, 1-5% об/об, 1-2,5% об/об, 2-10% об/об, 2-7% об/об, 2-5% об/об или 2-2,5% об/об. Если внеклеточный матрикс содержит препарат, происходящий от определенного организма (например, препарат базальной мембраны из клеток мышины саркомы), то концентрация во внеклеточном матриксе в индукторной среде предпочтительно должна быть низкой, чтобы предотвратить образование органоеидов в результате контаминации или уменьшить такую контаминацию.

[0075]

Культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде включает, например, культивирование зрелых клеток эндодермы в состоянии прилипания к поверхности сосуда для культивирования. Культура в таком состоянии также упоминается здесь как двухмерная культура. В одном варианте осуществления изобретения, двухмерная культура зрелых клеток эндодермы с индукторной средой b приводит к образованию сфероидов клеток, некоторые из которых могут плавать в среде. В одном варианте осуществления изобретения, стационарное культивирование зрелых клеток эндодермы в сосуде для культивирования с низким уровнем адгезии с индукторной средой b приводит к образованию сфероидов клеток, некоторые из которых могут плавать в среде. Сфероиды, суспендированные в культуральной среде, и сфероиды, прикрепленные к сосуду для культивирования, могут быть собраны пипетированием. Культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой b может быть проведено в известных условиях культивирования клеток в течение 3-6 дней, 3-5 дней или четырех дней.

[0076]

Культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой b1 включает культивирование сфероидов зрелых клеток эндодермы в присутствии внеклеточного матрикса. Культивирование сфероидов в присутствии внеклеточного матрикса включает, например, культивирование сфероидов с индукторной средой b1, содержащей внеклеточный матрикс в качестве диспергирующего компонента. Так, например, культивирование может быть проведено в стационарных культуральных сосудах с низким уровнем адгезии или во вращающейся суспензионной культуре. Культивирование сфероидов в присутствии внеклеточного матрикса в качестве диспергирующего компонента может приводить к образованию органоидов задней кишки. Культивирование сфероидов в присутствии внеклеточного матрикса включает, например, посев и культивирование сфероидов на геле внеклеточного матрикса. Культивирование сфероидов на геле внеклеточного матрикса может приводить к образованию органоидов задней кишки. Культивирование сфероидов в присутствии внеклеточного матрикса включает, например, культивирование сфероидов в условиях, когда сфероиды присутствуют в геле внеклеточного матрикса. Культура в таком состоянии также упоминается здесь как трехмерная культура. Трехмерное культивирование сфероидов зрелых клеток эндодермы может приводить к образованию органоидов задней кишки. Культивирование сфероидов зрелых клеток эндодермы с индукторной средой b1 в присутствии внеклеточного матрикса может быть проведено, например, в известных условиях культивирования клеток в течение 3-6 дней, 3-5 дней или четырех дней.

[0077]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b1 включает культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой b с образованием сфероидов зрелых клеток эндодермы, получение геля внеклеточного матрикса, содержащего сфероиды зрелых клеток эндодермы, а затем культивирование сфероидов в геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b1 для получения органоидов задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b1 включает культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой b для образования сфероидов зрелых клеток эндодермы, а затем культивирование сфероидов на геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b1 для образования органоидов задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b1 включает культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой b для образования сфероидов зрелых клеток эндодермы, а затем культивирование сфероидов в присутствии внеклеточного матрикса в качестве диспергирующего компонента с индукторной средой b1 для получения органоидов задней кишки.

[0078]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b1 включает культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде b, в среде STEMdiff APPEL2 (200 нг/мл FGF4, 8 мкМ CHIR99021, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II, антибиотика-фунгицида) в течение 1-9 дней для образования сфероидов зрелых клеток

эндодермы. Во время образования сфероидов необходимо собрать суспендированные сфероиды, если сфероиды в основном плавают, с последующим трехмерным культивированием. Затем культуру встряхивают при 100 об/мин. за день до того, как сфероиды будут, в основном, плавать. На следующий день, плавающие сфероиды собирают в чашку диаметром 35 мм. Затем с помощью пипетки собирают сфероиды, оставшиеся в лунке, из которой были собраны эти сфероиды. Собранные сфероиды следует держать на льду. Затем, восстановленный фактор роста в матригеле (Corning) разводят в индукторной среде b1 (2,5-10 мг/мл), добавляют его в количестве 50 мкл/лунку на клеточную культуру, вставляют прозрачную ПЭТ-мембрану в 24 лунки с размером пор 8,0 мкм (corning) и инкубируют при 37°C в течение 30-60 минут до образования геля. Затем добавляют собранные сфероиды и смешивают в количестве 30-100 с 50 мкл раствора матригеля и добавляют их общий объем поверх гелеобразного матригеля. Этот раствор инкубируют при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 30-60 минут до образования геля, добавляют индукторную среду b1 на верхнюю часть вставки для культивирования клеток в количестве 200 мкл и под нее в объеме 300 мкл и культивируют при 37°C в условиях 5% CO₂. При этом, желательно менять среду ежедневно при 2-мерном культивировании и через каждые два дня при 3-мерном культивировании. Во время индуцирования дифференцировки задней кишки желательно убедиться, что клетки совместно экспрессируют маркеры средней и задней кишки, FOXA2 и CDX2. Культивирование можно продолжать с индукторной средой b1 до тех пор, пока не будет обнаружена экспрессия P63, который экспрессируется в области задней кишки/клоаки.

[0079]

Стадия b2: Вентрализация задней кишки

Стадия b2 включает культивирование органоида задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой B, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b2), с образованием органоида вентральной части задней кишки.

[0080]

«Индукторная среда b2» включает базальную среду и дополнительные агенты, содержащие FGF, ингибитор GSK3 β и фактор остеогенеза. Так, например, индукторная среда b2 может быть получена путем добавления добавок (твердых или жидких) к базальной среде (жидкой). Определение базальной среды для индукторной среды A соответствующим образом применимо и к базальной среде для индукторной среды b2.

[0081]

Индукторная среда b2 может содержать FGF (предпочтительно FGF4) в концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. Индукторная среда b2 может содержать FGF7 в концентрации 10-500 нг/мл, 30-250 нг/мл или 50-150 нг/мл или FGF4 в концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. Индукторная среда b2 может содержать FGF в концентрации, вызывающей подавление экспрессии маркера клеток передней эндодермы (например, маркера печеночной линии дифференцировки

ALB, маркера линии дифференцировки поджелудочной железы PDX1 или маркера линии дифференцировки легкого и желудка SOX2), сравнимой с экспрессией, подавляемой в органоиде, культивируемом с индукторной средой b2, содержащей FGF4 в концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. В этом контексте, органоид, культивируемый в индукторной среде b2, может быть органоидом задней кишки, индуцированным и дифференцированным из зрелых клеток эндодермы в Стадии b1 в соответствии с настоящим изобретением. Индукторная среда b2 может содержать FGF в концентрации, оказывающей эффект на рост фибробластов в той же степени, что и эффект, оказываемый FGF4 в концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b2 может содержать FGF в концентрации, оказывающей эффект на рост фибробластов в той же степени, что и эффект, оказываемый FGF4 в концентрации 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл.

[0082]

Индукторная среда b2 может содержать ингибитор GSK3 β (предпочтительно CHIR-99021) в концентрации 1-50 мкМ, 3-25 мкМ, 5-10 мкМ, 0,5-16 мкМ, 3-12 мкМ или 6-10 мкМ. Индукторная среда b2 может содержать WNT (предпочтительно WNT3A) в качестве ингибитора GSK3 β в концентрации 2-2000 нг/мл, 100-1000 нг/мл или 20-200 нг/мл. Индукторная среда b2 может содержать ингибитор GSK3 β в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и эффект, оказываемый CHIR-99021 в концентрации 1-50 мкМ, 3-25 мкМ или 5-10 мкМ. Если индукторная среда b2 содержит WNT (предпочтительно WNT3A) в качестве ингибитора GSK3 β , то индукторная среда b2 может содержать WNT (предпочтительно WNT3A) в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и эффект, оказываемый CHIR-99021 в концентрации 1-50 мкМ, 3-25 мкМ или 5-10 мкМ.

[0083]

Используемый здесь термин «белок остеогенеза (BMP)» относится к белку, принадлежащему к суперсемейству трансформирующих факторов роста бета и индуцирующему эктопическое образование костей. BMP добавляют в индукторную среду В (например, в индукторную среду b2 и b3) для индуцирования органоида вентральной части задней кишки. BMP может представлять собой, например, BMP2, BMP4, BMP7 или их комбинацию. BMP предпочтительно представляет собой BMP4. Индукторная среда b2 может содержать BMP (например, BMP4) в концентрации 3-150 нг/мл, 9-75 нг/мл или 15-45 нг/мл.

[0084]

Индукторная среда b2 может содержать BMP в концентрации, оказывающей индуцирующий эффект на продуцирование щелочной фосфатазы в той же степени, что и эффект, оказываемый BMP4 в концентрации 3-150 нг/мл, 9-75 нг/мл или 15-45 нг/мл. «Эффект, индуцирующий продуцирование щелочной фосфатазы» может быть оценен, например, по количеству щелочной фосфатазы, продуцируемой в хондрогенных клетках в

присутствии заданного количества ВМР. Так, например, мышинные клетки, образующие хрящ, могут быть использованы в качестве хондрогенных клеток. Количество продуцируемой щелочной фосфатазы может быть определено известными способами (например, способом, описанным в *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 315, Issue 2, Pages 272-280).

[0085]

Индукторная среда b2 может содержать ВМР в концентрации, экспрессирующей маркер вентральной части задней кишки (например, GATA3, P63 или НОХА13) в той же степени, что и в клетках или органоидах, культивируемых с индукторной средой b2, содержащей ВМР4 в концентрации 3-150 нг/мл, 9-75 нг/мл или 15-45 нг/мл. В этом контексте, клетки, культивируемые в индукторной среде b2, могут представлять собой органоиды задней кишки, индуцированные и дифференцированные из зрелых клеток эндодермы в Стадии b1 согласно изобретению. Экспрессия маркера вентральной части задней кишки может быть оценена, например, с помощью иммунологического окрашивания. В методе иммунологического окрашивания, экспрессия маркера вентральной части задней кишки может быть оценена с помощью антител для каждого маркера, описанного в настоящем изобретении. Используемый здесь термин «экспрессия в той же степени» относится к экспрессии в пределах $\pm 30\%$, $\pm 20\%$ или $\pm 10\%$ по сравнению с экспрессией, которая служит в качестве контроля. В одном варианте осуществления изобретения, экспрессия в той же степени представляет собой экспрессию в пределах $\pm 30\%$ по сравнению с экспрессией, которая служит в качестве контроля.

[0086]

В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b2 содержит ВМР в концентрации, оказывающей индуцирующий эффект на продуцирование щелочной фосфатазы в той же степени, что и эффект, оказываемый ВМР4 в концентрации 3-150 нг/мл, 9-75 нг/мл или 15-45 нг/мл.

[0087]

Компоненты и/или дозы индукторной среды b, индукторной среды b1 и индукторной среды b2, из которых удаляют ВРМ, могут быть одинаковыми или различными. В одном варианте осуществления изобретения, компоненты и/или дозы индукторной среды b, индукторной среды b1 и индукторной среды b2, из которых удален ВРМ, являются одинаковыми.

[0088]

Определение условий культивирования сфероидных зрелых клеток эндодермы с индукторной средой b1 в присутствии внеклеточного матрикса, описанное выше, соответствующим образом применимо и к культуре органоидов задней кишки с индукторной средой b2 в присутствии внеклеточного матрикса. Так, например, культивирование органоида задней кишки с индукторной средой b2 в присутствии внеклеточного матрикса может быть проведено в известных условиях культивирования клеток. Известные условия культивирования клеток могут заключаться в хранении при

37°C при 5% CO₂. Температура культивирования не ограничивается 37°C, и может быть соответствующим образом использована любая температура, известная специалистам в области культивирования клеток. Концентрация CO₂ не ограничивается 5%, и может быть соответствующим образом использована любая концентрация CO₂, известная специалистам в области культивирования клеток. Культивирование органоида задней кишки может быть проведено в течение 3-6 дней, 3-5 дней или четырех дней.

[0089]

Формы внеклеточного матрикса (гелевая форма или форма диспергирующего компонента) на Стадии b1 и Стадии b2 могут быть одинаковыми или различными. В одном варианте осуществления изобретения, формы внеклеточного матрикса на Стадии b1 и Стадии b2 являются одинаковыми. В одном варианте осуществления изобретения, гель внеклеточного матрикса, включающий органоиды задней кишки, может представлять собой гель внеклеточного матрикса, образованный на Стадии b1, или гель внеклеточного матрикса, вновь образованный путем сбора органоидов задней кишки из геля внеклеточного матрикса после проведения Стадии b1 и образования геля, в который включены собранные органоиды заднего отдела кишечника. Для простоты, гель внеклеточного матрикса, включающий органоид задней кишки на Стадии b2, представляет собой гель внеклеточного матрикса, образованный на Стадии b1.

[0090]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b2 включает культивирование органоидов задней кишки в геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b2 для образования органоидов вентральной части задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b2 включает культивирование органоидов задней кишки на геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b2 с образованием органоидов вентральной части задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b2 включает культивирование органоидов задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса в качестве диспергирующего компонента с индукторной средой b2 с образованием органоидов вентральной части задней кишки.

[0091]

В одном варианте осуществления изобретения, культивирование органоидов задней кишки с индукторной средой b2 включает культивирование органоидов задней кишки в геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b2, средой STEMdiff APEL2 (30 нг/мл BMP4, 200 нг/мл FGF4, 8 мкМ CHIR99021, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II, антибиотика-фунгицида) или со средой STEMdiff APEL2 (30 нг/мл BMP4, 100 нг/мл FGF7, 200 нг/мл FGF4, 8 мкМ CHIR99021, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II, антибиотика-фунгицида) в течение 3-6 дней для вентрализации задней кишки. Затем добавляют индукторную среду b2 на гель-вставку для культивирования клеток в количестве 200 мкл и под нее в объеме 300 мкл и заменяют среду через каждые два дня. Предпочтительно, чтобы вентрализация сохранялась до тех пор, пока не уменьшится экспрессия дорсальных маркеров задней кишки SOX2 и CDX2, а маркер вентральной части задней кишки/клоаки

P63 не будет в высокой степени экспрессироваться в клетках. Недостаточная постериоризация и вентрализация приводят к контаминации клетками среднего и дорсального отделов кишечника. В этом случае необходимо продлить период индуцирования или вентрализации задней кишки.

[0092]

Стадия b3: Образование органоида вентральной части задней кишки

Стадия b3 включает культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза, а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b3) с образованием органоида вентральной части задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b3 включает культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В для образования сфероидов зрелых клеток эндодермы, а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой b3 с образованием органоидов вентральной части задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, компоненты и/или дозы индукторной среды В для образования сфероидов зрелых клеток эндодермы могут быть такими же, как и в случае индукторной среды b3. В этом контексте, Стадия b3 включает культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b3), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса в индукторной среде В (индукторной среде b3) с образованием органоидов вентральной части задней кишки.

[0093]

Органоиды вентральной части задней кишки в соответствии с вариантом осуществления изобретения могут быть получены способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой А, содержащей активин А и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы, и Стадию b3: культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и, необязательно, белок остеогенеза (индукторная среда b3), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В (индукторная среда b3) для образования органоидов вентральной части задней кишки.

[0094]

«Индукторная среда b3» включает базальную среду и дополнительные агенты, содержащие FGF, ингибитор GSK3 β и фактор остеогенеза. Так, например, индукторная среда b3 может быть получена путем добавления добавок (твердых или жидких) к базальной среде (жидкой). Определение базальной среды для индукторной среды А соответствующим образом применимо и к базальной среде для индукторной среды b3.

[0095]

Индукторная среда b3 может содержать FGF (предпочтительно FGF4) в количестве 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. Индукторная среда b3 может содержать FGF7 в количестве 10-500 нг/мл, 30-250 нг/мл или 50-150 нг/мл или FGF4 в количестве 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. Индукторная среда b3 может содержать ингибитор GSK3 β (предпочтительно CHIR-99021) в концентрации 0,5-25 мкМ, 1-15 мкМ, 2-8 мкМ, 0,1-10 мкМ, 0,5-9 мкМ, 1-8 мкМ, 2-6 мкМ или 3-5 мкМ. Индукторная среда b3 может содержать фактор остеогенеза (предпочтительно BMP4) в количестве 0,1-100 нг/мл, 0,5-80 нг/мл, 1-60 нг/мл, 2-40 нг/мл или 5-20 нг/мл.

[0096]

Индукторная среда b3 может содержать FGF в концентрации, вызывающей подавление экспрессии маркера клеток передней энтодермы (например, маркера печеночной линии ALB, маркера линии поджелудочной железы PDX1 или маркера линии легкого и желудка SOX2) в той же степени, что и подавление экспрессии, наблюдаемое в клетках или органоидах, культивируемых с индукторной средой b3, содержащей FGF4 в количестве 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. В этом контексте, клетки, культивируемые в индукторной среде b3, могут представлять собой зрелые клетки энтодермы, индуцированные и дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток на стадии A в соответствии с настоящим изобретением. В этом контексте, органоид, культивируемый в индукторной среде b3, может быть органоидом задней кишки, индуцированным и дифференцированным из зрелых клеток энтодермы на стадии b1 в соответствии с настоящим изобретением. Индукторная среда b3 может содержать FGF в концентрации, оказывающей эффект на рост фибробластов в той же степени, что и эффект, оказываемый FGF4 при 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b3 может содержать FGF в концентрации, оказывающей эффект на рост фибробластов в той же степени, что и эффект, оказываемый FGF4 при 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл.

[0097]

Индукторная среда b3 может содержать WNT (предпочтительно WNT3A) в качестве ингибитора GSK3 β в концентрации 1-1000 нг/мл, 50-500 нг/мл или 10-100 нг/мл. Индукторная среда b3 может содержать GSK3 β в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и действие, оказываемое CHIR-99021 при 0,5-25 мкМ, 1-15 мкМ или 2-8 мкМ. Если индукторная среда b3 содержит WNT (предпочтительно WNT3A) в качестве ингибитора GSK3 β , то индукторная среда b3 может содержать WNT (предпочтительно WNT3A) в концентрации, оказывающей ингибирующее действие на GSK3 β в той же степени, что и действие, оказываемое CHIR-99021 при 0,5- 25 мкМ, 1-15 мкМ или 2-8 мкМ.

[0098]

Индукторная среда b3 может содержать BMP в концентрации, оказывающей действие, индуцирующее продуцирование щелочной фосфатазы в той же степени, что и действие, оказываемое BMP4 при 0,1-100 нг/мл, 0,5-80 нг/мл, 1-60 нг/мл, 2-40 нг/мл или 5-

20 нг/мл. Индукторная среда b3 может содержать BMP в концентрации, экспрессирующей маркер вентральной части задней кишки (например, GATA3, P63 или HOXA13) в клетках или органоидах, культивируемых с индукторной средой b3, содержащей BMP4 в количестве 0,1-100 нг/мл, 0,5-80 нг/мл, 1-60 нг/мл, 2-40 нг/мл или 5-20 нг/мл. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда b3 содержит BMP в концентрации, оказывающей действие, индуцирующее продуцирование щелочной фосфатазы в той же степени, что и действие, оказываемое BMP4 при 0,1-100 нг/мл, 0,5-80 нг/мл, 1-60 нг/мл, 2-40 нг/мл или 5-20 нг/мл.

[0099]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b3 включает культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В (предпочтительно в индукторной среде b3) с образованием сфероидов зрелых клеток эндодермы; получение геля внеклеточного матрикса, включающего сфероид зрелых клеток эндодермы, а затем культивирование сфероидов в геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b3 с образованием органоидов вентральной части задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b3 включает культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В (предпочтительно с индукторной средой b3) для образования сфероидов зрелых клеток эндодермы, а затем культивирование сфероидов на геле внеклеточного матрикса с индукторной средой b3 для образования органоидов вентральной части задней кишки. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b3 включает культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В (предпочтительно с индукторной средой b3) для образования сфероидов зрелых клеток эндодермы, а затем культивирование сфероидов в присутствии внеклеточного матрикса в качестве диспергирующего компонента с индукторной средой b3 для образования органоидов вентральной части задней кишки.

[0100]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия b3 включает культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде b3, среде STEMdiff AP2L2 (10-30 нг/мл BMP4, 200 нг/мл FGF4, 4 мкМ CHIR99021, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II, антибиотика-фунгицида) в течение 8-11 дней с образованием сфероидов зрелых клеток эндодермы. Во время образования сфероида необходимо собирать суспендированные сфероиды, если сфероиды, в основном, плавают, а затем проводить трехмерное культивирование. На следующий день следует собрать плавающие сфероиды в чашку диаметром 35 мм. Затем собирают сфероиды, оставшиеся в лунке, из которой были собраны суспендированные сфероиды, путем пипетирования среды над ними так, чтобы они плавали. Собранные сфероиды хранят на льду. Затем восстановленный фактор роста в матригеле (Corning) разводят в индукторной среде b3 (концентрация 25-100%), а затем добавляют его в количестве 50 мкл/лунку на вставку, а именно, прозрачную PET-мембрану, для культивирования клеток на 24 лунки с размером пор 8,0 мкм (Corning) и инкубируют при 37°C в течение 30-60 минут до образования геля. Затем добавляют и

смешивают собранные сфероиды 30-100 с раствором Матригеля в количестве 50 мкл и добавляют их общий объем на верхнюю часть гелеобразного Матригеля. Затем его инкубируют при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 30-60 минут до образования геля, добавляют индукторную среду b3 на верхнюю часть вставки для клеточных культур в количестве 200 мкл и под нее в объеме 300 мкл и культивируют при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Среду предпочтительно менять ежедневно при 2-мерном культивировании и через каждые два дня при 3-мерном культивировании. Во время индуцирования дифференцировки вентральной части задней кишки, клетки культивируют в индукторной среде b3 до тех пор, пока они не будут экспрессировать маркеры вентральной задней кишки/клоаки GATA3 и P63, а маркеры дорсальной части средней/задней кишки CDX2, SOX2 и T будут экспрессироваться на пониженном уровне или вообще не будут экспрессироваться. Полученные органоиды вентральной части задней кишки имеют округлую форму и просветную структуру. Недостаточная постериоризация и вентрализация органоидов приводит к появлению клеток линии дифференцировки средней кишки и дорсального отдела кишечного тракта. В этом случае необходимо увеличить период культивирования на индукторной среде b3 или увеличить концентрацию BMP4 в индукторной среде b3.

[0101]

Определение каждого термина для каждой стадии индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы (Стадия А) и образования органоида вентральной части задней кишки (Стадия В), а также определение вариантов осуществления изобретения, включая условия культивирования, соответствующим образом применимо к соответствующему термину и к стадиям в этих вариантах осуществления изобретения, соответственно.

[0102]

[Органоид мочевого пузыря или способ его получения]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу получения органоида мочевого пузыря. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к органоиду мочевого пузыря.

[0103]

Используемый здесь термин «органоид мочевого пузыря» относится к органоиду, имеющему по меньшей мере два клеточных слоя.

По меньшей мере два клеточных слоя включают первый клеточный слой, содержащий клетки, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и практически не экспрессируют P63; и второй клеточный слой, локализованный снаружи от первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2. Органоид мочевого пузыря в соответствии с вариантом осуществления изобретения содержит первый клеточный слой, содержащий клетки, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и практически не экспрессируют P63; второй клеточный слой, локализованный снаружи от первого клеточного слоя, где второй

клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2; и третий клеточный слой, локализованный снаружи от второго клеточного слоя, где третий клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5. Органоид мочевого пузыря может быть определен по-другому следующим образом: органоид мочевого пузыря, включающий, например, первый клеточный слой, содержащий клетки, совместно экспрессирующие P63 и KRT5, локализованные вдоль самой внешней периферии; второй клеточный слой, содержащий клетки, совместно экспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2, локализованные внутри первого клеточного слоя; и третий клеточный слой, содержащий клетки, экспрессирующие UPK1B и/или UPK2, но по существу не экспрессирующие P63, и локализованные внутри второго клеточного слоя. Каждый идентифицированный таким образом клеточный слой также упоминается в настоящем описании следующим образом: первый клеточный слой (базальный клеточный слой), второй клеточный слой (промежуточный клеточный слой) и третий клеточный слой (поверхностный клеточный слой).

[0104]

Органоид мочевого пузыря может быть получен, например, способом получения органоида мочевого пузыря в соответствии с настоящим изобретением. Органоид мочевого пузыря, полученный путем образования органоида вентральной части задней кишки и культивирования органоида вентральной части задней кишки *in vitro* в способе получения органоида мочевого пузыря, может называться здесь «органомидом, подобным мочевому пузырю». Органоид мочевого пузыря может иметь диаметр не менее, чем 80 мкм, не менее, чем 100 мкм, не менее, чем 120 мкм, не менее, чем 150 мкм или не менее, чем 200 мкм по большой оси. Так, например, органоид мочевого пузыря может быть использован для оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом. Органоид мочевого пузыря может быть использован, например, в качестве активного ингредиента регенеративной лекарственной композиции в соответствии с настоящим изобретением.

[0105]

Органоид мочевого пузыря согласно одному варианту осуществления изобретения не имеет структуры просвета; включает первый клеточный слой, содержащий клетки, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и практически не экспрессируют P63; второй клеточный слой, локализованный снаружи от первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2; и третий клеточный слой, локализованный снаружи от второго клеточного слоя, где третий клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5. В одном варианте осуществления изобретения, органоид мочевого пузыря содержит четвертый клеточный слой, локализованный снаружи от третьего клеточного слоя, где четвертый клеточный слой содержит клетки, подобные стромальным клеткам. В одном варианте осуществления изобретения, органоид мочевого пузыря дополнительно содержит пятый клеточный слой, локализованный снаружи от четвертого клеточного слоя, где пятый клеточный слой

содержит клетки гладких мышц.

[0106]

Органоид мочевого пузыря согласно варианту осуществления изобретения имеет просвет; первый клеточный слой, содержащий клетки, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и по существу не экспрессируют P63, где первый клеточный слой обращен к просвету; и второй клеточный слой, локализованный снаружи от первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2. Первый клеточный слой окружает просвет или находится напротив просвета. Органоид мочевого пузыря согласно варианту осуществления изобретения имеет просвет; включает первый клеточный слой, содержащий клетки, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и по существу не экспрессируют P63, где первый клеточный слой обращен к просвету; второй клеточный слой, локализованный снаружи от первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2; и третий клеточный слой, локализованный снаружи от второго клеточного слоя, где третий клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5. Первый клеточный слой окружает просвет или обращен лицом к просвету. В одном варианте осуществления изобретения, органоид мочевого пузыря содержит четвертый клеточный слой, локализованный снаружи от третьего клеточного слоя, где четвертый клеточный слой содержит клетки, подобные стромальным клеткам. В одном варианте осуществления изобретения, органоид мочевого пузыря дополнительно содержит пятый клеточный слой, локализованный снаружи от четвертого клеточного слоя, где пятый клеточный слой содержит клетки гладких мышц.

[0107]

Органоид мочевого пузыря характеризуется экспрессией по меньшей мере одного маркера (например, одного вида, двух видов или трех видов или более) вентральной части задней кишки, выбранного из группы, состоящей из $\Delta N63$, GATA3, ISL1 и SATB2; экспрессирует по меньшей мере один маркер (например, одного вида, двух видов, трех видов, четырех видов, пяти видов, шести видов или более), выбранный из группы, состоящей из Smad1/5/8, HOXA13, FOXA2, CK8/KRT8, ECAD и UPK1B; и практически не экспрессирует маркер по меньшей мере одного вида (например, одного вида, двух видов или трех видов, а предпочтительно трех видов), выбранный из группы, состоящей из SOX2, T и CDX2. Органоид мочевого пузыря согласно варианту осуществления изобретения дополнительно экспрессирует один или оба $\Delta NP63$ и GATA3. Органоид мочевого пузыря экспрессирует по меньшей мере один маркер (например, одного вида, двух видов или трех видов или более), выбранный из группы, состоящей из Smad1/5/8, FOXA2, ECAD и UPK1B. Органоид мочевого пузыря практически не экспрессирует ни маркеры SOX2, ни CDX2 дорсальной части задней кишки.

[0108]

Используемый здесь термин «уроплакин 2 (UPK2)» относится к мембранному гликопротеину с молекулярной массой приблизительно 15 кДа, который участвует в

образовании переходных клеток с эпителиальным покрытием, образующих уроэпителий в системе мочевыводящих путей вместе с уроплакином Ia, II, и III, а также повышает проницаемость и барьерную функцию клеток с покрытием. UPK2 может быть использован в качестве эпителиального маркера мочевого пузыря. UPK2, экспрессируемый в клетках или в органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против UPK2 (например, мышинным антителом против уроплакина II (BIOCARE MEDICAL, #ACR3051C)).

[0109]

Используемый здесь термин «P63», относящийся к органоиду мочевого пузыря, может означать эпителиальный маркер мочевого пузыря. P63, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, с помощью иммунологического окрашивания антителом против P63 (например, кроличьим антителом против P63 (Abscam, #ab124762)).

[0110]

Используемый здесь термин «кератин 5 (KRT5)» относится к белку, кодируемому геном KRT5, который димеризуется с кератином 14 с образованием промежуточных филаментов, формирующих цитоскелет базальных эпителиальных клеток. KRT5 может быть использован в качестве эпителиального маркера мочевого пузыря. KRT5, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против KRT5 (например, куриным антителом против кератина 5 (Bio Legend, #905903)).

[0111]

Используемый здесь термин «клеточный слой» относится к набору клеточных популяций, в которых преобладают клетки определенного типа. Так, например, клеточный слой может иметь набор клеточных популяций, в которых клетки одного конкретного типа составляют не менее 70%, 75%, 80%, 85% или 90% популяции клеток. В одном примере, первый, второй или третий клеточный слой может представлять собой область популяции клеток одного типа, в которой преимущественно присутствуют клетки одного конкретного типа, которые можно отличить от других клеточных популяций.

[0112]

В одном примере клеточный слой включает не менее, чем 70%, не менее, чем 75%, не менее, чем 80%, предпочтительно не менее, чем 85%, а более предпочтительно не менее, чем 90% клеток, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и практически не экспрессируют P63. В одном примере, клеточный слой состоит в основном из клеток, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и практически не экспрессируют P63. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и по существу не экспрессируют P63, имеет мешкообразную форму и просвет. В одном из примеров, просвет окружен клеточным слоем. В некоторых примерах, клеточный слой обращен к просвету. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток,

которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и по существу не экспрессируют P63, обращен к просвету и уложен внутри клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, которые совместно экспрессируют P63 и UPK1B и/или UPK2, описанные ниже.

[0113]

В одном примере, клеточный слой включает не менее, чем 70%, не менее, чем 75%, не менее, чем 80%, предпочтительно не менее, чем 85%, а более предпочтительно не менее, чем 90% клеток, которые коэкспрессируют P63 и UPK1B и/или UPK2. В одном примере, клеточный слой состоит по существу из клеток, совместно экспрессирующих P63 и UPK1B и/или UPK2. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток, совместно экспрессирующих P63 и UPK1B и/или UPK2, имеет мешкообразную форму. В одном примере, клеточный слой перекрывается снаружи от клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и практически не экспрессируют P63. В одном примере, клетки, совместно экспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2, локализованы снаружи от клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, экспрессирующих UPK1B и/или UPK2. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток, совместно экспрессирующих P63 и UPK1B и/или UPK2, присутствует между клеточным слоем, содержащим клетки или состоящим по существу из клеток, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и по существу не экспрессируют P63, и клеточным слоем, содержащим клетки или состоящим по существу из клеток, коэкспрессирующих P63 и KRT5, описанные ниже.

[0114]

В одном примере, клеточный слой включает не менее, чем 70%, не менее, чем 75%, не менее, чем 80%, предпочтительно не менее, чем 85%, а более предпочтительно не менее, чем 90% клеток, которые экспрессируют P63 и KRT5. В одном примере, клеточный слой состоит по существу из клеток, совместно экспрессирующих P63 и KRT5. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток, совместно экспрессирующих P63 и KRT5, имеет мешкообразную форму. В одном примере, клеточный слой перекрывается снаружи от клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, совместно экспрессирующих P63 и UPK1B и/или UPK2. В одном примере, клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5, локализованы снаружи от клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, коэкспрессирующих P63 и UPK1B и/или UPK2. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток, коэкспрессирующих P63 и KRT5, присутствует между клеточным слоем, содержащим клетки или состоящим по существу из клеток, коэкспрессирующих P63 и UPK1B и/или UPK2, и клеточным слоем, содержащим клетки или состоящим по существу из клеток, подобных стромальным клеткам, описанным ниже.

[0115]

В одном примере, клеточный слой включает не менее, чем 70%, не менее, чем 75%, не менее, чем 80%, предпочтительно не менее, чем 85%, а более предпочтительно не менее, чем 90% клеток, подобных стромальным клеткам. В одном примере, клеточный слой состоит по существу из клеток, подобных стромальным клеткам. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток, подобных стромальным клеткам, имеет мешкообразную форму. В одном примере, клеточный слой перекрывается снаружи от клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, совместно экспрессирующих P63 и KRT5. В одном примере, клетки, подобные стромальным клеткам, локализованы снаружи от клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, коэкспрессирующих P63 и KRT5. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток, подобных стромальным клеткам, присутствует между клеточным слоем, содержащим клетки или состоящим по существу из клеток, коэкспрессирующих P63 и KRT5, и клеточным слоем, содержащим клетки или состоящим по существу из клеток гладких мышц, описанных ниже.

[0116]

В одном примере, клеточный слой включает не менее, чем 70%, не менее, чем 75%, не менее, чем 80%, предпочтительно не менее, чем 85%, а более предпочтительно не менее, чем 90% клеток гладких мышц. В одном примере, клеточный слой состоит по существу из клеток гладких мышц. В одном примере, клеточный слой, содержащий клетки или состоящий по существу из клеток гладких мышц, имеет мешкообразную форму. В одном примере, клеточный слой перекрывается снаружи от клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, подобных стромальным клеткам. В одном примере, клетки гладких мышц локализованы снаружи от клеточного слоя, содержащего клетки или состоящего по существу из клеток, подобных стромальным клеткам.

[0117]

Используемый здесь термин «клетка, подобная стромальным клеткам» относится к клетке, которая образует поддерживающую ткань эпителиальных клеток. К клеткам, подобным стромальным клеткам, относятся, например, фибробласты. В одном варианте осуществления изобретения, клеточный слой, содержащий клетки, подобные стромальным клеткам, преимущественно включает клетки, экспрессирующие виментин (VIM). В одном варианте осуществления изобретения, клеточный слой, содержащий клетки, подобные стромальным клеткам, представляет собой клеточный слой, локализованный в органоиде мочевого пузыря между клеточным слоем, содержащим клетки, совместно экспрессирующие P63 и KRT5, и клеточным слоем, содержащим клетки гладких мышц, экспрессирующие α SMA. Клетки, преимущественно входящие в состав клеточного слоя, экспрессируют VIM.

[0118]

Используемый здесь термин «VIM» относится к промежуточным филаментам, специфичным для мезенхимальных клеток. VIM может быть использован в качестве маркера мезенхимальных стволовых клеток. VIM, экспрессируемый в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, путем иммунологического окрашивания антителом против VIM (например, куриным антителом против виментина (NOVUS, #NB300-223)).

[0119]

Используемый здесь термин «клетка гладких мышц» относится к удлиненной веретенообразной мононуклеарной клетке, содержащей многочисленные актиновые филаменты и несколько миозиновых филаментов. В одном варианте осуществления изобретения, клеточный слой, содержащий клетки гладких мышц, преимущественно содержит клетки, экспрессирующие α SMA. В другом варианте осуществления изобретения, клеточный слой, содержащий клетки гладких мышц, преимущественно содержит клетки, коэкспрессирующие α SMA и VIM.

[0120]

Используемый здесь термин « α -актин гладких мышц (α SMA)» относится к белку, принадлежащему к семейству актинов, который также называется ACTA2. α SMA может быть использован в качестве маркера клеток гладких мышц. α SMA, экспрессированный в клетках или органоидах, может быть обнаружен или оценен, например, с помощью иммунологического окрашивания антителом против α SMA (кроличьим антителом против α SMA (Cell signaling, #19245T)).

[0121]

Органоиды мочевого пузыря могут быть получены методом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток в индукторной среде А для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы, Стадию В: культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В для образования вентральной части задней кишки, и Стадию с1: культивирование этих клеток в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой С, содержащей ретиноевую кислоту, фактор роста фибробластов и белок остеогенеза; Стадию с2: индуцирование этих клеток в почках или мочевом пузыре или в их периферической области у человека или млекопитающего, не являющегося человеком; или Стадию с3: культивирование этих клеток в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток.

[0122]

Стадия с1: Индуцирование дифференцировки эпителия мочевого пузыря (культура *in vitro*)

Стадия с1 включает культивирование органоида вентральной части задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой С.

[0123]

«Индукторная среда С» включает базальную среду и дополнительные агенты,

включающие ретиноевую кислоту, фактор роста фибробластов и белок остеогенеза. Так, например, индукторная среда С может быть получена путем добавления добавок (твердых или жидких) к базальной среде (жидкой). Концентрации дополнительных агентов, добавляемых в индукторную среду С, соответствующим образом регулируются специалистом в данной области с учетом видов животных, у которых берут клетки, используемые для культивирования. Определение базальной среды для индукторной среды А соответственно применимо к базальной среде для индукторной среды С. Индукторная среда С может дополнительно содержать гепарин, среду, не содержащую белков (например, PFHM-II), антибиотики (например, пенициллин/стрептомицин, гентамицин), или смесь антибиотиков-противогрибковых агентов (например, антибиотиков-фунгицидов), или их комбинацию.

[0124]

Индукторная среда С может содержать FGF (предпочтительно FGF7) в количестве 10-500 нг/мл, 30-250 нг/мл или 50-150 нг/мл. Индукторная среда С может содержать FGF7 в количестве 10-500 нг/мл, 30-250 нг/мл или 50-150 нг/мл или FGF4 в количестве 20-1000 нг/мл, 60-500 нг/мл или 100-300 нг/мл. Индукторная среда С может содержать FGF в концентрации, оказывающей влияние на пролиферацию фибробластов в той же степени, что и действие, оказываемое FGF7 при 10-500 нг/мл, 30-250 нг/мл или 50-150 нг/мл.

[0125]

Индукторная среда С может содержать белок остеогенеза (предпочтительно BMP4) в количестве 3-150 нг/мл, 9-75 нг/мл или 15-45 нг/мл. Индукторная среда С может содержать BMP в концентрации, оказывающей эффект, индуцирующий продуцирование щелочной фосфатазы в той же степени, что и эффект, оказываемый BMP4 при 3-150 нг/мл, 9-75 нг/мл или 15-45 нг/мл. Индукторная среда С может содержать BMP в концентрации, экспрессирующей маркер вентральной части задней кишки (например, GATA3, P63 или NOXA13) в той же степени, что и в органоиде, культивируемом с индукторной средой С, содержащей BMP4 в количестве 3-150 нг/мл, 9-75 нг/мл или 15-45 нг/мл. В этом контексте, органоид, культивируемый в индукторной среде С, может представлять собой органоид мочевого пузыря, полученный на стадии b2 или b3 в соответствии с настоящим изобретением. Экспрессия маркера вентральной части задней кишки может быть оценена, например, методами иммунологического окрашивания. В методе иммунологического окрашивания, экспрессия маркера вентральной части задней кишки может быть оценена с использованием антител для каждого описанного здесь маркера. В одном варианте осуществления изобретения, индукторная среда С содержит BMP в концентрации, индуцирующей продуцирование щелочной фосфатазы в той же степени, что и в случае BMP4 при 3-150 нг/мл, 9-75 нг/мл или 15-45 нг/мл.

[0126]

Индукторная среда С может содержать ретиноевую кислоту (предпочтительно полностью транс-ретиноевую кислоту) в концентрации 0-1 мкМ, 10 нМ-500 нМ, 30 нМ-300 нМ или 50 нМ-150 нМ.

[0127]

Определение условий культивирования сфероидов зрелых клеток эндодермы в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой b1, описанное выше, соответствующим образом применимо и к культивированию органоидов вентральной части задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой C. Так, например, культивирование органоидов вентральной части задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой C может быть проведено в известных условиях культивирования клеток. Известные условия культивирования клеток могут заключаться в хранении при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Температура для культивирования не ограничивается 37°C, и специалистами в области культивирования клеток может быть соответственно выбрана любая подходящая температура. Концентрация CO₂ не ограничивается 5%, и специалистами в области культивирования клеток может быть соответственно выбрана любая подходящая концентрация CO₂. Культивирование органоида вентральной части задней кишки может быть проведено в течение 5-30 дней, 5-25 дней, 5-20 дней, 5-15 дней или 5-10 дней.

[0128]

Форма внеклеточного матрикса (гелевая форма или форма диспергирующего компонента) на Стадии c1 может быть такой же, как и на Стадии b1 и на Стадии b2, или она может отличаться от них. В одном варианте осуществления изобретения, форма внеклеточного матрикса на Стадии c1 является такой же, как и форма каждого внеклеточного матрикса на Стадии b1 и на Стадии b2. В одном варианте осуществления изобретения, гель внеклеточного матрикса, включающий органоиды вентральной части задней кишки, может представлять собой гель внеклеточного матрикса, образованный на Стадии b1 и на Стадии b2, или гель внеклеточного матрикса, вновь образованный путем сбора органоидов вентральной части задней кишки из геля внеклеточного матрикса после проведения Стадии b2 и получения этого геля, в который были включены собранные органоиды вентральной части задней кишки. Вкратце, гель внеклеточного матрикса, включающий органоид вентральной части задней кишки на Стадии c1, представляет собой гель внеклеточного матрикса, полученный на Стадиях b1 и b2.

[0129]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия c1 включает культивирование органоидов вентральной части задней кишки в гелях внеклеточного матрикса с индукторной средой C для получения органоидов мочевого пузыря. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия c1 включает культивирование органоидов вентральной части задней кишки на геле внеклеточного матрикса с индукторной средой C с образованием органоидов мочевого пузыря. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия c1 включает культивирование органоидов вентральной части задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса в качестве диспергирующего компонента с индукторной средой C с образованием органоидов мочевого пузыря.

[0130]

В одном варианте осуществления изобретения, культивирование органоидов вентральной части задней кишки в индукторной среде С включает культивирование органоидов вентральной части задней кишки в индукторной среде С, среде STEMdiff APEL2 (10 или 30 нг/мл BMP4, 0,1-1 мкМ полностью транс-ретиноевой кислоты, 100 нг/мл FGF7 или FGF9, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II, антибиотика-фунгицида) в течение по меньшей мере шести дней для индуцирования дифференцировки эпителия мочевого пузыря. Затем добавляют индукторную среду С на верхнюю часть геля вставки для культивирования клеток в количестве 200-400 мкл и под нее в объеме 300-600 мкл и среду заменяют каждые два дня. Предпочтительно, чтобы культура сохранялась до тех пор, пока не будет обнаружена экспрессия маркеров эпителия мочевого пузыря UPK2, P63 и KRT5. Затем добавляют агонист PPAR γ (розиглитазон, 0,1-10 мкМ) в индукторную среду С для созревания эпителиальных клеток мочевого пузыря.

[0131]

В одном варианте осуществления изобретения, органоиды мочевого пузыря могут быть получены способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток в индукторной среде А для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы, Стадию b1: культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β (индукторная среда b), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно в геле внеклеточного матрикса) с индукторной средой В (индукторной средой b1) с образованием органоидов задней кишки, и Стадию b2: культивирование органоидов задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно в геле внеклеточного матрикса) с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b2) с образованием органоидов вентральной части задней кишки, и Стадию c1: культивирование органоидов вентральной части задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой С, содержащей ретиноевую кислоту, фактор роста фибробластов и белок остеогенеза.

[0132]

В одном варианте осуществления изобретения, органоиды мочевого пузыря могут быть получены способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой А для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы; Стадию b3: культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза (индукторная среда b), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно, внеклеточного матрикса в качестве диспергирующего компонента) с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b3) для получения органоидов вентральной части задней кишки; и Стадию c1: культивирование органоидов вентральной части задней кишки в присутствии

внеклеточного матрикса с индукторной средой С, содержащей ретиноевую кислоту, фактор роста фибробластов и белок остеогенеза.

[0133]

Стадия с2: Введение в почку, мочевого пузыря или в их периферическую область у млекопитающих

Стадия с2 включает введение органоида вентральной части задней кишки в почку или в мочевой пузырь или их периферическую область у человека или млекопитающего, не являющегося человеком, с образованием органоида мочевого пузыря. В одном варианте осуществления изобретения, Стадия с2 включает введение органоида вентральной части задней кишки в почку или мочевой пузырь или в их периферическую область человека или млекопитающего, не являющегося человеком, с образованием органоида мочевого пузыря. Если органоид вентральной части задней кишки находится в геле внеклеточного матрикса, то Стадия с2 может дополнительно включать сбор органоида вентральной части задней кишки из геля внеклеточного матрикса перед введением его человеку или млекопитающему, не являющемуся человеком.

[0134]

Используемый здесь термин «млекопитающее, не являющееся человеком» может относиться, например, к грызунам, таким как мышь, крыса, морская свинка, хомяк; к примату, не являющемуся человеком, такому как шимпанзе; к парнокопытным, таким как крупный рогатый скот, козы, овцы; к непарнокопытным, таким как лошадь; и к животным-компаньонам, таким как кролики, собаки, кошки. В одном варианте осуществления изобретения, млекопитающим, не являющимся человеком, является грызун или примат за исключением человека.

[0135]

Используемый здесь термин «почка» относится к органу в мочевыделительной системе, который вырабатывает мочу посредством фильтрации и удаления продуктов жизнедеятельности или избыточной воды из крови. В данном случае, почка может быть нормальной почкой без какого-либо повреждения или заболевания, поврежденной почкой или больной почкой. В одном варианте осуществления изобретения, почка представляет собой нормальную почку. В одном варианте осуществления изобретения, почка представляет собой поврежденную почку или больную почку.

[0136]

Используемый здесь термин «мочевой пузырь» относится к мешкообразному органу, который временно хранит мочу, поступающую из почек. Мочевой пузырь может быть нормальным мочевым пузырем без каких-либо повреждений или заболеваний; поврежденным мочевым пузырем или больным мочевым пузырем. В одном варианте осуществления изобретения, мочевой пузырь представляет собой нормальный мочевой пузырь. В одном варианте осуществления изобретения, мочевой пузырь представляет собой поврежденный мочевой пузырь или больной мочевой пузырь.

[0137]

«Периферическая область» почки или мочевого пузыря относится к ткани или к области, примыкающей к мочевыделительной системе или находящейся вблизи нее. Мочевыделительная система включает почки, мочеточники, мочевой пузырь и мочеиспускательный канал. Периферическая область почки или мочевого пузыря может быть, например, внутрибрюшинной или брыжеечной.

[0138]

«Введение» органоида вентральной части задней кишки в почку или мочевой пузырь или в их периферическую область относится к манипуляциям с целью помещения органоида вентральной части задней кишки в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область. Введение органоида вентральной части задней кишки в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область включает, например, трансплантацию органоида вентральной части задней кишки в геле внеклеточного матрикса в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область с помощью хирургической операции. Введение органоида вентральной части задней кишки в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область включает, например, инъекцию органоида вентральной части задней кишки в растворе в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область с помощью такого инструмента, как шприц.

[0139]

Так, например, органоид вентральной части задней кишки может быть получен из плюрипотентных стволовых клеток, происходящих от животных различных видов, не являющихся человеком, или млекопитающих, не являющихся человеком, которым он был введен в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область, или происходящих от животного того же вида или одного и того же животного. В одном варианте осуществления изобретения, способ получения органоида мочевого пузыря включает введение органоида вентральной части задней кишки, полученного из ES-клеток или iPS-клеток человека, в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область человека или млекопитающего, не являющегося человеком.

[0140]

В одном варианте осуществления изобретения, введение органоида вентральной части задней кишки в почку включает имплантацию сфероида вентральной части задней кишки под почечную капсулу мыши NOD SCID. Трансплантированный органоид вентральной части задней кишки культивируют *in vivo* в течение 4 недель при выдерживании трансплантированных мышей в течение 4 недель. Культура *in vivo* может образовывать органоид мочевого пузыря, имеющий мешкообразную структуру. В одном варианте осуществления изобретения, культивирование *in vivo* может быть проведено в течение 1-6 недель, 2-5 недель или 3-5 недель.

[0141]

В одном варианте осуществления изобретения, органоид мочевого пузыря может быть получен способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток в индукторной среде А для индуцирования дифференцировки в зрелые

клетки эндодермы; Стадию b1: культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β (индукторная среда b), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно в геле внеклеточного матрикса) с индукторной средой В (индукторная среда b1) с образованием органоидов задней кишки; и Стадию b2: культивирование органоидов задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно в геле внеклеточного матрикса) с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b2) для образования органоидов вентральной части задней кишки, и Стадию c2: введение их в почку или мочевого пузыря или в их периферическую область человека или млекопитающего, не являющегося человеком.

[0142]

В одном варианте осуществления изобретения, органоид мочевого пузыря может быть получен способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток в индукторной среде А для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы; Стадию b3: культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β , и, необязательно, дополнительно содержащей белок остеогенеза (индукторная среда b), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно, внеклеточного матрикса в качестве диспергирующего компонента) с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b3) для образования органоидов вентральной части задней кишки; и Стадию c2: введение их в почку или мочевого пузыря или в их периферическую область человека или млекопитающего, не являющегося человеком.

[0143]

Стадия c3: Совместное культивирование в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток

Стадия c3 включает культивирование органоида вентральной части задней кишки в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток с образованием органоида мочевого пузыря. Если органоид вентральной части задней кишки находится в геле внеклеточного матрикса, то Стадия c3 может дополнительно включать сбор органоида вентральной части задней кишки из геля внеклеточного матрикса перед совместным культивированием.

[0144]

Используемый здесь термин «мезенхимальная клетка» относится к клетке, происходящей из мезенхимы на эмбриональной стадии многоклеточного организма. Так, например, мезенхимальные клетки могут дифференцироваться в поддерживающие ткани, соединительные ткани, остециты, хрящевые клетки и жировые клетки. В одном варианте осуществления изобретения, мезенхимальные клетки представляют собой мезенхимальные клетки мочевого пузыря. Мезенхимальные клетки мочевого пузыря

могут быть получены, например, у млекопитающих, не являющихся человеком, в соответствии с известными способами или способами, описанными здесь в Примерах. Так, например, мезенхимальные клетки, полученные у млекопитающих, не являющихся человеком, содержат эмбриональные фибробласты. В одном варианте осуществления изобретения, эмбриональные фибробласты представляют собой эмбриональные мышечные фибробласты (MEF). Так, например, мезенхимальные клетки могут быть получены путем индуцирования дифференцировки из ES-клеток или iPS-клеток в соответствии с известными способами. Так, например, мезенхимальные клетки могут быть коммерчески доступными.

[0145]

Используемый здесь термин «мезенхимальная стволовая клетка» относится к клетке, способной к саморепликации и дифференцировке в неэпителиальные клетки, такие как клетки соединительной ткани, костные клетки, хрящевые клетки и жировые клетки, которые образуют мезенхиму. Так, например, мезенхимальные стволовые клетки могут быть получены из ES-клеток или iPS-клеток путем индуцирования дифференцировки в соответствии с известными способами. Так, например, мезенхимальные стволовые клетки могут быть коммерчески доступными. Так, например, мезенхимальные стволовые клетки могут быть взяты у живого организма известными способами. Известно, что мезенхимальные стволовые клетки присутствуют в живом организме, например, в пульпе зуба или в жидкости костного мозга.

[0146]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия с3 включает культивирование органоида вентральной части задней кишки в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток со средой для образования органоида мочевого пузыря. Среда, используемая в Стадии с3, может представлять собой, например, базальную среду, которая необязательно содержит добавки согласно изобретению. В одном варианте осуществления изобретения, среда характеризуется отсутствием добавления внеклеточного матрикса. В одном варианте осуществления изобретения, среда представляет собой среду STEMdiff APEL2 (STEMCELL Technologies) (с добавлением 2% PFHM-II и антибиотика-фунгицида) или среду STEMdiff APEL2 (STEMCELL Technologies) (с добавлением 2% PFHM-II, 2% FBS и антибиотика-фунгицида).

[0147]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия с3 включает стационарное культивирование органоидов вентральной части задней кишки в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток с последующим их культивированием в ротационной суспензии органоидов вентральной части задней кишки и мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток с образованием органоидов мочевого пузыря. Так, например, ротационное суспензионное культивирование может быть проведено с помощью устройства для трехмерного

ротаторного суспензионного культивирования CellPet 3D-iP (JTEC Corporation). Скорость вращения ротационной суспензионной культуры может быть установлена специалистом в данной области таким образом, чтобы агрегаты клеток не оседали под действием силы тяжести и не касались сосуда для культивирования. Скорость вращения может составлять, например, 1-50 об/мин., 1-30 об/мин., 1-15 об/мин., 1-10 об/мин., 2-50 об/мин., 2-30 об/мин., 2-15 об/мин., 2-10 об/мин., 3-50 об/мин., 3-30 об/мин., 3-15 об/мин. или 3-10 об/мин.

[0148]

В одном варианте осуществления изобретения, Стадия с3 включает культивирование ротационной суспензии органоида вентральной части задней кишки или органоида мочевого пузыря вместе с мезенхимальными клетками мочевого пузыря мыши E12.5 в течение более двух недель с образованием органоидов мочевого пузыря, включая эпителиальные клетки мочевого пузыря, клетки, подобные стромальным клеткам, и клетки гладких мышц, указывающие на мешковидную структуру. Так, например, культивирование в Стадии с3 может быть проведено в течение 1-6 недель, 2-5 недель или 3-5 недель.

[0149]

В одном варианте осуществления изобретения, органоид мочевого пузыря может быть получен способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток в индукторной среде А для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы; Стадию b1: культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β (индукторная среда b), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно в геле внеклеточного матрикса) с индукторной средой В (индукторная среда b1) с образованием органоидов задней кишки; и Стадию b2: культивирование органоидов задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно в геле внеклеточного матрикса) с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза (индукторная среда b2) для образования органоидов вентральной части задней кишки; и Стадию с3: культивирование этих клеток в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток.

[0150]

В одном варианте осуществления изобретения, органоид мочевого пузыря может быть получен способом, включающим Стадию А: культивирование плюрипотентных стволовых клеток в индукторной среде А для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы; Стадию b3: культивирование зрелых клеток эндодермы в индукторной среде В, содержащей фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза (индукторная среда b), а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса (предпочтительно внеклеточного матрикса в качестве диспергирующего компонента) с индукторной средой В, содержащей

фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β , белок остеогенеза (индукторная среда b3) для образования органоидов вентральной части задней кишки; и Стадию c3: их культивирование в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток.

[0151]

Определение каждого термина для каждой стадии индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы (Стадии А), образования органоида вентральной части задней кишки (Стадии В) и образования органоида мочевого пузыря (Стадии С), а также определение вариантов осуществления изобретения, включающих условия культивирования, соответствующим образом применимо к соответствующим термину и стадиям в вариантах их осуществления, соответственно.

[0152]

[Млекопитающее, не являющееся человеком и содержащее органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря или способ их получения]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу получения млекопитающего, не являющегося человеком и содержащего органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря в почке или мочевом пузыре или в их периферической области. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к млекопитающему, не являющемуся человеком и содержащему органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря в почке или в мочевом пузыре или в их периферической области.

[0153]

Не являющееся человеком млекопитающее, содержащее органоид вентральной части задней кишки в его почке или мочевом пузыре или в их периферической области, может быть получено способом, включающим введение органоида вентральной части задней кишки согласно изобретению в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область у млекопитающего, не являющегося человеком. Не являющееся человеком млекопитающее, содержащее органоид мочевого пузыря в почке или мочевом пузыре или в их периферической области, может быть получено способом, включающим введение органоида вентральной части задней кишки согласно изобретению в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область млекопитающего, не являющегося человеком, и содержание такого не являющегося человеком млекопитающего, которому был введен органоид вентральной части задней кишки согласно изобретению, в определенных условиях. Содержание не являющихся человеком млекопитающих включает, например, кормление млекопитающего, не являющегося человеком, подходящим кормом.

[0154]

В одном примере, не являющееся человеком млекопитающее, содержащее органоид вентральной части задней кишки и используемое в качестве модели рака почки или модели рака мочевого пузыря, в почке или в мочевом пузыре или в их

периферической области может быть получено путем введения опухолевых клеток или фрагментов опухоли в органоид вентральной части задней кишки согласно изобретению и введения органоида вентральной части задней кишки, включающего опухолевые клетки или фрагменты опухоли, в почку или мочевой пузырь или в их периферическую область у млекопитающего, не являющегося человеком. Не являющееся человеком млекопитающее, содержащее органоид вентральной части задней кишки в почке или мочевом пузыре или в их периферической области, и служащее в качестве модели рака почки или модели рака мочевого пузыря, может быть использовано в способе оценки взаимодействия лекарственного средства с веществом-кандидатом для лечения рака почки или рака мочевого пузыря, где указанный способ включает контактирование млекопитающего, не являющегося человеком, с веществом-кандидатом для лечения рака почки и оценку эффекта вещества-кандидата.

[0155]

[Способ оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом]

Способ оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом включает контактирование тестируемого вещества с органоидом вентральной части задней кишки, органоидом мочевого пузыря у млекопитающего, не являющегося человеком и содержащего органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря согласно изобретению, и оценку взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом в органоиде вентральной части задней кишки или в органоиде мочевого пузыря у млекопитающего, не являющегося человеком.

[0156]

Используемый здесь термин «тестируемое вещество» может означать, например, низкомолекулярное соединение, белок (например, антитело), ДНК, РНК, малую интерферирующую РНК или антисмысловый олигонуклеотид. Тестируемым веществом может быть, например, лекарственное средство для лечения расстройств или заболеваний почек или мочевого пузыря, рака почек или мочевого пузыря или его вещество-кандидат. Так, например, тестируемое вещество может представлять собой одно вещество или смесь двух или более тестируемых веществ. Тестируемое вещество предпочтительно представляет собой одно вещество.

[0157]

«Контактирование» тестируемого вещества с органоидом вентральной части задней кишки, органоидом мочевого пузыря или с млекопитающим, не являющимся человеком, относится к помещению тестируемого вещества и органоида вентральной части задней кишки, органоида мочевого пузыря или млекопитающего, не являющегося человеком, в условия, в которых они могут контактировать друг с другом. Контактирование тестируемого вещества с органоидом вентральной части задней кишки, с органоидом мочевого пузыря или с млекопитающим, не являющимся человеком, может представлять собой, например, смешивание тестируемого вещества с культуральной

средой, включающей органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря. Контактное тестирование тестируемого вещества с млекопитающим, не являющимся человеком, и содержащим органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря в почке или мочевом пузыре или в их периферической области, может быть осуществлено, например, путем перорального или парентерального введения тестируемого вещества млекопитающему, не являющемуся человеком.

[0158]

Взаимодействие лекарственного средства с тестируемым веществом включает, например, структурные или функциональные изменения в органоиде вентральной части задней кишки, вызванные тестируемым веществом. Взаимодействие лекарственного средства с тестируемым веществом включает, например, изменения концентрации тестируемого вещества под действием органоида вентральной части задней кишки.

[0159]

[Регенеративная лекарственная композиция или способ ее получения]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к регенеративной лекарственной композиции, предназначенной для лечения повреждения мочевого пузыря или заболевания мочевого пузыря.

[0160]

Используемый здесь термин «регенеративная лекарственная композиция» включает органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря согласно изобретению. Регенеративные лекарственные композиции согласно изобретению могут быть использованы для лечения повреждений мочевого пузыря или заболеваний мочевого пузыря у млекопитающих.

Так, например, регенеративная лекарственная композиция может соответствующим образом содержать фармацевтически приемлемый носитель. Используемый здесь термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому компоненту, который является безопасным для млекопитающих и имеет низкую аллергическую активность, кроме органоида вентральной части задней кишки или органоида мочевого пузыря согласно изобретению. Фармацевтически приемлемый носитель включает, например, водный или безводный растворитель, раствор (например, физиологический раствор, базальную среду или раствор клеточной суспензии), криопротектор (например, глицерин), водорастворимый полимер (например, декстран) или буфер (например, фосфатный буфер), которые являются подходящими для фармацевтического введения. Регенеративная лекарственная композиция может быть соответствующим образом приготовлена известными способами. В одном примере, регенеративная лекарственная композиция согласно изобретению может быть получена путем смешивания органоида вентральной части задней кишки или органоида мочевого пузыря согласно изобретению с фармацевтически приемлемым носителем (например, базальной средой).

[0161]

Регенеративную лекарственную композицию вводят млекопитающему, нуждающемуся в этом, например, путем хирургической имплантации в определенный участок в мочевом пузыре или путем инъекции в определенный участок в мочевом пузыре с помощью шприца или другого устройства. Для уменьшения степени отторжения трансплантата, млекопитающее, которому вводят регенеративную лекарственную композицию, предпочтительно должно относиться к тому же виду, а более предпочтительно, к тому же индивидууму, что и млекопитающее, у которого берут плюрипотентные стволовые клетки, используемые для получения органоида вентральной задней кишки или органоида мочевого пузыря.

[0162]

Термин «млекопитающее», если он относится к регенеративной лекарственной композиции, означает, например, человека и млекопитающего, не являющегося человеком. Млекопитающим, не являющимся человеком, может быть, например, грызун, такой как мышь, крыса, морская свинка, хомяк; примат, не являющийся человеком, такой как шимпанзе; парнокопытные, такие как крупный рогатый скот, козы, овцы; непарнокопытные, такие как лошадь; животные-компаньоны, такие как кролики, собаки и кошки. В одном варианте осуществления изобретения, млекопитающим является человек.

[0163]

Используемый здесь термин «повреждение мочевого пузыря» или «заболевание мочевого пузыря» может означать, например, мочевой пузырь, поврежденный в результате травмы; цистит, вызванный облучением; мочевой пузырь, поврежденный в результате диабета, ишемии и т.п.; мочевой пузырь, поврежденный в результате приема лекарственных средств, вредных для ткани мочевого пузыря; цистит, или рак мочевого пузыря.

[0164]

Регенеративная лекарственная композиция согласно изобретению может быть использована в способе лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря у млекопитающего. В одном своем варианте, настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря, где указанный способ включает введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, регенеративной лекарственной композиции, содержащей органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря согласно изобретению.

[0165]

[Способ лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря]

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря у млекопитающего. Способ лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря у млекопитающего включает введение органоида вентральной части задней кишки, органоида мочевого пузыря или регенеративного лекарственного средства согласно настоящему изобретению в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область млекопитающего, нуждающегося в

этом. В одном варианте осуществления изобретения, способ лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря у млекопитающего включает введение регенеративной лекарственной композиции согласно изобретению в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область млекопитающего, нуждающегося в этом.

[0166]

Используемый здесь термин «млекопитающее, нуждающееся в этом» относится к млекопитающему, имеющему повреждение или заболевание мочевого пузыря, или млекопитающему с подозрением на такое повреждение или заболевание. Млекопитающее, имеющее повреждение или заболевание мочевого пузыря, относится к млекопитающему, у которого медицинским работником (например, врачом) было диагностировано повреждение или заболевание мочевого пузыря в соответствии с определенными диагностическими критериями. Млекопитающим с подозрением на повреждение или заболевание мочевого пузыря, может быть, например, млекопитающее с подозрением на повреждение или заболевание мочевого пузыря, основанным на анамнезе функции организма млекопитающего (например, наличия травмы, прохождения лучевой терапии и введения лекарственного средства, повреждающего ткань мочевого пузыря) или истории болезни (например, наличия диабета, ишемии, цистита или рака мочевого пузыря). Млекопитающим согласно данному аспекту предпочтительно является человек или примат, не являющееся человеком, а более предпочтительно, человек.

[0167]

«Лечение» повреждения или заболевания мочевого пузыря включает сохранение, уменьшение или исчезновение его симптомов или состояния. Лечение повреждения или заболевания мочевого пузыря включает устранение повреждения или заболевания мочевого пузыря.

[0168]

Плюрипотентные стволовые клетки, используемые для получения органоида вентральной части задней кишки, органоида мочевого пузыря или регенеративной лекарственной композиции, вводимых млекопитающему, нуждающемуся в этом, должны относиться к одному и тому же виду или должны быть взяты от одного и того же индивидуума для уменьшения степени отторжения трансплантата. Для уменьшения степени отторжения трансплантата, млекопитающее, нуждающееся в этом, предпочтительно должно относиться к тому же виду, а более предпочтительно, к тому же индивидууму, что и млекопитающее, у которого берут плюрипотентные стволовые клетки, используемые для получения органоида вентральной части задней кишки, органоида мочевого пузыря или регенеративной лекарственной композиции.

[0169]

Используемый здесь термин «содержащий» означает включение перечисленных элементов и/или стадий и других дополнительных элементов и/или стадий. Используемый здесь термин «состоящий из» означает включение перечисленных элементов и/или стадий, но исключение других дополнительных элементов и/или стадий. Используемый

здесь термин «состоящий в основном из» означает включение перечисленных элементов и/или стадий и включение других дополнительных элементов и/или стадий при условии, что они не будут влиять на новые технические характеристики клеточного слоя, органоидов, композиций и способов. Используемый здесь термин «по существу не содержащий» допускает понятие «полностью исключаящий».

[0170]

Если это не оговорено особо, то термины и пояснения вариантов осуществления изобретения соответствующим образом применимы к аспектам и вариантам согласно изобретению.

[0171]

Конкретные примеры описаны ниже и представляют собой предпочтительные варианты осуществления изобретения, но никоим образом не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения, изложенного в формуле изобретения.

Примеры

[0172]

Материалы и методы

Были приготовлены следующие факторы роста и соединения:

Рекомбинантный человеческий/мышиний/крысиный активин А (R&D SYSTEMS, #338-AC), рекомбинантный человеческий FGF4 (R&D SYSTEMS, #7460-F4), рекомбинантный человеческий BMP4 (R&D SYSTEMS, #314-BP), рекомбинантный человеческий KGF/FGF7 (R&D SYSTEMS, #251-KG), CHIR99021 (TOCRIS, #4423), полностью транс-ретиноевая кислота (SIGMA, R2625).

[0173]

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для приготовления замороженных срезов, органоиды мочевого пузыря или трансплантаты инкубировали в течение ночи в 4% PFA при 4°C при встряхивании, а затем трижды промывали PBS(-) и помещали в раствор сахарозы. Растворы сахарозы 10%, 20% и 30% приготавливали в PBS(-) и инкубировали при 4°C до осаждения образцов на каждой стадии. Затем были приготовлены замороженные блоки органоидов мочевого пузыря путем удаления матригеля, окружающего органоиды, с помощью пинцета и погружения их в соединение OCT. Затем приготавливали срезы размером 10 мкм и инкубировали в буфере PBS(-) с добавлением 10% ослиной сыворотки и 0,3% Тритона-X (далее называемом «блокирующим буфером») в течение 1 часа при комнатной температуре для блокирования. Затем их инкубировали с первым антителом, разведенным блокирующим буфером, в течение ночи при 4°C. Затем их трижды промывали буфером PBS(-) и инкубировали со вторым антителом, разведенным PBS(-), в течение ночи при 4°C. Ядра окрашивали DAPI. Затем ядра трижды промывали PBS(-), заливали реагентом FluorSave Reagent (Millipore, #345789) и исследовали под конфокальным микроскопом (ZEISS, LSM800).

[0174]

[Пример 1] Получение органоидов вентральной части задней кишки

На Фигуре 1 представлена блок-схема, иллюстрирующая продуцирование органоидов мочевого пузыря согласно одному варианту осуществления изобретения. На фигуре 1 показана Стадия А для индуцирования дифференцировки человеческих iPS-клеток в зрелые клетки эндодермы, Стадия b1 для индуцирования дифференцировки зрелых клеток эндодермы в органоиды задней кишки, Стадия b2 для индуцирования дифференцировки органоидов задней кишки в органоиды вентральной части задней кишки и Стадия c1 для индуцирования дифференцировки органоидов вентральной части задней кишки в органоиды, подобные мочевому пузырю. Стадия В, включая Стадию b1 и Стадию b2, индуцирует дифференцировку в вентральную часть задней кишки. В примере 1 описано получение органоидов вентральной части задней кишки путем проведения Стадии А, Стадии b1 и Стадии b2.

[0175]

Предварительное культивирование iPS-клеток человека

iPS-клетки человека (штамм 1502.3, предоставленный доктором Melissa Little, Детского Научно-исследовательского Института Мердока) выдерживали и культивировали в среде StemFit AK02N (REPROCELL) на поверхности культурального планшета, покрытой iMatrix-511 (nippi). Клетки очищали с помощью TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) для получения клеточной суспензии. Суспензию клеток центрифугировали при 200 об./сек. в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем супернатант удаляли и осадок ресуспендировали в StemFit AK02N (10 мкМ Y-27632). К суспензии добавляли iMatrix-511 (nippi) в количестве 0,25 мкг/см², клетки высевали при плотности 60000 клеток/см² на 6-луночный планшет (Corning) и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение одного дня.

[0176]

Стадия А: Индуцирование дифференцировки в зрелые клетки эндодермы

Культуральную среду заменяли на индукторную среду А, среду STEMdiff APEL2 (STEMCELL Technologies), дополненную 100 нг/мл активина А, 1 мкМ CHIR99021, 2% PFHM-II и антибиотика-фунгицида, и клетки культивировали в течение трех дней для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы. Среду заменяли ежедневно через каждые 2 дня. iPS-клетки человека собирались в колонии на 1-й день после индуцирования дифференцировки, но начинали размножаться за пределами колоний на 2-й день после индуцирования дифференцировки. На 3-й день после индуцирования дифференцировки, клетки пролиферировались в виде пластин и достигали 100%-ной конфлюэнтности. Были индуцированы клетки, которые по своей структуре напоминали брусчатку, типичную для эмбриональной эндодермы.

[0177]

Стадия b1: Индуцирование дифференцировки задней кишки

После индуцирования эмбриональной эндодермы (на 3-й день после индуцирования дифференцировки), индукторную среду А заменяли на индукторную

среду b1, среду STEMdiff APEL2 (с добавлением 200 нг/мл FGF4, 8 мкМ CHIR99021, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM II и антибиотика-фунгицида), а зрелые клетки эндодермы, индуцированные дифференцировкой, культивировали в течение четырех дней.

[0178]

На 7-й день после индуцирования дифференцировки, в чашки диаметром 35 мм собирали плавающие сфероиды. Затем оставшиеся сфероиды в лунках, из которых были собраны плавающие сфероиды, флотировали пипетированием среды над сфероидными и собирали в ту же чашку диаметром 35 мм.

[0179]

Восстановленный фактор роста на матрикеле (Corning) (концентрация белка 10 мг/мл) разводили до 50% концентрации в индукторной среде b1, добавляли в прозрачную ПЭТ-мембрану вставки для культивирования клеток в 24-луночной планшете с размером пор 8,0 мкм (Corning) в количестве 50 мкл/лунку и инкубировали при 37°C в течение 30 мин до образования геля. Затем собранные 40-50 сфероидов добавляли к 50% раствору матрикеля объемом 50 мкл и перемешивали. Всю смесь добавляли к гелеобразному 50% матрикелю и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 30 минут для образования геля и получения геля-вставки для культивирования клеток. Индукторную среду b1 добавляли поверх геля вставки для культивирования клеток в количестве 200 мкл и под гель в количестве 300 мкл, и гель инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение четырех дней. Среду заменяли ежедневно при 2D-культивировании и через каждые два дня при 3D-культивировании. Сфероиды в 50% матрикеле росли при культивировании в индукторной среде b1 и образовывали слегка округлые трубчатые клеточные структуры (органойды задней кишки).

[0180]

Стадия b2: Вентрализация задней кишки

После индуцирования дифференцировки задней кишки (на 11-й день после индуцирования дифференцировки), индукторную среду b1 заменяли на индукторную среду b2, среду STEMdiff APEL2 (с добавлением 30 нг/мл BMP4, 200 нг/мл FGF4, 8 мкМ CHIR99021, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II и антибиотика-фунгицида), и заднюю кишку, индуцированную в геле вставки для культивирования клеток, культивировали в течение трех дней для вентрализации задней кишки. Индукторную среду b2 добавляли поверх геля вставки для культивирования клеток в количестве 200 мкл и под гель в количестве 300 мкл, и среду заменяли через каждые два дня. При культивировании в среде для вентрализации задней кишки, органойды задней кишки росли медленно и приобретали сферическую клеточную структуру (органойды вентральной части задней кишки).

[0181]

Органойды вентральной части задней кишки (на 14-й день индуцирования дифференцировки) подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию антителами, перечисленными в нижеследующей таблице.

[Таблица 1]

Антитело	No. по каталогу	Поставщик
Кроличье моноклональное антитело против P63 (EPR5701)	ab124762	Abcam
Мышиное моноклональное антитело против CDX2 (CX2-88)	MU392A-UC	BioGeneX
Козье поликлональное антитело против SOX2	AF2018	R&D systems
Крысиное моноклональное антитело против цитокератина-8 (TROMA-1)	TROMA-1	Developmental Studies Hybridoma Bank
Конъюгированное с Alexa Fluor 488 ослиное антитело против мышиных IgG	A21202	Life Technologies
Конъюгированное с Alexa Fluor 568 ослиное антитело против кроличьих IgG	A10042	Life Technologies
Конъюгированное с Alexa Fluor 647 ослиное антитело против козьих IgG	A21447	Life Technologies
Конъюгированное с Alexa Fluor 488 ослиное антитело против крысиных IgG	A21208	Life Technologies

[0182]

Органоиды вентральной части задней кишки экспрессировали маркер вентральной части задней кишки P63, слабо экспрессировали или не экспрессировали маркеры дорсальной части задней кишки CDX2 и SOX2, соответственно, и экспрессировали маркер кишечного эпителия KRT8. ОТ-ПЦР также показала, что транскрипция HOXA13, маркера заднего отдела кишечного тракта и области клоаки, увеличивалась. Эти результаты систематизированы в нижеследующей таблице.

[Таблица 2]

	Ранние органоиды задней кишки	Органоиды задней кишки	Органоиды вентральной части задней кишки
Дни после индуцирования дифференцировки	9 дней	11 дней	14 дней
P63	+	++	+++
CDX2	+++	+++	+
SOX2	++	+	-

KRT8	++	+++	++
HOXA13	-	-	++

+++ : Высокий уровень экспрессии

++ : Высокий уровень экспрессии в некоторых клетках или наличие экспрессии

+ : экспрессия в некоторых клетках или слабая экспрессия

- : Отсутствие увеличения экспрессии или отсутствие экспрессии

[0183]

[Сравнительный пример 1]

Индукция дифференцировки в кишечноподобные органоиды (SATB2-позитивные)

В стадии b2 Примера 1, органоиды задней кишки в геле-вставке для клеточных культур, полученном в стадии b1, культивировали в среде STEMdiff APEL2 (с добавлением 100 нг/мл BMP2, 100 нг/мл EGF, 500 нг/мл RSP01 и 0,1 мкМ ретиноевой кислоты) в течение 21 дня для индукции дифференцировки кишечноподобных органоидов (SATB2-позитивных).

[0184]

Органоиды, подобные кишечнику, экспрессировали маркер SATB2 толстой или прямой кишки (фиг. 2a). Органоиды, подобные кишечнику, частично экспрессировали маркер средней/задней кишки CDX2 и экспрессировали маркер эпителиальной ткани ECAD (фиг. 2b и 2c). Флуоресцентные изображения SATB2, CDX2, ECAD и ядерного маркера DAPI (фиг. 2d) показали, что клетки определенного типа не образуют структуры клеточного слоя, в котором они были обычно локализованы.

[0185]

Органоиды, подобные кишечнику и полученные как описано в Сравнительном примере 1, также экспрессировали маркер вентральной части задней кишки/клоаки P63, маркер эпителия мочевого пузыря UPK2 и маркер эпителия мочевого пузыря KRT5. Результаты, касающиеся P63, UPK2 и KRT5, также показали, что кишечноподобные органоиды, полученные как описано в Сравнительном примере 1, не имели структуры клеточного слоя, в котором обычно локализовались клетки определенного типа.

[0186]

В Сравнительном примере 1 использовали комбинацию дополнительных агентов (BMP2, EGF, RSP01 и ретиноевую кислоту), отличающуюся от комбинации дополнительных агентов (BMP4, FGF4 и CHIR99021), используемой в стадии b2 Примера 1. Клеточные структуры, полученные в Сравнительном примере 1, не имели структуры клеточного слоя, в которой были обычно локализованы клетки определенного типа, такие как органоиды вентральной части задней кишки, полученные в Примере 1.

[0187]

Клеточные структуры, полученные при использовании других комбинаций дополнительных агентов (комбинации EGF, RSP01 и ретиноевой кислоты; комбинации EGF, RSP01, ретиноевой кислоты и Ноггина; комбинации EGF, RSP01, ретиноевой

кислоты, Ноггина и FGF7; и комбинации EGF, RSP01, ретиноевой кислоты, BMP2 и FGF7), отличающихся от комбинации дополнительных агентов (BMP4, FGF4 и CNR99021), используемых в стадии b2 Примера 1, не имеют структуры клеточного слоя, в которой обычно были локализованы клетки конкретных типов, такие как органоиды вентральной части задней кишки, полученные в Примере 1.

[0188]

[Пример 2] Получение органоидов, подобных мочевому пузырю

Стадия c1: Индуцирование дифференцировки эпителия мочевого пузыря

После вентральной части задней кишки (на 14-й день после индуцирования дифференцировки), индукторную среду b2 заменяли на индукторную среду C, среду STEMdiff APEL2 (с добавлением 30 нг/мл BMP4, 100 нМ полностью транс-ретиноевой кислоты, 100 нг/мл FGF7, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II и антибиотика-фунгицида). Сферические клеточные структуры культивировали в течение шести дней для индуцирования дифференцировки эпителиальных клеток мочевого пузыря. Индукторную среду C добавляли поверх геля вставки для культивирования клеток в количестве 200 мкл и под гель в количестве 300 мкл, и среду заменяли через каждые два дня. Индуцированные органоиды, подобные мочевому пузырю, имели сферическую форму.

[0189]

Органоиды, подобные мочевому пузырю, подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию. В примере 2 и описанном ниже примере 3, для иммунофлуоресцентного окрашивания использовали следующие антитела. Первые антитела, используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания, представляли собой: мышинные антитела против уроплакина II (1:100, BIOCARE MEDICAL, #ACR3051C), кроличьи антитела против P63 (1:100, Abcam, #ab124762), куриные антитела против кератина 5 (1:300), BioLegend, #905903), козьи антитела против ECAD (1:300, R&D SYSTEMS, #AF648). Вторые антитела, используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания, представляли собой: конъюгированное с Alexa Fluor 488 ослиное антитело против мышинных IgG (1:400, Life Technologies, #A21202), конъюгированное с Alexa Fluor 568 ослиное антитело против кроличьих IgG (1:400, Life Technologies, #A10042), конъюгированное с Alexa Fluor 647 ослиное антитело против козьих IgG (1:400, Life Technologies, #A21447), конъюгированное с Alexa Fluor 647 ослиное антитело против куриных IgY (1:400, Jackson ImmunoResearch, #703-606-155).

[0190]

Органоид, подобный мочевому пузырю, экспрессировал маркер эпителиальной ткани ECAD (фиг. 3e). Органоид, подобный мочевому пузырю, экспрессировал эпителиальные маркеры мочевого пузыря, UPK2 (фиг. 3a), P63 (фиг. 3b) и KRT5 (фиг. 3c). На фигурах 3a и 3d, сигналы, наблюдаемые на самой внешней периферии органоидов, подобных мочевому пузырю, являются неспецифическими сигналами, полученными на матригеле. На фиг. 3d, флуоресцентное наложение UPK2, P63 и KRT5, указывало на органоид, подобный мочевому пузырю, в котором клетки, подобные базальным клеткам,

совместно экспрессирующим P63 и KRT5, были локализованы вдоль самой внешней периферии органоида. Промежуточные клетки, подобные клеткам, коэкспрессирующим P63 и UPK2, локализованы внутри области, где локализованы клетки, подобные KRT5-базальным клеткам, а клетки, подобные поверхностным клеткам, экспрессирующим UPK2, но не экспрессирующим P63, локализованы внутри области, где локализованы клетки, подобные промежуточным клеткам. Слоистая структура клеток этих типов в органоидах, подобных мочевому пузырю, сходна со структурой развивающегося эпителия мочевого пузыря *in vivo* (фиг. 5g). Поскольку Krt5-базальные клетки, экспрессирующие KRT5, представляют собой тип клеток, которые появляются на поздней стадии развития мочевого пузыря, то тот факт, что органоид, подобный мочевому пузырю, имел небольшое количество KRT5-экспрессирующих клеток, позволяет предположить, что индуцированный органоид, подобный мочевому пузырю, находится в незрелом состоянии.

[0191]

[Сравнительный пример 2]

Органоид задней кишки индуцировали и дифференцировали в эпителий мочевого пузыря таким же образом, как описано в Примере 2, за исключением использования индукторных сред b2 и C, из которых удаляли BMP4. Клеточные структуры, полученные как описано в Сравнительном примере 2, подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию, как и в Примере 2. Клеточные структуры, полученные как описано в Сравнительном примере 2, экспрессировали маркер эпителия мочевого пузыря P63 (фиг. 4b) и маркер эпителиальной ткани ECAD (фиг. 4c), как и органоиды, подобные мочевому пузырю и полученные как описано в Примере 2. Однако, клеточные структуры, полученные как описано в Сравнительном примере 2, не экспрессировали маркер эпителия мочевого пузыря UPK2, как это наблюдалось в органоидах, подобных мочевому пузырю и полученных как описано в Примере 2 (фиг. 3a и фиг. 4a). На фигуре 4a, сигнал, наблюдаемый на самой внешней периферии органоида, подобного мочевому пузырю, представляет собой неспецифический сигнал, полученный на матригеле. Таким образом, клеточные структуры, полученные как описано в Сравнительном примере 2, не имеют структуры клеточного слоя, наблюдаемой в органоидах, подобных мочевому пузырю и полученных как описано в Примере 2.

[0192]

[Пример 3] Получение органоидов мочевого пузыря *in vivo*

Предварительное культивирование iPS-клеток человека

iPS-клетки человека предварительно культивировали так же, как описано в Примере 1, за исключением того, что клетки высевали при плотности 90000 клеток/см² на 6-луночный планшет.

Стадия А: Индуцирование дифференцировки в зрелые клетки эндодермы

iPS-клетки человека индуцировали и дифференцировали в зрелые клетки эндодермы так же, как описано в Примере 1.

Стадия b1: Индуцирование дифференцировки задней кишки

Индуцирование дифференцировки задней кишки проводили, по существу, таким же образом, как это описано в Примере 1, за исключением того, что гель-вставку для культивирования клеток приготавливали путем разведения восстановленного на матрикеле фактора роста (Corning) (концентрация белка 10 мг/мл) в индукторной среде b1 до концентрации 2,5 мг/мл и до образования геля, и такая гель-вставка содержала 90-100 сфероидов, полученных путем двухмерного культивирования зрелых клеток эндодермы.

[0193]

Стадия b2: Вентрализация задней кишки

После индуцирования дифференцировки задней кишки (на 11-й день после индуцирования дифференцировки), индукторную среду b1 заменяли на индукторную среду b2, среду STEMdiff APEL2 (с добавлением 30 нг/мл BMP4, 100 нг/мл FGF7, 200 нг/мл FGF4, 8 мкМ CHIR99021, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II и антибиотика-фунгицида), и гель-вставку для культивирования клеток инкубировали в течение трех дней для вентрализации задней кишки. Индукторную среду b2 объемом 500 мкл добавляли под гель-вставку для культивирования клеток, и среду заменяли через каждые два дня.

[0194]

Стадия c2: Трансплантация под почечную капсулу мышам с ослабленным иммунитетом

После вентрализации задней кишки (на 14-й день после индуцирования дифференцировки), гель-вставку для культивирования клеток вырезали из прозрачной ПЭТ-мембраны вставки для культивирования клеток и помещали на чашку диаметром 35 мм. Затем органоиды вентральной части задней кишки удаляли из матрикеля при концентрации 2,5 мг/мл с помощью пинцета под стереомикроскопом.

[0195]

Мембрану почки 4-недельного самца мыши NOD SCID JAX (Oriental Yeast Co., Ltd.) разрезали лезвием под ингаляционной анестезией изофлураном (1,3-1,4% изофлураном, 190-200 мл/мин.) и органоид вентральной части задней кишки был имплантирован между почечной мембраной и почечной паренхимой. Фиксированные трансплантаты замораживали и приготавливали замороженные срезы. Замороженные срезы подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию и окрашиванию H&E.

[0196]

Трансплантированный органоид вентральной части задней кишки приобретал клеточную структуру (органоида мочевого пузыря), а именно, мешкообразную структуру, имеющую просвет, после четырех недель трансплантации, подобно живому мочевому пузырю. Органоид мочевого пузыря содержал клетки, экспрессирующие эпителиальные маркеры мочевого пузыря UPK2 (фиг. 5a), P63 (фиг. 5b) и KRT5 (фиг. 5c), которые образовывали структуру, аналогичную слоистой структуре зрелого мочевого пузыря *in vivo* (фиг. 5g). В частности, органоид мочевого пузыря имел клетки, подобные Krt5-

базальным клеткам, совместно экспрессирующим P63 и KRT5, локализованные на самой внешней периферии мешковидной клеточной структуры (фиг. 5e). Кроме того, несколько клеток, подобных промежуточным клеткам, коэкспрессирующим UPK2 и P63, присутствовали внутри области, где были локализованы клетки, подобные KRT5-базальным клеткам (фиг. 5f). Кроме того, клетки, подобные поверхностным клеткам, экспрессирующим UPK2, но не экспрессирующим ни P63, ни KRT5, были локализованы внутри области, где были локализованы клетки, подобные промежуточным клеткам, и в области, обращенной к просвету органоида мочевого пузыря (фиг. 5e и f).

[0197]

В Примерах 2 и 3 показано, что можно индуцировать множество типов эпителиальных клеток мочевого пузыря, и что клеточные структуры имеют слоистую структуру, состоящую из этих эпителиальных клеток мочевого пузыря множества типов. В Примерах 2 и 3 показано, что были получены трехмерные структуры, подобные мочевому пузырю и состоящие из эпителиальных клеток мочевого пузыря нескольких видов. Сравнение системы индуцирования *in vitro* (Пример 2) с системой индуцирования *in vivo* (Пример 3) для дифференцировки органоидов задней кишки позволяет предположить, что система индуцирования-дифференцировки, в которой органоиды вентральной части задней кишки могут быть культивированы в течение длительного периода времени или в присутствии клеток, подобных мезенхиме *in vivo*, имеет мешковидный просвет, и является предпочтительной для созревания.

[0198]

[Пример 4] Получение органоидов вентральной части задней кишки

На фигуре 6 представлена блок-схема, где показана культура для получения органоидов мочевого пузыря. На фигуре 6 показана Стадия А для индуцирования дифференцировки iPS-клеток человека в зрелые клетки эндодермы, Стадия b3 для индуцирования дифференцировки зрелых клеток эндодермы в органоиды вентральной части задней кишки и Стадия c3 для индуцирования дифференцировки из органоидов вентральной части задней кишки в органоиды мочевого пузыря путем совместного культивирования с мезенхимальными клетками или мезенхимальными стволовыми клетками. Дни, указанные в верхней части фигуры 6, представляют количество дней, необходимых для репрезентативного индуцирования дифференцировки согласно одному варианту осуществления изобретения. В Примере 4 осуществляют Стадию А и Стадию b3 для получения органоидов вентральной части задней кишки.

[0199]

Предварительное культивирование iPS-клеток человека

iPS-клетки человека предварительно культивировали так же, как описано в Примере 1, за исключением того, что клетки высевали при 45000 клеток/см² на 6-луночный планшет.

Стадия А: Индуцирование дифференцировки в зрелые клетки эндодермы

iPS-клетки человека индуцировали и дифференцировали в зрелые клетки

энтодермы так же, как описано в Примере 1, за исключением изменения концентрации дополнительного агента CHIR99021 в индукторной среде А, среде STEMdiff APEL2, с 1 мкМ до 1,25 мкМ.

[0200]

Стадия b3: Индуцирование дифференцировки вентральной части задней кишки

После индуцирования дифференцировки эмбриональной энтодермы (на 3-й день после индуцирования дифференцировки), индукторную среду А заменяли на индукторную среду b3, среду STEMdiff APEL2 (с добавлением 10 нг/мл BMP4, 200 нг/мл FGF4, 4 мкМ CHIR99021, 1 мкг/мл гепарина, 2% PFHM-II и антибиотика-фунгицида), а зрелые клетки энтодермы, индуцированные дифференцировкой, культивировали в течение трех дней.

[0201]

На 5-й день после индуцирования дифференцировки начинали культивирование при встряхивании со скоростью 100 об/мин. Затем на 6-й день после индуцирования дифференцировки собирали плавающие сфероиды в чашки диаметром 35 мм. Затем оставшиеся сфероиды в лунках, из которых были собраны плавающие сфероиды, флотировали пипетированием среды над сфероидами и собирали в ту же 35 мм-чашку. Собранные сфероиды хранили на льду.

[0202]

Восстановленный фактор роста на матрикеле (Corning) (концентрация белка 10 мг/мл) разводили до 50% концентрации в индукторной среде b3, добавляли в прозрачную ПЭТ-мембрану вставки для культивирования клеток в 24-луночный планшет с размером пор 8,0 мкм (Corning), при 50 мкл/лунку и инкубировали при 37°C в течение 30 минут до образования геля. Затем собранные 60-70 сфероидов добавляли к 50% раствору матрикеля объемом 50 мкл и перемешивали. Смесь добавляли поверх гелеобразного 50% матрикеля и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение 30 минут для образования геля и получения геля-вставки для культивирования клеток. Индукторную среду b3 добавляли поверх геля-вставки для культивирования клеток в количестве 200 мкл и под гель в количестве 300 мкл, и гель инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение восьми дней (до 14 дня после индуцирования дифференцировки). Среду заменяли ежедневно при 2D-культивировании и каждые два дня при 3D-культивировании. Сфероиды в 50% матрикеле росли при культивировании в индукторной среде b3 и образовывали округлые клеточные структуры, имеющие просвет (органойды вентральной части задней кишки).

[0203]

Органойды вентральной части задней кишки на 11-й и 14-й день после индуцирования дифференцировки подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию. В Примерах 4 и 5 для иммунофлуоресцентного окрашивания использовали следующие антитела.

Первые антитела, используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания, представляли собой: мышинное антитело против CDX2 (1:100, BioGenex, #MU392-UC),

мышинное антитело против FOXA2 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, #sc-101060), кроличье антитело против GATA3 (1:100, Cell Signaling, #5852S), козье антитело против GATA3 (1:100, R&D Systems, #AF2605), мышинное антитело против ISL1&2 (1:100, DSHB, #39.4D5), козье антитело против SOX2 (1:100, R&D Systems, #AF2018), кроличье антитело против SATB2 (1:100, CELL MARQUE, #384R-14), кроличье антитело против HOXA13 (1:200, Abcam, #ab106503), козье антитело против ZO1 (1: 100, ThermoFisher, #PA5-19090), кроличье антитело против pSmad1/5/8 (1:100, Cell signaling, #13820), крысиное антитело против CK8 (1:200, DSHB, #TROMA-1), мышинное антитело против уроплакина II (1:100, BIOCARE MEDICAL, #ACR3051C), кроличье антитело против Δ NP63 (1:100, Cell signaling, #67825), кроличье антитело против P63 (1:100, Abcam, #ab124762), куриное антитело против кератина 5 (1:300, Bio Legend, #905903), мышинное антитело против ECAD (1:200, BD Transduction Laboratories, #610181), козье антитело против ECAD (1:300, R&D SYSTEMS, #AF648), куриное антитело против виментина (1:300, NOVUS, #NB300-223), кроличье антитело против α SMA (1:100, Cell signaling, #19245T).

[0204]

Вторые антитела, используемые для иммунофлуоресцентного окрашивания, представляли собой: конъюгированное с Alexa Fluor488 ослиное антитело против мышинных IgG (1:400, Life Technologies, #A21202), конъюгированное с Alexa Fluor568 ослиное антитело против кроличьих IgG (1:400, Life Technologies, #A10042), конъюгированное с Alexa Fluor647 ослиное антитело против козьих IgG (1:400, Life Technologies, #A21447), конъюгированное с Alexa Fluor647 ослиное антитело против куриных IgY (1:400, Jackson ImmunoResearch, #703-606-155).

[0205]

Органоиды задней кишки не имели просветных структур после индуцирования дифференцировки задней кишки (на 11-й день после индуцирования дифференцировки) на стадии b1 в Примере 1 (фиг. 7a). Органоиды вентральной части задней кишки имели просветные структуры на 5-й день после индуцирования дифференцировки вентральной части задней кишки (на 11-й день после индуцирования дифференцировки) на стадии b3 в Примере 4 (фиг. 7b). Органоиды как задней кишки, так и вентральной части задней кишки экспрессировали эпителиальные маркеры KRT8 и ECAD (фиг. 7a1, a10, b1 и b10). Органоиды задней кишки слабо экспрессировали маркер вентральной части задней кишки GATA3 (Fig. 7a2), в то время как органоиды вентральной части задней кишки экспрессировали этот маркер на высоком уровне (фиг. 7b2). Органоиды задней кишки экспрессировали маркеры дорсальной части задней кишки SOX2, CDX2 и T (фиг. 7a3 и a5-a7), а органоиды вентральные части задней кишки не экспрессировали эти маркеры (фиг. 7b3 и b5-b7). Органоиды задней кишки не экспрессировали кишечный маркер FOXA2 (фиг. 7a9), а органоиды вентральной части задней кишки экспрессировали эти маркеры (фиг. 7b9). Таким образом, органоиды задней кишки до вентрализации задней кишки на стадии b2 в Примере 1 не имели просветной структуры и экспрессировали маркеры дорсальной части задней кишки (SOX2, CDX2 и T), в то время как эти органоиды

слабо экспрессировали или вообще не экспрессировали маркеры вентральной части задней кишки (GATA3) и кишечные маркеры (FOXA2) (фиг. 7a). И напротив, органоиды вентральной части задней кишки во время индуцирования дифференцировки вентральной части задней кишки на Стадии b3 в Примере 4 имели просветные структуры и не экспрессировали маркер дорсальной части задней кишки, но экспрессировали маркер вентральной части задней кишки и маркер кишечника (фиг. 7b).

[0206]

На 8-й день индуцирования дифференцировки вентральной части задней кишки на Стадии b3 в Примере 4 (на 14-й день после индуцирования дифференцировки), органоиды вентральной части задней кишки подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию и исследовали под микроскопом (фиг. 8). Органоиды вентральной части задней кишки также экспрессировали маркер эпителиальной ткани ECAD (Fig. 8d3) и маркер плотных соединений ZO1 (фиг. 8c3). Органоиды вентральной части задней кишки экспрессировали ранние маркеры кишечного эпителия FOXA2 (фиг. 8b1) и CK8 (фиг. 8c1), а также маркеры вентральной части задней кишки GATA3 (фиг. 8a3, b3 и e1), ISL1 (фиг. 8d1), SATB2 (фиг. 8c2) и ΔNP63 (фиг. 8b2). Органоиды вентральной части задней кишки также экспрессировали маркер вентральной части области клоаки фосфо-Smad1/5/8 (Fig. 8d2) и NOXA13, маркер заднего отдела кишечного тракта и области клоаки (фиг. 8f2). С другой стороны, органоиды вентральной части задней кишки почти не экспрессировали маркеры дорсальной части задней кишки CDX2 (фиг. 8a1 и f1) и SOX2 (фиг. 8a2 и e2). Кроме того, органоиды вентральной части задней кишки не экспрессировали ни клетки-предшественники эпителия мочевого пузыря UPK2 (фиг. 8e3), ни маркер эпителиальных клеток мочевого пузыря KRT5 (фиг. 8f3). Эти результаты свидетельствуют о том, что органоиды вентральной части задней кишки, имеющие просветные структуры, образуются при культивировании в индукторной среде b3c в течение восьми дней (на 14-й день после индуцирования дифференцировки). Результаты также указывают на образование клеток, подобных клеткам вентральной части задней кишки/клоаки, прежде чем стать эпителиальными клетками-предшественниками мочевого пузыря.

[0207]

[Пример 5] Получение органоидов мочевого пузыря *in vitro*

В Примере 5 описаны стадии A, b3 и c3, показанные на фиг. 6, для получения органоидов мочевого пузыря *in vitro*. На стадии C Примера 5, органоиды вентральной части задней кишки, полученные на стадии b3, культивировали *in vitro* с мезенхимальными клетками мочевого пузыря, происходящими от мышей E12.5 (стадия c3).

[0208]

Предварительное культивирование iPS-клеток человека

iPS-клетки человека предварительно культивировали так же, как в Примере 4.

Стадия A: Индуцирование дифференцировки в зрелые клетки эндодермы

iPS-клетки человека индуцировали и дифференцировали в зрелые клетки

эндодермы таким же образом, как это описано в Примере 4.

Стадия b3: Индуцирование дифференцировки вентральной части задней кишки

Зрелые клетки эндодермы индуцировали и дифференцировали в органоиды вентральной части задней кишки так же, как это описано в Примере 4.

[0209]

Стадия c3: Индуцирование дифференцировки эпителия мочевого пузыря путем совместного культивирования

Получение мезенхимальных клеток мочевого пузыря мыши E12.5

Мышь ICR была подвергнута эвтаназии путем вывиха позвоночника на 12-й день беременности. Оболочки плода, содержащие плод, удаляли у мыши ICR и помещали в охлажденный льдом 10% буфер FBS/PBS(-). Плод извлекали из оболочек плода пинцетом, а затем вырезали плаценту. Затем верхнюю половину тела плода отрезали пинцетом, чтобы обнажить область мочевого пузыря, и брали область от мочевого пузыря до уретры. Собранную область, включая мочевой пузырь и уретру, помещали в 200 мкл буфера для диссоциации (диспазы: Corning #354235, 1 мг/мл ДНКазы I: Sigma-Aldrich #11284932001) и инкубировали при 37°C в течение 1 минуты. Затем, область дважды разводили охлажденной льдом средой M2 объемом 3 мл и выдерживали на льду в течение 10 минут. Затем пинцетом и стеклянной иглой собирали мезенхимальные клетки мочевого пузыря непосредственно выше места прикрепления мочеточника и собирали в пробирку объемом 1,5 мл. Далее в пробирку добавляли нагретый до 37°C буфер TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific) в концентрации 200 мкл. Тест-пробирку инкубировали при 37°C в течение 3 минут, а затем проводили пипетирование для разделения ткани на отдельные клетки. Затем, в пробирку добавляли 1 мл DMEM (с добавлением 10% FBS, GultaMAX-I и антибиотика-фунгицида) для прекращения ферментативной реакции. Пробирку центрифугировали при 300 об./сек. в течение 3 минут и супернатант удаляли. К осадку добавляли 250 мкл реагента STEM-CELLBANKER класса GMP (ZENOQ #CB045) и ресуспендировали. Клеточную суспензию переносили в пробирку для криоконсервации и хранили при -80°C.

[0210]

Совместное культивирование с мезенхимальными клетками мочевого пузыря мыши E12.5

Органоиды вентральной части задней кишки отделяли от геля внеклеточного матрикса (50% Matrigel), полученного на стадии b3 путем пипетирования, и помещали на лед.

[0211]

Криоконсервированные мезенхимальные клетки мочевого пузыря мыши E12.5 оттаивали на водяной бане при 37°C и суспендировали в среде STEMdiff APEL2 объемом 1 мл. Полученную суспензию клеток центрифугировали при 300 об./сек. в течение 3 минут и супернатант удаляли. К осадку добавляли среду STEMdiff APEL2 в количестве 200 мкл и ресуспендировали. Полученную клеточную суспензию оценивали для подсчета

клеток, и клеточную суспензию высевали на планшет PrimeSurface® 96V (Sumitomo Bakelite Co. Ltd., #MS-9096V) в количестве 25000 клеток/лунку. Планшет центрифугировали при 200 об./сек. в течение 5 минут.

[0212]

Органоиды вентральной части задней кишки, отделенные от матригеля, высевали по одному на лунку планшета и оставляли вплоть до их осаждения. Затем в каждую лунку добавляли клеточную суспензию в количестве 25000 клеток/лунку, и планшет центрифугировали при 200 об./сек. в течение 5 минут. Органоиды вентральной части задней кишки инкубировали с мезенхимальными клетками мочевого пузыря при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в течение одного дня. Затем агрегаты клеток в комбинации переносили из лунок планшета в контейнер, а контейнер помещали на вращающееся 3D-устройство для суспензионных культур CellPet 3D-iP (JTEC Corporation). Агрегаты клеток в комбинации культивировали в среде STEMdiff APEL2 (STEMCELL Technologies) с добавлением 2% PFHM-II и антибиотика-фунгицида или в среде STEMdiff APEL2 (STEMCELL Technologies) с добавлением 2% PFHM-II, 2% FBS и антибиотика-фунгицида на CellPet 3D-iP при 37°C и 5% CO₂ в течение 11 дней для индуцирования органоидов мочевого пузыря (на 24-й день после индуцирования дифференцировки).

[0213]

Органоиды мочевого пузыря наблюдали под микроскопом в ярком поле на 7-й день совместного культивирования с органоидами вентральной части задней кишки и мезенхимальными клетками мочевого пузыря на стадии c3 (на 20-й день после индуцирования дифференцировки) (фиг. 9). На органоидах мочевого пузыря наблюдалась двойная структура, состоящая из эпителиальной структуры и просветной структуры (фиг. 9a-c). Даже в тех случаях, когда двойная структура явно не наблюдалась в ярком поле (фиг. 9d), флуоресцентное окрашивание позволяло наблюдать двойную структуру.

[0214]

Органоиды мочевого пузыря имели сферическую форму и структуру просвета на 11-й день после совместного культивирования на Стадии c3 (на 24-й день после индуцирования дифференцировки). Органоид мочевого пузыря подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию и наблюдали под микроскопом (фиг. 10). Органоид мочевого пузыря включает просвет, слой клеток, экспрессирующих маркер эпителиальных клеток ECAD, слой клеток, экспрессирующих ECAD, обращенный к просвету (фиг. 10b1), и слой клеток, экспрессирующих маркер мезенхимальных клеток VIM, где клеточный слой находится снаружи от слоя клеток, экспрессирующих ECAD (фиг. 10b3 и b5). Органоид мочевого пузыря включал слой клеток, окрашенных DAPI и расположенных снаружи от слоя клеток, экспрессирующих ECAD (фиг. 10c1), и слой клеток, экспрессирующих маркер клеток гладких мышц α SMA, расположенных снаружи от клеточного слоя, окрашенного DAPI (фиг. 10c2 и c4). Эти результаты показали, что органоиды мочевого пузыря содержат просвет; ECAD-экспрессирующий слой эпителиальных клеток, обращенный к просвету; слой клеток, подобных стромальным

клеткам, и экспрессирующих VIM и расположенных снаружи от слоя эпителиальных клеток; и слой клеток гладких мышц, экспрессирующих α SMA и расположенных снаружи от слоя клеток, подобных стромальным клеткам.

[0215]

Клетки клеточного слоя ECAD в органоиде мочевого пузыря коэкспрессировали человеческий ламин B1 (hLNB) (фиг. 10b2 и b). Этот результат указывает на то, что эпителиальные клетки органоида мочевого пузыря происходят из iPS-клеток человека. Следовательно, органоид мочевого пузыря имеет просвет; слой эпителиальных клеток, происходящий из iPS-клеток человека и обращенный к просвету; слой клеток, подобных стромальным клеткам и полученных из мезенхимальных клеток мочевого пузыря мышцы и расположенных снаружи от эпителиального клеточного слоя; и слой клеток гладких мышц, полученных из мезенхимальных клеток мышцы и расположенных снаружи от слоя клеток, подобных стромальным клеткам.

[0216]

В органоидах мочевого пузыря наблюдались сократительные движения. Это говорит о том, что слой клеток гладких мышц функционирует в органоиде мочевого пузыря.

[0217]

Слой эпителиальных клеток в органоиде мочевого пузыря имел слой клеток, экспрессирующих UPK2, на самой внутренней стороне (фиг. 10a1), и слой клеток, экспрессирующих Δ NP63, и расположенных снаружи от слоя клеток, экспрессирующих UPK2 (фиг. 10a2 и a5). Этот результат указывает на то, что органоид мочевого пузыря имеет структуру, сходную со структурой развивающегося эпителия мочевого пузыря. Клетки, экспрессирующие эпителиальный маркер мочевого пузыря KRT5, не наблюдались в слое эпителиальных клеток органоида мочевого пузыря (фиг. 10a3). Известно, что базальные клетки, экспрессирующие KRT5, появляются на поздних стадиях развития мочевого пузыря. Эти результаты позволяют предположить, что органоиды мочевого пузыря на 24-й день после индуцирования дифференцировки в Примере 5 находятся на стадиях развития мочевого пузыря. Слой эпителиальных клеток в органоиде мочевого пузыря экспрессировал маркер эпителиальных клеток мочевого пузыря GATA3 (фиг. 10d2) и маркер развивающихся эпителиальных клеток мочевого пузыря FOXA2 (фиг. 10d1). Эти результаты также свидетельствуют о том, что органоиды мочевого пузыря на 24-й день после индуцирования дифференцировки в Примере 5 находятся на стадиях развития мочевого пузыря.

[0218]

Органоиды мочевого пузыря подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию и наблюдали под микроскопом на 29-й день после совместного культивирования на стадии c3 (на 42-й день после индуцирования дифференцировки) (фиг. 11). Органоид мочевого пузыря имел просветную структуру. Слой эпителиальных клеток органоида мочевого пузыря (фигуры 11a5 и b5) состоял из слоя клеток, экспрессирующих UPK1B (фиг. 11a1) и

UPK2 (фиг. 11b1), слоя обращенного к просвету; слоя клеток, экспрессирующих Δ NP63 (фиг. 11a2 и b2), где указанный слой находился снаружи от вышеописанного слоя; и слоя клеток, экспрессирующих KRT5 (фиг. 11a3 и b3), где указанный слой находился снаружи от вышеописанного слоя. Поскольку известно, что базальные клетки, экспрессирующие KRT5, появляются на поздней стадии развития мочевого пузыря, то эти результаты позволяют предположить, что органоид мочевого пузыря на 42-й день после индуцирования дифференцировки в Примере 5 находится на поздней стадии развития мочевого пузыря.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения органоида вентральной части задней кишки, включающий:
 - культивирование плюрипотентных стволовых клеток с индукторной средой А, содержащей активин А и ингибитор GSK3 β , для индуцирования дифференцировки в зрелые клетки эндодермы; и
 - культивирование зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β , и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза, а затем их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В, содержащей фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и необязательно дополнительно содержащей белок остеогенеза с образованием органоида вентральной части задней кишки.
2. Способ по п. 1, где:
 - образование органоида вентральной части задней кишки включает, после культивирования зрелых клеток эндодермы с индукторной средой В, их культивирование в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В с получением органоида задней кишки и культивирование органоида задней кишки в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной средой В для образования органоида вентральной части задней кишки,
 - индукторная среда В для образования органоида задней кишки содержит фактор роста фибробластов и ингибитор GSK3 β , а индукторная среда В для образования органоида вентральной части задней кишки содержит фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза.
3. Способ по п. 1, где индукторная среда В для образования органоида вентральной части задней кишки содержит фактор роста фибробластов, ингибитор GSK3 β и белок остеогенеза.
4. Органоид вентральной части задней кишки, полученный способом по любому из пп. 1-3.
5. Органоид вентральной части задней кишки, экспрессирующий маркер вентральной части задней кишки P63, экспрессирующий HOXA13 и CK8/KRT8, и практически не экспрессирующий маркер SOX2 дорсальной части задней кишки.
6. Органоид вентральной части задней кишки с просветом, экспрессирующий по меньшей мере один маркер вентральной части задней кишки, выбранный из группы, состоящей из P63, DN63, GATA3, ISL1 и SATB2, экспрессирующий по меньшей мере один маркер, выбранный из группы, состоящей из фосфо-Smad1/5/8, HOXA13, FOXA2, CK8/KRT8 и ECAD, и практически не экспрессирующий по меньшей мере один маркер дорсальной части задней кишки, выбранный из группы, состоящей из SOX2, T и CDX2.
7. Способ получения органоида мочевого пузыря, включающий:
 - культивирование органоида вентральной части задней кишки, полученного

способом по любому из пп. 1-3, или органоида вентральной части задней кишки по любому из пп. 4-6 в присутствии внеклеточного матрикса с индукторной культурой С, содержащей ретиноевую кислоту, фактор роста фибробластов и белок остеогенеза;

введение органоида вентральной части задней кишки в почку или мочевой пузырь или в их периферическую область человека или млекопитающего, не являющегося человеком; или

культивирование органоида вентральной части задней кишки в присутствии мезенхимальных стволовых клеток или мезенхимальных клеток.

8. Органоид мочевого пузыря, полученный способом по п. 7.

9. Органоид мочевого пузыря, содержащий

первый клеточный слой, содержащий клетки, которые экспрессируют UPK1B и/или UPK2 и практически не экспрессируют P63; и

второй клеточный слой, локализованный снаружи от первого клеточного слоя, где второй клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и UPK1B и/или UPK2;

где органоид мочевого пузыря может дополнительно содержать третий клеточный слой, локализованный снаружи от второго клеточного слоя, где третий клеточный слой содержит клетки, коэкспрессирующие P63 и KRT5.

10. Органоид мочевого пузыря по п. 9, содержащий просвет, окруженный первым клеточным слоем.

11. Органоид мочевого пузыря по п. 9 или 10, содержащий четвертый клеточный слой, локализованный снаружи от третьего клеточного слоя; четвертый клеточный слой, содержащий клетки, подобные стромальным клеткам и необязательно дополнительно содержащий пятый клеточный слой, локализованный снаружи от четвертого клеточного слоя, где пятый клеточный слой содержит клетки гладких мышц.

12. Способ получения млекопитающего, не являющегося человеком, и содержащего органоид вентральной части задней кишки или органоид мочевого пузыря в почке или мочевом пузыре или в их периферической области, где указанный способ включает введение органоида вентральной части задней кишки, полученного способом по любому из пп. 1-3, органоида вентральной части задней кишки по любому из пп. 4-6, органоида мочевого пузыря, полученного способом по п. 7, или органоида мочевого пузыря по любому из пп. 8-11, в почку или в мочевой пузырь или в их периферическую область млекопитающего, не являющегося человеком.

13. Не являющееся человеком млекопитающее, содержащее органоид вентральной части задней кишки, полученный способом по любому из пп. 1-3, органоид вентральной части задней кишки по любому из пп. 4-6, органоид мочевого пузыря, полученный способом по п. 7, или органоид мочевого пузыря по любому из пп. 8-11 в почку или в мочевом пузыре или в их периферической области.

14. Регенеративная лекарственная композиция для лечения повреждения или заболевания мочевого пузыря, содержащая органоид вентральной части задней кишки, полученный способом по любому из пп. 1-3, органоид вентральной части задней кишки по

любому из пп. 4-6, органоид мочевого пузыря, полученный способом по п. 7 или органоид мочевого пузыря по любому из пп. 8-11.

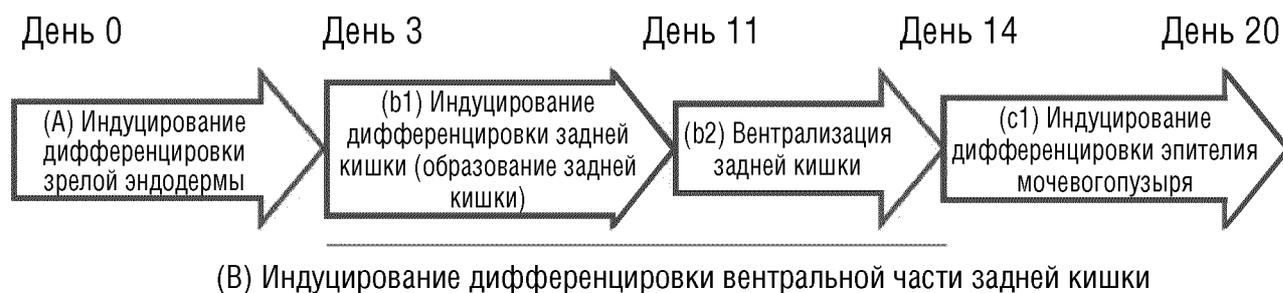
15. Способ оценки взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом, включающий:

контактирование тестируемого вещества с органоидом вентральной части задней кишки, полученным способом по любому из пп. 1-3, органоидом вентральной части задней кишки по любому из пп. 4-6, органоидом мочевого пузыря, полученным способом по п. 7, органоидом мочевого пузыря по любому из пп. 8-11, с млекопитающим, не являющимся человеком и полученным способом по п. 12, или с млекопитающим, не являющимся человеком и полученным способом по п. 13, и

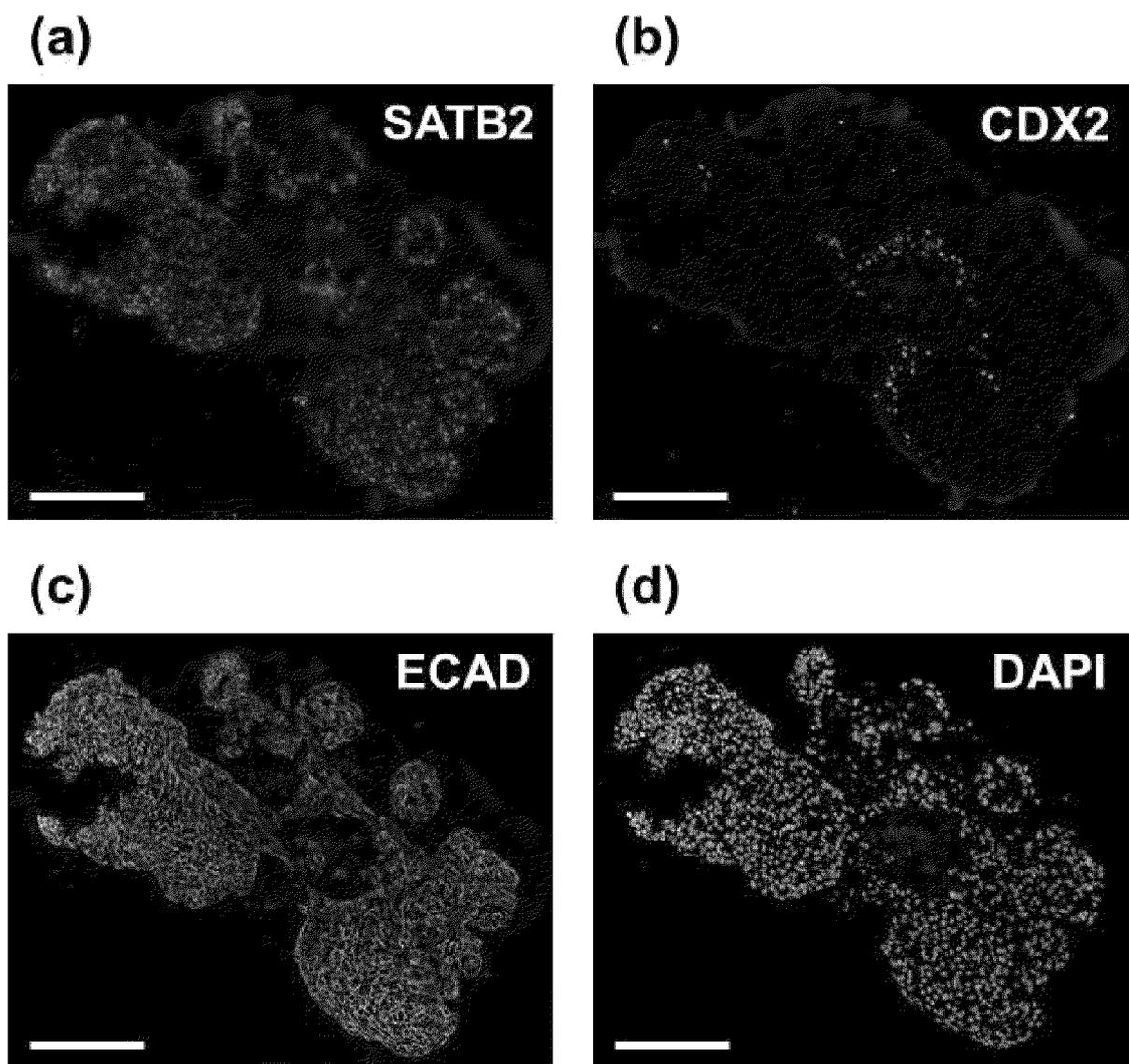
оценку взаимодействия лекарственного средства с тестируемым веществом в органоиде вентральной части задней кишки, в органоиде мочевого пузыря или у млекопитающего, не являющегося человеком.

По доверенности

ФИГ.1

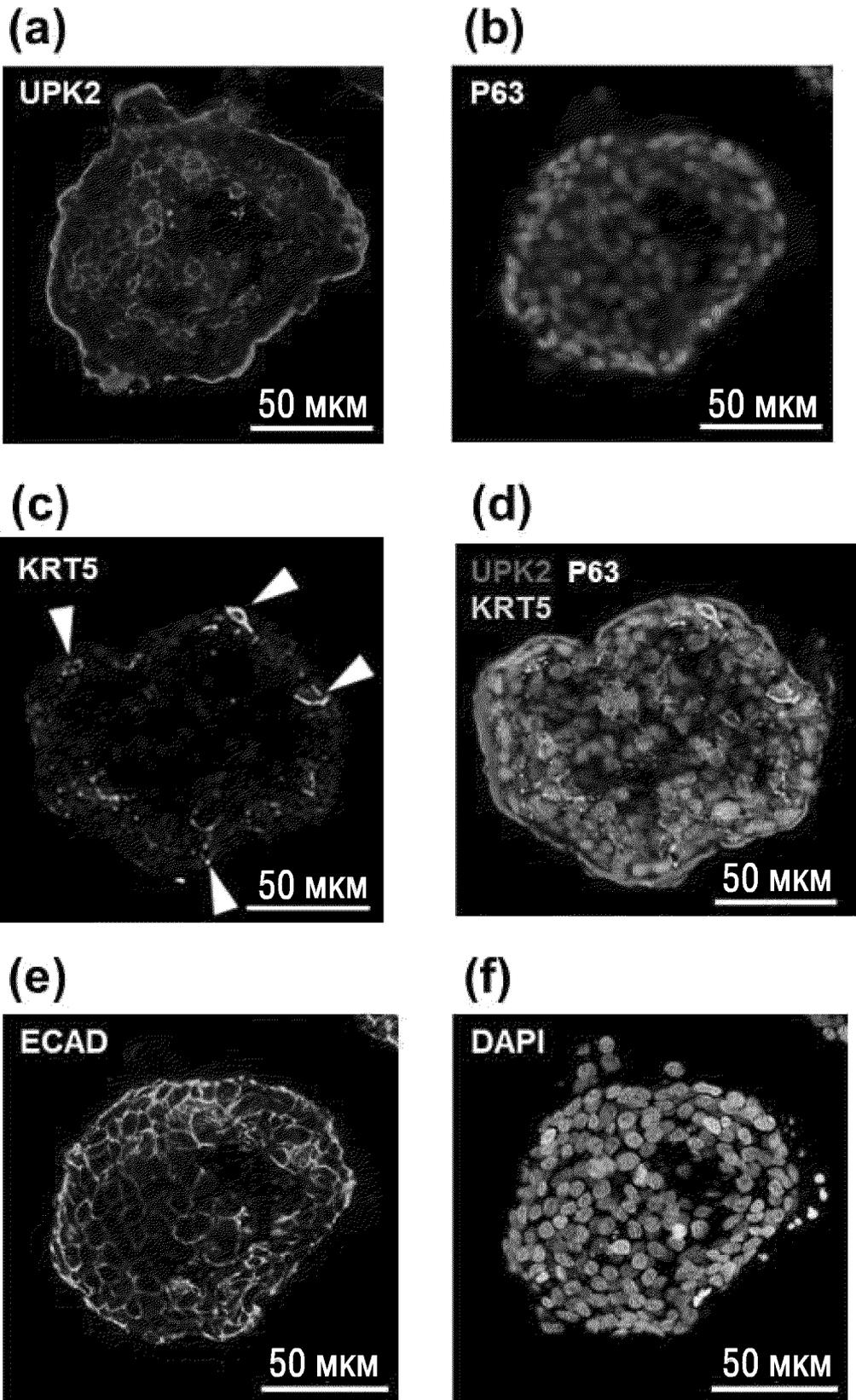


ФИГ.2

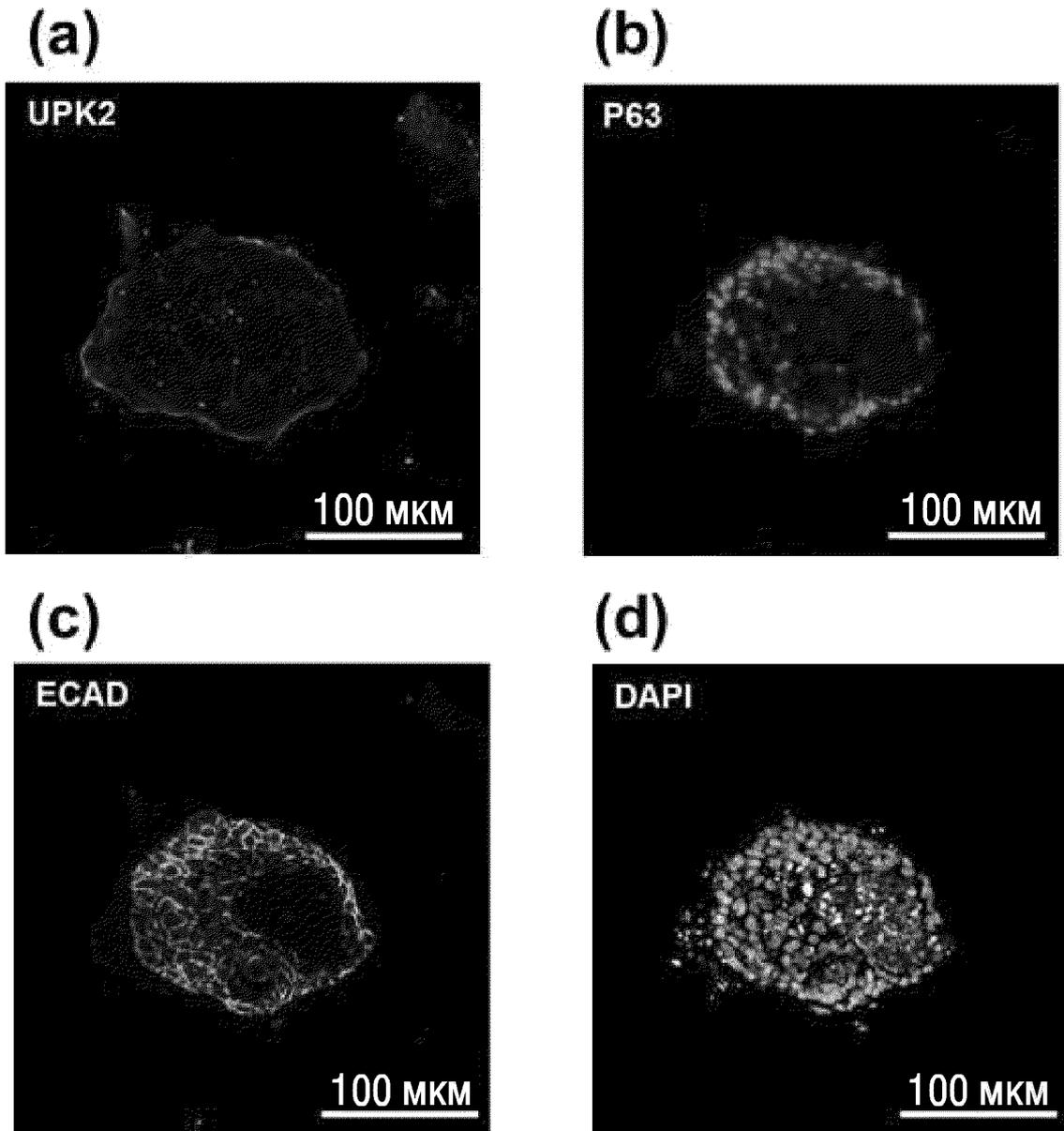


(масштаб = 200 мкм)

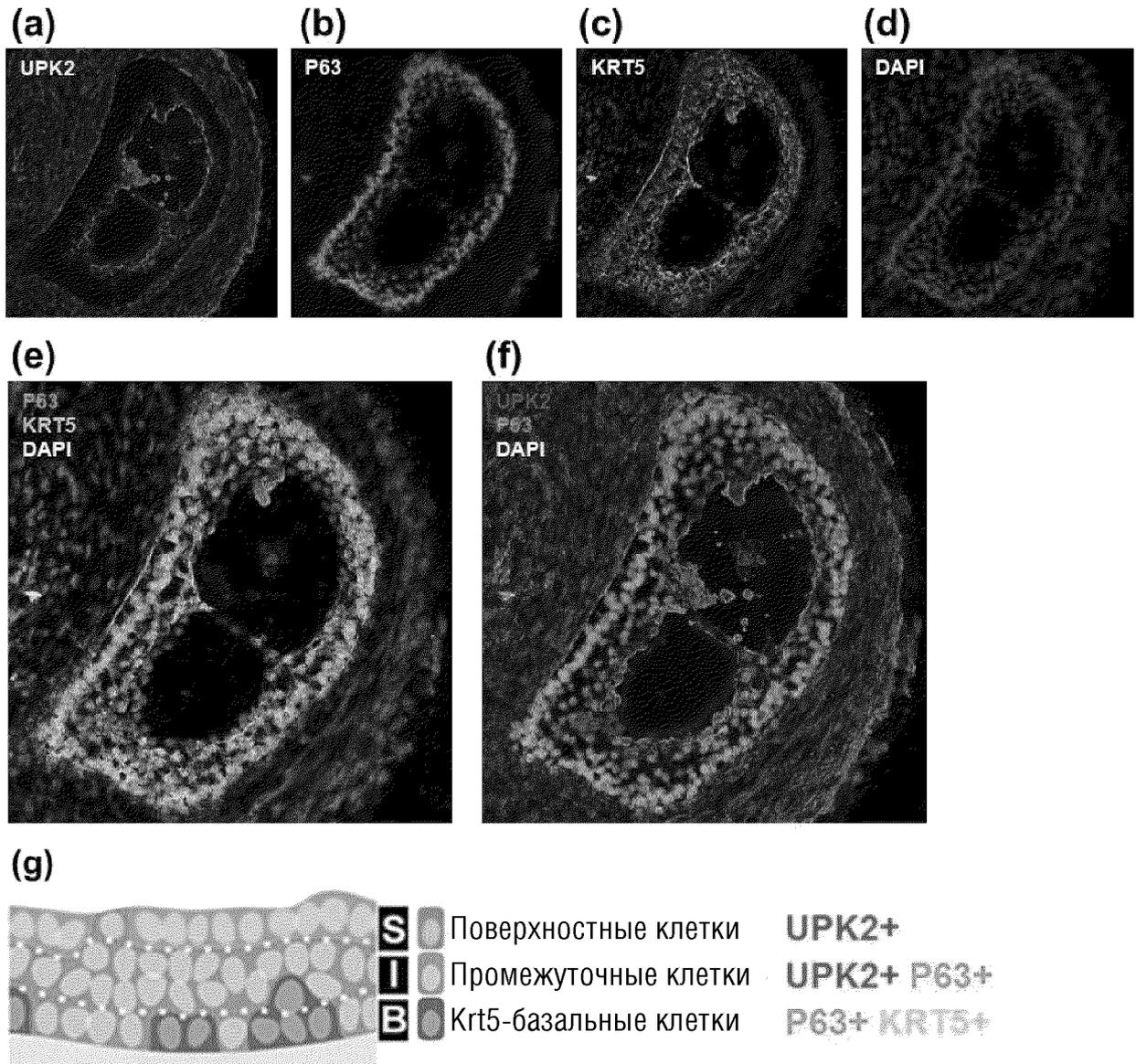
ФИГ.3



ФИГ.4



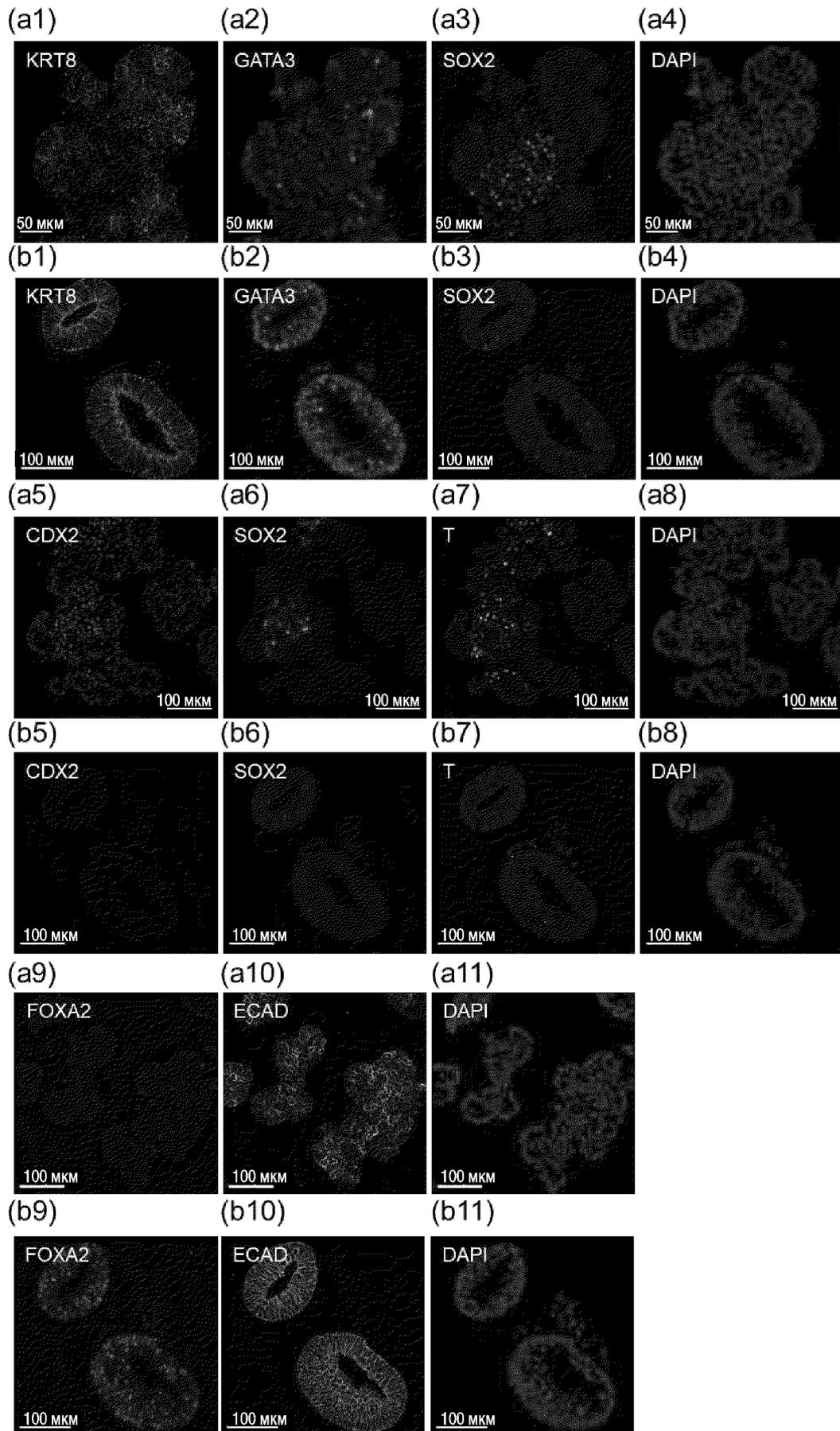
ФИГ.5



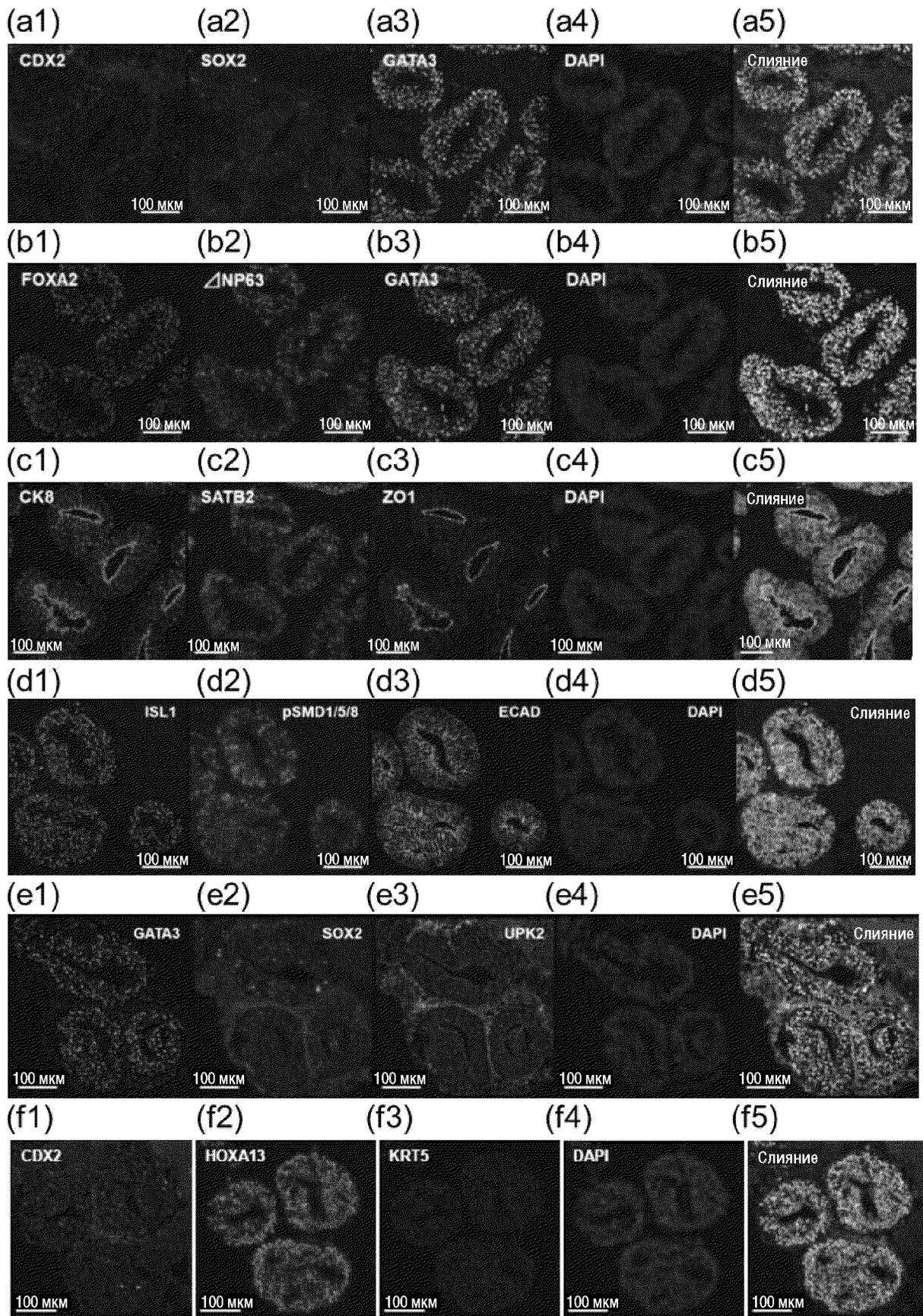
ФИГ.6



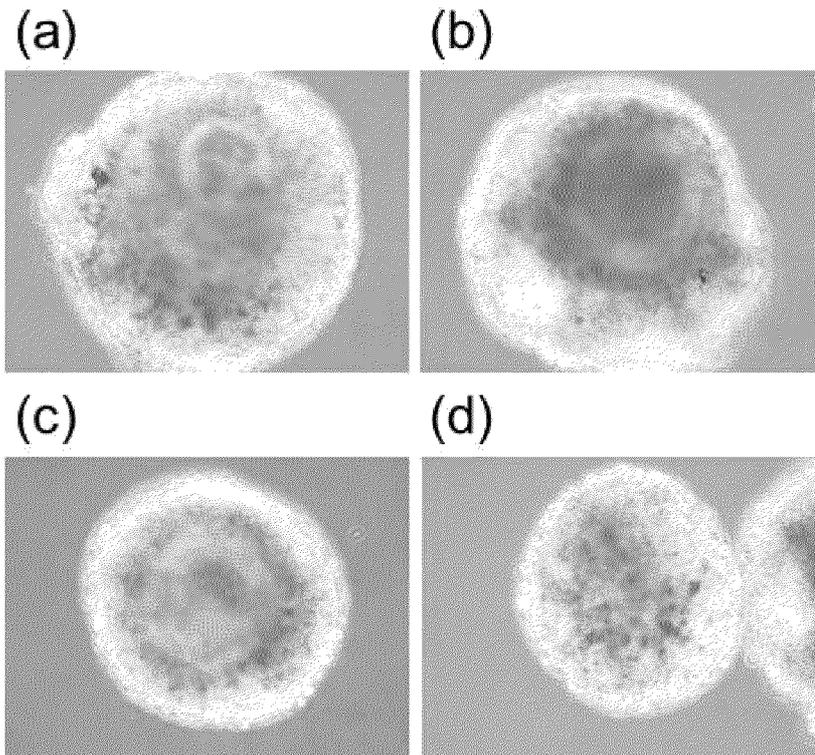
ФИГ.7



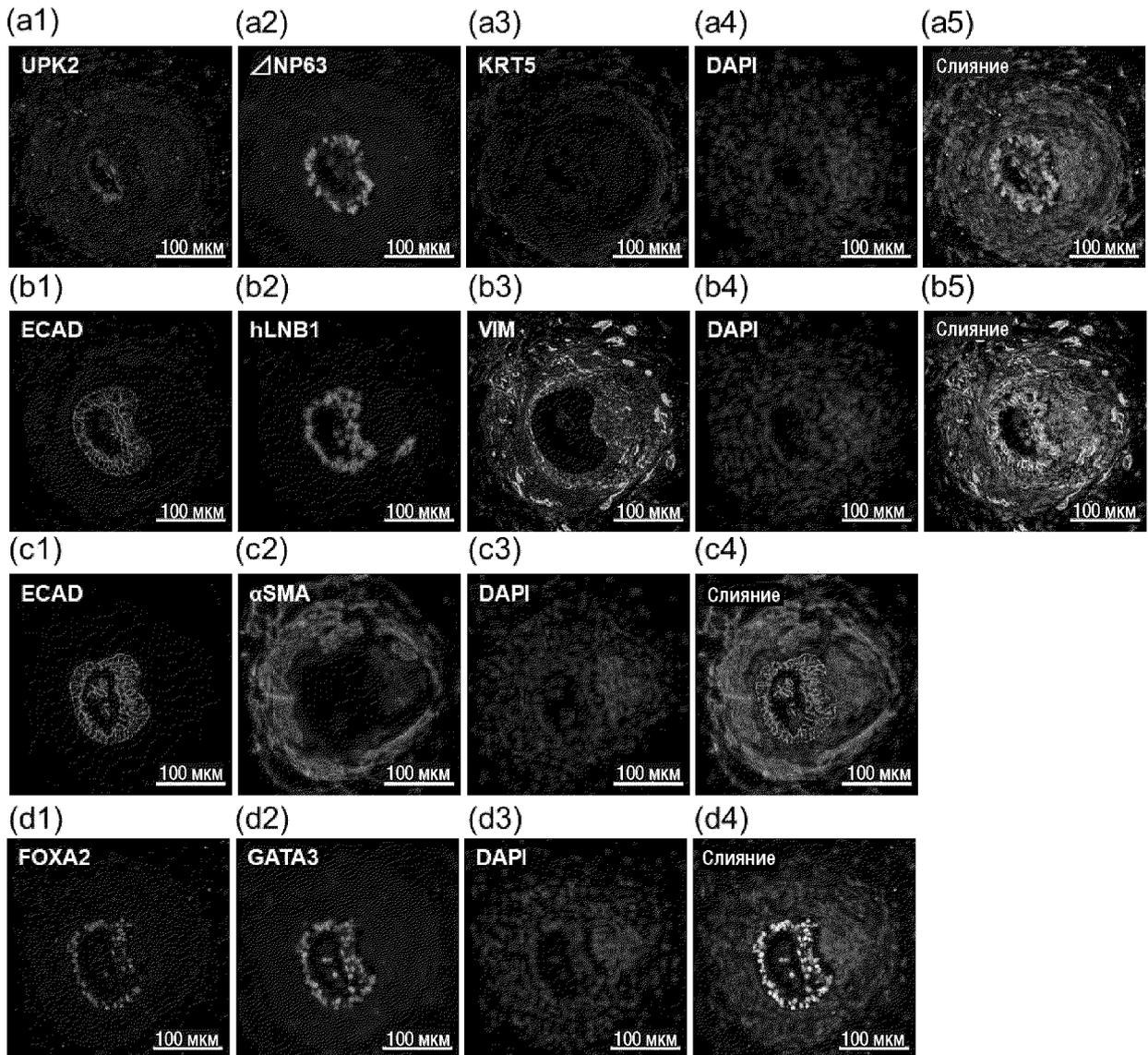
ФИГ.8



ФИГ.9



ФИГ.10



ФИГ.11

