

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034058**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2019.12.23**

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

**(21)** Номер заявки  
**201390801**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2012.01.12**

**(54) СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ПОДДЕРЖАНИЯ ЧИСТОЙ ИЛИ ОБОГАЩЕННОЙ ПОПУЛЯЦИИ НЕРВНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И/ИЛИ НЕРВНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ МЛЕКОПИТАЮЩЕГО, СКЛОННЫХ К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ С ОБРАЗОВАНИЕМ КЛЕТОК ОЛИГОДЕНДРОЦИТАРНОЙ ЛИНИИ IN VITRO**

**(31)** 61/431,944; 61/558,527

**(56)** US-A1-2010158878  
US-A1-2009291496

**(32)** 2011.01.12; 2011.11.11

**(33)** US

SCHWARTZBAUM JUDITH A. ET AL.:  
"Allergy and inflammatory transcriptome is predominantly negatively correlated with CD133 expression in glioblastoma", NEURO-ONCOLOGY, vol. 12, no. 4, April 2010 (2010-04), pages 320-327, XP55026223, ISSN: 1523-5866, DOI:10.1093/neuonc/nop035

**(43)** 2014.06.30

**(86)** PCT/IB2012/000030

**(87)** WO 2012/095730 2012.07.19

**(71)(72)(73)** Заявитель, изобретатель и патентовладелец:  
**КИДО ЦУНЕО (US)**

US-A1-2010261274

**(74)** Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев  
А.В. (RU)**

ESPINOSA DE LOS MONTEROS A. ET AL.:  
"02A progenitor cells transplanted into the neonatal rat brain develop into oligodendrocytes but not astrocytes", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 90, no. 1, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 50-54, XP55026224, ISSN: 0027-8424, cited in the application

**(57)** Выделенная способная к размножению человеческая нервная стволовая клетка или клетка-предшественник, представляющая собой клетку-предшественник или стволовую клетку, сохраняющая свою способность к дифференцировке с образованием нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, сохраняющая свою способность к эффективной дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии в течение нескольких пассажей и экспрессирующая, по меньшей мере, поверхностные клеточные антигены CD133 и CD140a. Также предложен способ in vitro культивирования способной к размножению нервной клетки-предшественника или стволовой клетки, выделенной из центральной нервной системы млекопитающего, и сама культура, где указанная клетка сохраняет свою способность к дифференцировке с образованием нейронов, астроцитов и олигодендроцитов и свою способность к эффективной дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии. Кроме того, предложен способ лечения состояния, вызванного утратой миелина или утратой олигодендроцитов, а также композиция, содержащая выделенную способную к размножению нервную стволовую клетку или клетку, культивированную способами по изобретению.

**B1**

**034058**

**034058**

**B1**

### Область изобретения

Данное изобретение относится в целом к области клеточной биологии нервных стволовых клеток и нервных клеток-предшественников. Конкретнее, согласно данному изобретению предложена чистая или обогащенная популяция нервных стволовых клеток и/или нервных клеток-предшественников млекопитающего, склонных к дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии *in vitro*, подходящая для применения в биологических исследованиях, скрининге лекарственных средств и терапии у человека.

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данный патент является родственной по отношению к предварительной заявке на патент США номер 61/431944, поданной 12 января 2011 г., и 61/558527, поданной 11 ноября 2011 г.

**Заявление относительно исследования или разработки, финансируемых из федерального бюджета**  
Неприменимо.

### Предшествующий уровень техники

При развитии центральной нервной системы первичные мультипотентные нервные стволовые клетки (NSC) пролиферируют с образованием транзитивно делящихся клеток-предшественников, которые в конечном счете проходят дифференцировку с образованием клеток различных типов, составляющих головной мозг взрослого. Центральная нервная система взрослого состоит главным образом из нейронов и глиальных клеток, включающих астроциты и олигодендроциты. Клетки-предшественники нейронов, астроцитов и олигодендроцитов последовательно образуются из нервных стволовых клеток развивающегося головного мозга (см. фиг. 1). Клетки-предшественники нейронов образуются первыми и проходят дифференцировку с образованием нейронов многих типов. Астроциты развиваются во вторую очередь, и их функционирование поддерживает выживание нейронов. В последнюю очередь начинают появляться клетки-предшественники олигодендроцитов, и они мигрируют по всей центральной нервной системе. Затем происходит их дифференцировка с образованием зрелых олигодендроцитов, образующих миелин, необходимый для правильного функционирования нейронов.

Поскольку олигодендроциты играют важную роль в поддержании центральной нервной системы, чистая или обогащенная популяция олигодендроцитов или их клеток-предшественников (т.е. клеток-предшественников олигодендроцитов и/или клеток-предшественников олигодендроцитов) будет полезна для клеточной терапии и восстановительной медицины, как, например, при лечении неврологических расстройств, включая врожденные демиелинизирующие заболевания (например, болезнь Краббе или болезнь Пелицеуса-Мерцбахера), повреждение спинного мозга и другие состояния, являющиеся результатом дефектов миелиновой оболочки, изолирующей нервные клетки. Эти клетки также могут быть использованы для исследований и обнаружения новых лекарственных средств для лечения многих неврологических расстройств, таких как рассеянный склероз и шизофрения.

Зрелые олигодендроциты не пролиферируют и плохо выживают в культуре, и возможность получения олигодендроцитов непосредственно из образцов тканей в количествах, достаточных для применения в исследованиях или терапии у людей, крайне затруднительна. В результате, применение олигодендроцитов в этих целях затруднено ограниченной доступностью этих клеток.

Одно решение этой проблемы включает получение нервных стволовых клеток и/или нервных клеток-предшественников из ткани, размножение клеток в культуре с получением достаточно большого количества клеток, которые впоследствии могут проходить дифференцировку с образованием олигодендроцитов. Дифференцировка может происходить *in vitro* или *in vivo*, как в случае трансплантации. Результатом этого будет большая популяция олигодендроцитов или их предшественников или предпредшественников для применения в исследованиях и терапии у людей.

Однако учеными были предприняты попытки определить условия культивирования, позволяющие проводить длительное культивирование и массовое размножение предшественников и/или предпредшественников олигодендроцитов, особенно человеческих и имеющих происхождение от приматов, не являющихся людьми, где полученная популяция размноженных клеток состоит главным образом из клеток, сохраняющих способность к дифференцировке с образованием олигодендроцитов.

Некоторые ученые сообщили о получении клеток-предшественников олигодендроцитов от крыс (Raff et al., *J. Neurosci.*, 3:1289, 1983; Raff et al., *Nature.*, 303:390, 1983; Espinosa de los Monteros et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:50, 1993). Эти пролиферирующие предшественники олигодендроцитов известны как O-2A-предшественники ввиду их способности к дифференцировке *in vitro* с образованием олигодендроцитов или астроцитов 2 типа. Другие ученые идентифицировали крысиных или мышиных предпредшественников олигодендроцитов в первичной культуре (Gallo, Armstrong RC, *J. Neurosci.*, 5:394, 1995; Grinspan, Franceschini B, *J. Neurosci. Res.*, 41:540, 1995; Decker et al., *Mol. Cell. Neurosci.*, 16:422, 2000). Полагают, что эти клетки являются предшественниками предшественников олигодендроцитов, и, предположительно, они будут более полезными при клеточной терапии ввиду их большей способности к миграции, по сравнению с предшественниками олигодендроцитов. К сожалению, ученым не удалось эффективно размножать эти клетки в течение длительных периодов времени *in vitro*. В отличие от этого, ученые сообщили о культивировании O2A-предшественников из зрительного нерва или спинного мозга крысы с использованием кондиционированной среды B104 или комбинаций факторов роста, таких как

(1) тромбоцитарный фактор роста-АА (PDGF-АА) с основным фактором роста фибробластов (bFGF или основным FGF) и нейротрофином-3 (NT-3) или (2) PDGF-АА с цилиарным нейротрофическим фактором (CNTF) и NT-3. Тем не менее, никому не удалось массово размножить клетки этих типов из ткани приматов с использованием этих факторов роста.

Таким образом, получение и размножение чистой или обогащенной популяции олигодендроцитов и/или их клеток-предшественников от млекопитающих, не являющихся крысами или мышами, остается крайне затруднительным. Особенно трудно получать и размножать эти клетки от людей и приматов, не являющихся людьми. Таким образом, существует большая потребность в способах получения чистых или обогащенных популяций нервных стволовых клеток или клеток-предшественников млекопитающего, склонных к дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии *in vitro*.

#### **Краткое изложение сущности изобретения**

Настоящее изобретение относится к выделенной способной к размножению человеческой нервной клетке, представляющей собой клетку-предшественник или стволовую клетку, где указанная клетка сохраняет свою способность к дифференцировке с образованием нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, где указанная клетка сохраняет свою способность к эффективной дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии в течение последующих пассажей, и где указанная клетка экспрессирует, по меньшей мере, поверхностные клеточные антигены CD133 и CD140 $\alpha$ .

Настоящее изобретение также относится к способу *in vitro*-культивирования способной к размножению нервной клетки, представляющей собой клетку-предшественник или стволовую клетку, выделенную из центральной нервной системы млекопитающего, где указанная клетка сохраняет свою способность к дифференцировке с образованием нейронов, астроцитов и олигодендроцитов и свою способность к эффективной дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии, где указанный способ включает выделение и отделение по меньшей мере одной клетки от человеческой эмбриональной нервной ткани, культивирование клетки при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 1-20% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>, и в свободной от сыворотки культуральной среде заданного химического состава, где указанная среда содержит по меньшей мере 5 нг/мл PDGF-АА, по меньшей мере 0,5 нг/мл bFGF и по меньшей мере 10 мкМ 1-тиоглицерин, и пассирование клетки с получением способной к размножению человеческой нервной клетки.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения состояния, вызванного утратой миелина или утратой олигодендроцитов, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей выделенную способную к размножению человеческую нервную клетку, способную сохранять свою способность к дифференцировке с образованием нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, где указанная клетка сохраняет свою способность к эффективной дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии в течение последующих пассажей и где указанная клетка экспрессирует, по меньшей мере, поверхностные клеточные антигены CD133 и CD140 $\alpha$ .

Настоящее изобретение также относится к *in vitro*-культуре, содержащей по меньшей мере одну выделенную нервную клетку, полученную из центральной нервной системы млекопитающего, где указанная выделенная клетка погружена в свободную от сыворотки культуральную среду заданного химического состава, содержащую по меньшей мере 5 нг/мл PDGF-АА, по меньшей мере 5 нг/мл bFGF и по меньшей мере 10 мкМ 1-тиоглицерин.

Более того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции нервных стволовых клеток, содержащей выделенную способную к размножению человеческую нервную клетку.

Кроме того, настоящее изобретение относится к применению фармацевтической композиции нервных стволовых клеток в лекарственном средстве для лечения состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу *in vitro*-культивирования и размножения нервных стволовых клеток и/или нервных клеток-предшественников, выделенных из центральной нервной системы млекопитающего, сохраняющих свою способность к дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии. В настоящем изобретении культура клеток представляет собой адгезионную культуру.

Настоящее изобретение также относится к выделенной чистой или обогащенной популяции размноженных нервных стволовых клеток и/или предшественников нервных клеток млекопитающего, склонных к дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии (т.е. O4-положительных клеток или клеток с паутинообразной морфологией, как показано на фиг. 7 и 15) *in vitro*.

Более того, настоящее изобретение относится к клеткам олигодендроцитарной линии млекопитающего, выделенных из центральной нервной системы млекопитающего посредством *in vitro*-размножения и дифференцировки нервных стволовых клеток и/или нервных клеток-предшественников.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показано развитие нервных стволовых клеток и нервных клеток-предшественников с образованием клеток головного мозга трех основных типов: нейронов, астроцитов и олигодендроцитов.

На фиг. 2 показано сравнение экспрессии маркеров на различных клетках центральной нервной системы (ЦНС).

На фиг. 3, микрофотографии А-Ф, показаны контрастные изображения человеческих эмбриональных стволовых клеток (клетки, имеющие происхождение от человеческого эмбрионального спинного мозга) (клон #2b).

На фиг. 4 показана скорость размножения HFSC-клеток (клон #2b) в присутствии различных комбинаций факторов роста.

На фиг. 5 показаны эффекты высокой дозы PDGF-AA (100 нг/мл) и 1-тиоглицерина на пролиферацию HFSC-клеток (клон #2b).

На фиг. 6 показана кривая роста HFSC-клеток (клон #2b).

На фиг. 7, микрофотографии А-Ф, показана спонтанная дифференцировка HFSC-клеток в свободной от сыворотки среде.

На фиг. 8 представлены фазово-контрастные изображения, полученные с использованием инвертированного микроскопа, на которых показана морфология HFSC-клеток (клон #3) на различных пассажах.

На фиг. 9 показана кривая роста HFSC-клеток (клон #3).

На фиг. 10, микрофотографии А-Ф, представлены фазово-контрастные изображения, полученные с использованием инвертированного микроскопа, на которых показана морфология HFSC-клеток (клоны 4А и 4В) на различных пассажах.

На фиг. 11 показана кривая роста HFSC-клеток (клоны #4А и #4В).

На фиг. 12, микрофотографии А-С, показан иммунофенотип недифференцированных HFSC-клеток.

На фиг. 13, изображения А-Н, представлены данные проточной цитометрии, показывающие долю недифференцированных HFSC-клеток (клон #2b, пассаж 13).

На фиг. 14 показан иммунофенотип дифференцированных HFSC-клеток (клон #3, пассаж 15).

На фиг. 15, изображения А-Е, показан потенциал дифференцировки HFSC-клеток (клон #2b, пассаж 15).

#### **Подробное описание графических материалов**

На фиг. 1 показано развитие нервных стволовых клеток и нервных клеток-предшественников с образованием клеток головного мозга трех основных типов: нейронов, астроцитов и олигодендроцитов. Сплошными линиями со стрелками показан переход от одного типа клеток к другому. Пунктирной линией от HFSC-клетки к нейрон-рестриктированным предшественникам (NRP) показано, что HFSC-клетка менее склонна к дифференцировке с образованием нейронов. Толстой линией от HFSC-клетки к O2A-клеткам показано, что HFSC-клетка более склонна к образованию клеток олигодендроцитарной линии. Мультипотентность HFSC-клетки относительно дифференцировки с образованием нейронов, астроцитов и олигодендроцитов была продемонстрирована в примере 7 (см. фиг. 14). Склонность HFSC-клетки к дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии была продемонстрирована в примере 2 (см. фиг. 7) и примере 8 (см. фиг. 15).

На фиг. 2 показано сравнение экспрессии маркеров на различных клетках ЦНС. В данном изобретении, в примере 7, раскрыт фенотип HFSC-клетки (см. фиг. 12 и 13), приведенный на фиг. 2. Как обсуждено ниже, HFSC-клетка отличается от клеток всех других типов и обладает признаками как нервной стволовой клетки, так и предшественника олигодендроцитов и астроцитов 2 типа (O2A).

На фиг. 3, микрофотографии А-Ф, показаны контрастные изображения человеческих эмбриональных стволовых клеток (клон #2b). На фиг. 3, микрофотография А, представлено фазово-контрастное изображение, полученное с использованием инвертированного микроскопа, на котором показаны HFSC-клетки (клон #2b), культивируемые в DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла)/F12, содержащей глутамин и NEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота) и дополненной добавкой B27 (Invitrogen™), заменимыми аминокислотами (NEAA) (Invitrogen™), 1,5 мМ пируватом (Invitrogen™), 55 мкМ β-меркаптоэтанолом (Invitrogen™) и 1 мМ N-ацетил-L-цистеином (Sigma) (далее эта комбинация названа "средой HFSCM1") с 20 нг/мл PDGF-AA и 10 нг/мл bFGF, в инкубаторе с поддержанием 37°C, 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Показаны клетки 0 пассажа, 7 сутки. Эти клетки образовывали сферы, и при 1 пассаже эти сферы высевали на покрытый полиорнитином культуральный планшет непосредственно без разделения сфер.

На фиг. 3, микрофотография В и микрофотография С, представлены фазово-контрастные изображения, полученные с использованием инвертированного микроскопа, на которых показаны HFSC-клетки (клон #2b), культивируемые, как описано в описании фиг. 3, микрофотографии А, выше. Показаны клетки 1 пассажа, 1 сутки, и 2 пассажа, 14 сутки соответственно. Клетки высевали непосредственно на покрытый полиорнитином культуральный планшет, после чего происходило их прикрепление и распространение за пределы сфер (фиг. 3, микрофотография В). Пассированные клетки могли эффективно размножаться в этих условиях культивирования при последующих пассажах (фиг. 3, микрофотография С).

На фиг. 3, микрофотографии D-F, представлены фазово-контрастные изображения, полученные с использованием инвертированного микроскопа, на которых показаны HFSC-клетки (клон #2b) после нескольких пассажей, культивируемые в среде HFSCM1 со 100 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерином в инкубаторе с поддержанием 37°C, 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Большинство HFSC-клеток представляли собой клетки темной фазы, расположенные скоплениями вместе с окружаю-

щими клетками. Расположенные поодиночке клетки, отделившиеся от скоплений, демонстрировали тенденцию к спонтанной дифференцировке с образованием отростчатых мультиполярных клеток (с так называемой "паутинообразной" морфологией), что характерно для проолигодендробластов или незрелых олигодендроцитов (показано белыми стрелками на фиг. 3, микрофотографии D и E), но частота их появления обычно составляла менее 1%. Клетки, показанные на фиг. 3, микрофотографии D, E и F, представляют собой клетки 8 пассажа, 8 сутки, 11 пассажа, 11 сутки, и 19 пассажа, 11 сутки соответственно.

На фиг. 4 показана скорость размножения HFSC-клеток (клон #2b) в присутствии различных комбинаций факторов роста: (1) 20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF; (2) 20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 5 нг/мл NT-3; (3) 20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1; (4) 20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 5 нг/мл NT-3 + 10 нг/мл IGF-1. Клетки собирали на 11 сутки 3 пассажа (P3D11) и для каждого из условий подсчитывали число жизнеспособных клеток. Затем их пассировали в тех же условиях, которые были применены при 3 пассаже, при той же плотности клеток. Клетки собирали на 8 сутки 4 пассажа (P4D8) и для каждого из условий подсчитывали число жизнеспособных клеток (эти клетки собирали до достижения ими субконфлюэнтности, поскольку они начинали образовывать сферы). Условия (4) были наиболее эффективны при 3 пассаже, но не при 4 пассаже. Условия (3) были эффективны при обоих пассажах.

На фиг. 5 показаны эффекты высокой дозы PDGF-AA (100 нг/мл) и 1-тиоглицерина на пролиферацию HFSC-клеток (клон #2b), культивированных в среде HFSCM1 в присутствии следующих комбинаций факторов роста: (1) 20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1; (2) 20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1 + 50 мкМ 1-тиоглицерин; (3) 100 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1; (4) 100 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1 + 50 мкМ 1-тиоглицерин; (5) 100 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 50 мкМ 1-тиоглицерин. Клетки собирали на 7 сутки 5 пассажа (эти клетки собирали до достижения ими субконфлюэнтности, поскольку они начинали образовывать сферы, как на 4 пассаже) и для каждого из условий подсчитывали число жизнеспособных клеток. Также исследовали комбинацию 20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF, но полученное число клеток было слишком малым для оценки (менее  $1 \times 10^4$  клеток, что было ниже определяемого диапазона), и эти данные не были включены в фиг. 5. Условия (1) позволяли размножить клетки при 3 пассаже, но не позволяли размножить клетки при 5 пассаже. Добавление 50 мкМ 1-тиоглицерина [условия (2)] или увеличение концентрации PDGF-AA до 100 нг/мл [условия (3)] оказывали очень незначительный положительный эффект на скорость размножения. При сочетании добавления 50 мкМ 1-тиоглицерина и увеличения концентрации PDGF-AA до 100 нг/мл [условия (4)] скорость размножения клеток резко увеличивалась, и клетки можно было успешно размножить. При исключении IGF-1 из этих условий [условия (5)] скорость размножения клеток уменьшалась до  $<1$ , показывая, что IGF-1 также стимулировал пролиферацию и/или выживание HFSC-клеток.

На фиг. 6 показана кривая роста человеческих HFSC-клеток (клон #2b) (незакрашенные кружки с черной линией). HFSC-клетки (клон #2b) сначала культивировали в присутствии 10 нг/мл PDGF-AA и 10 нг/мл bFGF. 10 нг/мл IGF-1 добавляли, начиная с 3 пассажа. Концентрацию PDGF-AA увеличивали с 20 нг/мл до 100 нг/мл, начиная с 6 пассажа. Тем не менее, это оказывало очень незначительные эффекты или не оказывало никаких эффектов на скорость размножения клеток. 50 мкМ 1-тиоглицерин добавляли, начиная с 7 пассажа. HFSC-клетки (клон #2b) начинали быстро расти в присутствии 100 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерина. 10 нг/мл NT-3 добавляли, начиная с 17 пассажа. NT-3 несколько усиливал рост клеток, но его эффекты исчезали после пассажа. Фиг. 6 также включает кривые роста человеческих HFSC-клеток (клон #2b), замороженных на 6 сутки 10 пассажа (P10, 6 сутки: незакрашенные кружки с пунктирной линией) и 11 сутки 11 пассажа (P11, 11 сутки: незакрашенные кружки с точечной линией). Замороженные клетки можно было размножить со сходной скоростью после разморозки.

На фиг. 7, микрофотографии A-F, показана спонтанная дифференцировка HFSC-клеток в свободной от сыворотки среде. На микрофотографиях A и B представлены фазово-контрастные изображения, полученные с использованием инвертированного микроскопа, на которых показаны морфологические изменения HFSC-клеток (клон #2b) при 12 пассаже, 9 сутки (фиг. 7, микрофотографии A и B) после культивирования в среде HFSCM1, дополненной 20 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерином (фиг. 7, микрофотография A) или без 1-тиоглицерина (фиг. 7, микрофотография B). Проводили спонтанную дифференцировку HFSC-клеток без добавления bFGF между заменами среды. Даже в одних и тех же условиях HFSC-клетки не проходили дифференцировку при ежедневном добавлении bFGF и, по-видимому, росли медленно. Кроме того, HFSC-клетки не проходили дифференцировку и образовывали скопления при использовании 40 нг/мл или более PDGF-AA. Снижая концентрацию PDGF-AA со 100 нг/мл до 20 нг/мл без добавления bFGF, можно было проводить спонтанную дифференцировку клеток с образованием отростчатых мультиполярных клеток с паутинообразной морфологией, экспрессировавших антиген O4 (фиг. 7, микрофотографии C и D) и/или антиген GalC (фиг. 7, микрофотографии E и F), что является определяющей характеристикой клеток олигодендроцитарной линии [т.е. проолигодендробластов (O4-положительных и GalC-отрицательных) и незрелых олигодендроцитов (O4-положительных и GalC-положительных)].

На фиг. 8 представлены фазово-контрастные изображения, полученные с использованием инвертированного микроскопа, на которых показана морфология HFSC-клеток (клон #3) на различных пассажах. Сначала обычные нервные стволовые клетки размножали в присутствии bFGF и EGF в течение 15 суток (см. фиг. 8, микрофотография А, 15 сутки 0 пассажа). После этого клетки культивировали в среде HFSCM1 с 20 нг/мл PDGF-AA и 10 нг/мл bFGF в инкубаторе с поддержанием 37°C, 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Концентрацию PDGF-AA увеличивали до 100 нг/мл и добавляли 10 нг/мл of IGF-1, начиная с 4 пассажа (см. фиг. 9). 50 мкМ 1-тиоглицерин добавляли, начиная с 8 пассажа (см. фиг. 9). Через несколько пассажей их морфология становилась почти идентичной клону #2b.

На фиг. 9 показана кривая роста человеческих HFSC-клеток (клон #3) (незакрашенные кружки с черной линией). HFSC-клетки (клон #3) сначала культивировали в присутствии 10 нг/мл EGF и 10 нг/мл bFGF для размножения обычных нервных стволовых клеток. Затем, начиная с 1 пассажа, комбинацию факторов роста меняли на 20 нг/мл PDGF-AA и 10 нг/мл bFGF. 10 нг/мл IGF-1 и 10 нг/мл NT-3 добавляли, начиная со 2 пассажа. На основании данных, показанных на фиг. 4, NT-3 удаляли из этой культуры и концентрацию PDGF-AA увеличивали с 20 нг/мл до 100 нг/мл, начиная с 4 пассажа. Тем не менее, это оказывало очень незначительные эффекты или не оказывало никаких эффектов на скорость размножения клеток, как показано для клона #2b. 50 мкМ 1-тиоглицерин добавляли, начиная с 5 пассажа, после чего HFSC-клетки (клон #3) начинали быстро расти в присутствии 100 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерина, как HFSC клетки (клон #2b). Фиг. 9 также включает кривую роста человеческих HFSC-клеток (клон #3), замороженных на 7 сутки 10 пассажа (P10, 7 сутки: незакрашенные кружки с пунктирной линией). Замороженные клетки можно было размножать со сходной скоростью после разморозки.

На фиг. 10, микрофотографии А-Ф, представлены фазово-контрастные изображения, полученные с использованием инвертированного микроскопа, на которых показана морфология HFSC-клеток (клоны 4А и 4В) на различных пассажах. Клетки культивировали в среде HFSCM1 и 50 мкМ 1-тиоглицерине с 20 нг/мл PDGF-AA, 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл IGF-1 (клон #4А) или 100 нг/мл PDGF-AA, 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл IGF-1 (клон #4В) в инкубаторе с поддержанием 37°C, 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. Сначала клон #4А рос медленнее клона #4В, но со 2 пассажа начинал расти с приблизительно такой же скоростью, что и клон #4В. После 3 пассажей они становились почти одинаковыми, и их морфология становилась почти идентичной клонам #2b или #3.

На фиг. 11 показана кривая роста человеческих HFSC-клеток (клон #4А: незакрашенные квадраты с пунктирной линией; и клон #4В: незакрашенные кружки с черной линией). HFSC-клетки (клон #4А) культивировали в присутствии 20 нг/мл PDGF-AA, 20 нг/мл bFGF, 20 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерина. HFSC-клетки (клон #4В) культивировали в присутствии 100 нг/мл PDGF-AA, 20 нг/мл bFGF, 20 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерина. Сначала число клеток обоих клонов резко уменьшалось, и это снижение было более заметным для клона #4А. После этого начального уменьшения числа клеток они начинали быстро размножаться. Фиг. 11 также включает кривую роста человеческих HFSC-клеток (клон #4В), замороженных на 6 сутки 5 пассажа (P5, 6 сутки: незакрашенные кружки с пунктирной линией).

На фиг. 12, микрофотографии А-С, показан иммунофенотип недифференцированных HFSC-клеток (клон #2b, 12-16 пассажи), культивированных в присутствии 100 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерина, с положительным окрашиванием на CD133, Sox2, нестин, Olig2, α-цепь рецептора PDGF (PDGF-Rα), NG2, A2B5, полисиалированную молекулу адгезии нервных клеток (PSA-NCAM), глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) или виментин. DAPI (4',6-диамидин-2-фенилиндол) использовали для контрастного окрашивания ядер. На этих микрофотографиях видно, что по меньшей мере 90% клеток были положительны в отношении CD133, Sox2, нестина, Olig2, PDGF-Rα, NG2, A2B5 и виментина при отсутствии GFAP-положительных клеток. Окрашивание PSA-NCAM было слабым, однако, несмотря на это, более 90% клеток выглядели PSA-NCAM-положительными.

На фиг. 13, изображения А-Н, представлены данные проточной цитометрии, показывающие долю недифференцированных HFSC-клеток (клон #2b, пассаж 13). Черными гистограммами представлен изотипический контроль, и серыми гистограммами представлен каждый исследованный антиген. Эти данные показали, что большинство HFSC-клеток были CD133-положительны (фиг. 13, микрофотография А), CD9-положительны (фиг. 13, микрофотография В), CD140α-положительны (фиг. 13, микрофотография С), NG2-положительны (фиг. 13, микрофотография D), A2B5-положительны (фиг. 13, микрофотография E), O4-положительны (фиг. 13, микрофотография F) и PSA-NCAM-положительны (фиг. 13, микрофотография G). При иммуноцитохимическом исследовании (данные не показаны) реакция на CD44 была отрицательной (фиг. 13, микрофотография H).

На фиг. 14 показан иммунофенотип дифференцированных HFSC-клеток (клон #3, пассаж 15), культивированных в среде, содержащей сыворотку, в течение 31 суток, и окрашенных антителами, распознающими нейроны (βIII-тубулин, нейрофиламент-L и MAP2 (белок 2, ассоциированный с микротрубочками)), олигодендроциты (O4, MBP (основной белок миелина)) и астроциты (GFAP (глиофибрилярный кислый белок)), с последующим окрашиванием флуоресцентным вторичным антителом. DAPI использо-

вали для контрастного окрашивания ядер. HFSC-клетки были способны проходить дифференцировку с образованием клеток, положительных в отношении каждого маркера. Для оценки колокализации аксонов нейронов и миелина клетки одновременно окрашивали антителом против  $\beta$ III-тубулина и антителом против MBP (фиг. 14, микрофотографии A-C), антителом против нейрофиламента-L и антителом против MBP (фиг. 14, микрофотографии D-F), антителом против MAP2 и антителом против MBP (фиг. 14, микрофотографии G-I). По-видимому, было колокализовано лишь небольшое количество аксонов нейронов и миелина. Для оценки колокализации антигена O4 и MBP клетки одновременно окрашивали антителом против O4 и антителом против MBP (фиг. 14, микрофотографии J-L). Большая часть сигналов MBP была колокализована с сигналами антигена O4. HFSC-клетки были также способны проходить дифференцировку с образованием GFAP-положительных астроцитов (фиг. 14, микрофотографии M-O). Кроме того, многие клетки были положительны в отношении виментина, экспрессированного во многих эпителиальных клетках, включая астроциты и мезенхимальные клетки. Более того, недифференцированные клетки были также виментин-положительны (данные не показаны).

На фиг. 15, изображения A-E, показан потенциал дифференцировки HFSC-клеток (клон #2b, пассаж 15). Дифференцировку клеток проводили в DMEM/F12, содержащей глутамин и HEPES и дополненной добавкой B27, добавкой N2 и 50 мкМ 1-тиоглицерин с 10 нг/мл PDGF-AA, 100 нг/мл IGF-1, 10 нг/мл BDNF (нейротрофический фактор головного мозга) и 100 мкМ рСРТ-сАМР. После дифференцировки в течение 4 суток клетки окрашивали антителом против GD3 (ганглиозид GD3) и антителом против O4 с последующим окрашиванием флуоресцентным вторичным антителом. Недифференцированные клетки экспрессировали GD3 сильнее клеток-предшественников олигодендроцитов, с O4 ситуация была обратной (стрелками на фиг. 15, микрофотографии A, B и C, показаны недифференцированные клетки). Большая часть дифференцированных клеток демонстрировала мультиполярную морфологию со слабым сигналом GD3 и сильным сигналом O4, указывая на то, что они представляли собой клетки-предшественники олигодендроцитов или проолигодендробласты. Клетки других типов (например, астроциты и нейроны) определяли как популяцию GD3-отрицательных и O4-отрицательных клеток. На фиг. 15, изображение D, показана доля каждой популяции клеток на 10 разных изображениях дифференцированных клеток. Более 70% общего числа клеток проходили дифференцировку с образованием клеток-предшественников олигодендроцитов ( $75,8 \pm 2,09\%$ ). Более 20% общего числа клеток представляли собой все еще недифференцированные клетки ( $23,5 \pm 2,03\%$ ). Клетки других типов составляли менее 1% общего числа клеток ( $0,7 \pm 0,41\%$ ). Было вычислено отношение клеток-предшественников олигодендроцитов и клеток других типов к дифференцированным клеткам (клетки-предшественники олигодендроцитов плюс клетки других типов), и оно показано на фиг. 15, изображение E. Клетки-предшественники олигодендроцитов составляли  $99,1 \pm 0,56\%$  дифференцированных клеток, в то время как клетки других типов составляли  $0,9 \pm 0,56\%$  дифференцированных клеток.

#### **Подробное описание предпочтительных воплощений изобретения**

Согласно настоящему изобретению предложен способ культивирования и размножения нервных стволовых клеток или нервных клеток-предшественников, выделенных из центральной нервной системы млекопитающего, с получением чистой или обогащенной популяции нервных стволовых клеток или нервных клеток-предшественников, обладающих способностью к дифференцировке с образованием олигодендроцитов или клеток олигодендротарной линии *in vitro*. Как нервные стволовые клетки, так и нервные клетки-предшественники образуют потомство, представляющее собой либо нейрональные клетки (такие как предшественники нейронов или зрелые нейроны), либо глиальные клетки, включая астроциты и олигодендроциты. В то время как нервные стволовые клетки способны к самообновлению (т.е. способны пролиферировать бесконечно), нервные клетки-предшественники могут, но не обязательно, быть способны к самообновлению. Способы культивирования по настоящему изобретению обеспечивают получение популяции размноженных клеток, способных проходить дифференцировку с образованием по меньшей мере 70, 80, 90 или 95% клеток олигодендротарной линии, представляющих собой клетки-предшественники олигодендроцитов и олигодендроциты, дифференцированные клетки.

В данном изобретении использованы следующие сокращения и определения.

Термин "HFSC-клетка" или клетка, имеющая происхождение от человеческого эмбрионального спинного мозга, относится к чистой или обогащенной популяции размноженных нервных стволовых клеток и/или нервных клеток-предшественников млекопитающего, описанных в данном изобретении.

Термин "среда HFSCM1" относится к DMEM/F12, содержащей глутамин и HEPES и дополненной добавкой B27 (Invitrogen™), заменимыми аминокислотами (NEAA) (Invitrogen™), 1,5 мМ пируватом (Invitrogen™), 55 мкМ  $\beta$ -меркаптоэтанолом (Invitrogen™) и 1 мМ N-ацетил-L-цистеином (Sigma) в комбинации.

Термин "глиальные клетки" относится к клеткам центральной нервной системы, не являющимся нейронами, и включает зрелые олигодендроциты, астроциты и коммитированные клетки-предшественники клеток любого из этих типов или обоих этих типов.

Термин "мультипотентные клетки-предшественники" относится к нервным клеткам-предшественникам, способным образовывать клетки некоторого, но ограниченного, числа линий.

"Плюрипотентность" (от латинского "plurimus" или "очень много" и "potentia" или "способность") относится к стволовой клетке, способной проходить дифференцировку с образованием любого из трех зародышевых листков: энтодермы (внутренняя выстилка желудка, желудочно-кишечного тракта, легких), мезодермы (мышцы, кости, кровь, уrogenитальный тракт) или эктодермы (эпидермальные ткани и нервная система). Нервные стволовые клетки мультипотентны и не плюрипотентны. Эмбриональные стволовые клетки плюрипотентны и не мультипотентны.

"Коммитированная клетка-предшественник" представляет собой клетку-предшественника, являющуюся коммитированной или обязательно превращающуюся в зрелую клетку определенного типа. Это отличает ее от мультипотентной или плюрипотентной клетки-предшественника, способной превращаться в зрелые клетки одного из двух или более типов (такой как O-2A-клетки-предшественники, способные превращаться в олигодендроциты или астроциты 2 типа, в зависимости от времени и средовых факторов).

"Олигодендроцит" представляет собой тип глиальной клетки, функция которой состоит в изоляции аксонов нервных клеток в центральной нервной системе некоторых позвоночных.

Термин "клетки олигодендроцитарной линии" относится к олигодендроцитам, проолигодендробластам и предшественникам олигодендроцитов (например, O2A-предшественникам). Данный термин не включает глиа-рестриктированных предшественников или нервные стволовые клетки.

Термины "клетки-предшественники олигодендроцитов" и "предшественники олигодендроцитов" использованы в данном изобретении взаимозаменяемо и относятся к клеткам, коммитированным для образования других клеток-предшественников и/или потомства, представляющего собой олигодендроциты, но не нейронов или ткани, не являющейся нервной тканью. Если не указано иное, они могут, но не обязательно, быть способными образовывать глиальные клетки других типов (такие как астроциты 2 типа). При использовании здесь данный термин не включает предпредшественников олигодендроцитов или глиа-рестриктированных предшественников (см. фиг. 1).

"Предпредшественники олигодендроцитов" представляют собой клетки-предшественники предшественников олигодендроцитов.

"Проолигодендробласты" представляют собой клетки-предшественники постмитотических олигодендроцитов.

"Размножение" клеток в культуре означает увеличение числа клеток в присутствии культуральной среды, содержащей добавки, стимулирующие пролиферацию клеток.

"Скорость размножения" клеток относится к отношению числа клеток на определенную дату к исходному числу клеток в начале культивирования.

При использовании здесь "размноженные" нервные клетки-предшественники или нервные стволовые клетки относятся к нервным клеткам-предшественникам или нервным стволовым клеткам, имеющим происхождение от выделенных нервных клеток-предшественников или нервных стволовых клеток, пролиферировавших *in vitro* с получением популяции размноженных клеток.

"Пассирование" клеток (также известное как "субкультивирование" или "разделение" клеток) относится к методике, позволяющей сохранять жизнеспособность и рост клеток в лабораторных условиях культивирования на протяжении длительных периодов времени отделением клеток друг от друга (с использованием ферментов, таких как трипсин или коллагеназа) с последующим переносом небольшого числа клеток в новую культуральную емкость. Клетки можно культивировать дольше при их пассировании через равные промежутки времени, поскольку это позволяет избежать преждевременного старения, связанного с длительным повышением плотности клеток.

"Ростовая среда" представляет собой среду, в которой интересующие клетки будут пролиферировать, проходить дифференцировку и/или созревать *in vitro*. Свойства среды включают среду, в которой культивируют клетки, любые факторы роста или факторы, индуцирующие дифференцировку, которые могут присутствовать, и поддерживающие структуры (такие как субстрат на твердой поверхности), если они присутствуют.

Основные методики.

Основные способы клеточной биологии, химии белков и методики с использованием антител можно обнаружить в Current Protocols in Protein Science (J.E. Colligan et al., eds., Wiley & Sons); Current Protocols in Cell Biology (J.S. Bonifacio et al., Wiley & Sons) и Current Protocols in Immunology (J.E. Colligan et al., eds., Wiley & Sons). Способы культивирования клеток в целом описаны в современном издании Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (R.I. Freshney et al., Wiley & Sons); General Techniques of Cell Culture (M.A. Harrison & I.F. Rae, Cambridge Univ. Press). Продукты и реагенты для тканевых культур доступны от коммерческих поставщиков, таких как Chemicon®, Millipore®, R&D Systems®, Invitrogen™, Nalgene-Nunc™ International, Sigma-Aldrich™ и ScienCell.

Специализированные справочники, применимые к данному описанию, включают Principles of Neuroscience, 4<sup>th</sup> edition, Kandel et al., eds., McGraw-Hill 2000; CNS Regeneration: Basic Science and Clinical Advances, M. H. Tuszynski & J.H. Kordower, eds., Academic Press, 1999; The Neuron: Cell and Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> edition, I. B. Levitan and L.K. Kaczmarek, Oxford U. Press, 2001; Glial Cells: Their Role in Behav-

ior, P.R. Laming et al., eds., Cambridge U. Press 1998; The Functional Roles of Glial Cells in Health and Disease, Matsas & Tsacopoulos eds., Plenum Pub. Corp, 1999; Glial Cell Development, Jessen & Richardson eds., Oxford U. Press, 2001; и Man of Steel, Adrian Hill, 1996.

В контексте онтогенеза клеток прилагательное "дифференцированный" является относительным термином. Дифференцированная клетка представляет собой клетку, прошедшую по пути развития дальше клетки, с которой ее сравнивают. Таким образом, нервные стволовые клетки могут проходить дифференцировку с образованием предшественников, рестриктированных в отношении определенных линий. Они в свою очередь могут проходить дифференцировку с образованием клеток, прошедших еще дальше по пути развития, или с образованием окончательно дифференцированных клеток, таких как зрелые нейроны или олигодендроциты.

Дифференцированные клетки по данному изобретению можно характеризовать по экспрессии ими фенотипических маркеров, характерных для олигодендроцитов. Присутствие классических иммуноцитохимических маркеров этих клеток зависит от зрелости клеточной популяции, и они представляют собой следующее.

Sox2: маркер плюрипотентных стволовых клеток и нервных стволовых клеток.

Нестин: маркер нервных стволовых клеток.

CD133: маркер клеточной поверхности нервных стволовых клеток.

Альфа-рецептор PDGF (PDGF-R $\alpha$ ):  $\alpha$ -цепь рецептора тромбоцитарного фактора роста. Маркер олигодендроцитов и их предшественников.

CD140 $\alpha$ : то же, что PDGF-R $\alpha$ . Антитело против CD140 $\alpha$  распознает внеклеточный домен PDGF-R $\alpha$ . Маркер клеточной поверхности олигодендроцитов и их предшественников.

CD9: гликопротеин клеточной поверхности, образующий комплекс с интегринами и другими трансмембранными белками суперсемейства 4. Маркер клеточной поверхности эмбриональных стволовых клеток, нервных стволовых клеток, олигодендроцитов и мезенхимальных стволовых клеток.

PSA-NCAM: полисиалирированные молекулы адгезии нервных клеток. Маркер клеточной поверхности нейрон-рестриктированных предшественников (NRP), предшественников нейронов, нейробластов и предпредшественников олигодендроцитов. Данный маркер отрицателен у глия-рестриктированных предшественников (GRP).

A2B5: маркер клеточной поверхности глия-рестриктированных предшественников (GRP), глиальных клеток-предшественников, клеток-предшественников олигодендроцитов (OPC) и астроцитов 2 типа. Данный маркер клеточной поверхности отрицателен у нейрон-рестриктированных предшественников (NRP).

NG2: хондроитинсульфатный протеогликан. Маркер клеточной поверхности макрофагов и клеток-предшественников олигодендроцитов.

GD3: ганглиозид GD3. Маркер предпредшественников олигодендроцитов и предшественников олигодендроцитов.

O4: маркер олигодендроцитов и их предшественников.

Галактоцереброзид С (GalC): маркер незрелых олигодендроцитов.

Основной белок миелина (MBP): маркер зрелых олигодендроцитов.

CD44: гликопротеин клеточной поверхности, вовлеченный в межклеточные взаимодействия, адгезию и миграцию клеток, и рецептор гиалуроновой кислоты. Маркер клеточной поверхности некоторых эпителиальных клеток и клеток астроцитарной линии.

Глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP): маркер астроцитов.

$\beta$ III-тубулин: маркер нейронов и предшественников нейронов.

Нейрофиламент-L: маркер зрелых нейронов.

Белок 2, ассоциированный с микротрубочками (MAP2): маркер зрелых нейронов.

Тканеспецифические маркеры можно выявлять с применением любой подходящей иммунологической методики, такой как проточная иммуноцитохимия на предмет маркеров клеточной поверхности или иммуногистохимия (например, с использованием фиксированных клеток или срезов тканей) на предмет внутриклеточных маркеров и маркеров клеточной поверхности. Способ проточно-цитометрического анализа подробно описан в Gallacher et al., Blood., 96:1740, 2000. Экспрессию поверхностного клеточного антигена считают положительной при связывании значительного выявляемого количества антитела с антигеном в стандартном иммуноцитохимическом или проточно-цитометрическом анализе, возможно, после фиксации клеток и, возможно, с использованием меченого вторичного антитела или другого конъюгата для увеличения количества метки. Для облегчения применения в исследованиях или терапии часто полезно увеличить в популяции долю клеток, обладающих свойствами олигодендроцитов или их предшественников. Возможно получение популяций клеток, содержащих по меньшей мере 50, 60, 70, 90 или 95% клеток определенной линии, определенных как клетки, положительные в отношении одного или более фенотипических маркеров, характерных для таких клеток.

Для терапевтических применений, относящихся к восстановлению нервной функции, часто желательно уменьшить способность популяции клеток образовывать клетки других типов, в частности не-

дифференцированные стволовые клетки и клетки неэктодермальной линии. В зависимости от применения может также быть полезным уменьшить долю клеток нейрональной линии и их коммитированных предшественников или клеток астроцитарной линии и их коммитированных предшественников. Контаминация популяции по данному изобретению составляет менее 30, 20, 10 или 5% контаминации клетками этих других типов.

Способы по настоящему изобретению не могут привести к развитию целого человеческого организма.

Способ по настоящему изобретению включает культивирование выделенных нервных стволовых клеток и/или нервных клеток-предшественников из центральной нервной системы млекопитающего в среде заданного химического состава, позволяющей размножать клетки в течение нескольких пассажей. Клетки, культивированные с применением способа по настоящему изобретению, при размножении сохраняют свою способность к дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии. Клетки, культивированные с применением способа по настоящему изобретению, можно пассировать более 6 раз и увеличивать их число более чем в 1000 раз при сохранении их способности к последующей дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии. В некоторых воплощениях популяция размноженных клеток, полученная способом культивирования по настоящему изобретению, содержит или может образовывать при дифференцировке популяцию клеток, в которой по меньшей мере 30, 50, 70 или 80% дифференцированных клеток представляют собой клетки олигодендроцитарной линии, в свободных от сыворотки условиях культивирования. В предпочтительном воплощении в популяции размноженных культивированных клеток, полученной способом культивирования по настоящему изобретению, по меньшей мере 90% дифференцированных клеток представляют собой клетки олигодендроцитарной линии. В предпочтительных воплощениях размноженные клетки мультипотентны. В некоторых воплощениях большинство размноженных клеток способно проходить дифференцировку с образованием клеток олигодендроцитарной линии при культивировании в среде со сниженной концентрацией PDGF-AA (т.е. 20 нг/мл PDGF-AA, предпочтительно с 10 нг/мл bFGF с или без 50 мкМ 1-тиоглицерином и, возможно, по меньшей мере с 10 нг/мл IGF-1) без добавления bFGF между заменами среды. В некоторых воплощениях большинство размноженных клеток способно проходить дифференцировку с образованием клеток олигодендроцитарной линии при культивировании с 10 нг/мл of PDGF-AA, 100 нг/мл IGF-1, 100 мкМ рСРТ-сАМР и 10 нг/мл BDNF в DMEM/F12, содержащей глутамин и HEPES и дополненной добавкой B27, добавкой N2 и 50 мкМ 1-тиоглицерином.

Выделенные нервные стволовые клетки и/или нервные клетки-предшественники млекопитающего для применения в настоящем изобретении могут быть получены из центральной нервной системы млекопитающего, предпочтительно примата, такого как, без ограничения, человек. Известно о присутствии предшественников и предпредшественников олигодендроцитов в белом веществе центральной нервной системы. По существу, подходящие источники, из которых можно выделить клетки для применения в настоящем изобретении, включают, без ограничения, зрительный нерв, мозолистое тело и спинной мозг. Кроме того, выделенные стволовые клетки могут иметь происхождение от эмбриона млекопитающего, предпочтительно, от эмбриона примата, такого как, без ограничения, человеческий эмбрион, и могут быть получены с применением способов, известных в данной области техники. В некоторых воплощениях выделенные стволовые клетки получены из ткани человеческого эмбрионального спинного мозга, полученной из позвоночника человеческого эмбриона. В предпочтительном воплощении выделенные клетки для применения в настоящем изобретении получены из человеческого эмбрионального спинного мозга на 8-24 неделе беременности, предпочтительно 12-18 неделе беременности. Позвоночники человеческих эмбрионов могут быть получены, например, на коммерческой основе через такие компании, как Advanced Bioscience Resources, Inc. (Alameda, CA, USA), с разрешения IRB (Institutional Review Board, комиссия по биомедицинской этике) и информированного согласия донора. Ткань спинного мозга может быть отделена от позвоночника с удалением мозговых оболочек и периферических нервов. Затем ткань можно измельчить, промыть и поместить в культуральную емкость, содержащую питательную среду, позволяющую клеткам пролиферировать.

Подходящие культуральные емкости могут включать, без ограничения, культуральные емкости с культуральной поверхностью, содержащей одну полиаминокислоту или комбинацию полиаминокислот (например, полилизин и/или полиорнитин), пластик для тканевых культур и поверхности, обработанные ламинином, витронектином или фибронектином. Обычно клетки можно высевать в плотности, варьирующей от  $10^4$  до  $10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, предпочтительно в плотности приблизительно от  $3 \times 10^4$  до  $5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>. Полиорнитин или полилизин можно использовать для покрытия культуральных емкостей, как сообщено ранее (Raff et al., J. Neurosci., 3:1289, 1983; Raff et al., Nature., 303:390, 1983; Protocols for Neural Cell Culture, 3<sup>rd</sup> edition, Humana Press, Inc.). Культуральные емкости могут быть покрыты полиорнитином в концентрации от 1 до 40 мкг/мл, предпочтительно от 2 до 20 мкг/мл, более предпочтительно от 5 до 15 мкг/мл. Прочность прикрепления клеток может варьировать в зависимости от поставщика, модификации поверхности, формата и конкретной партии культуральных емкостей. Оптимальную концентрацию покрывающих веществ можно определить для каждого источника культуральных емкостей с

применением способов, известных в данной области техники. В некоторых воплощениях для покрытия емкостей, например, от BD Falcon (Sparks, MD, USA), проводят двухчасовую инкубацию с 10 мкг/мл полиорнитином или полилизинном. В некоторых воплощениях для покрытия емкостей, например, от Nalgen Nunc International (Rochester, NY, USA), может быть проведена инкубация с 5 мкг/мл полиорнитином или полилизинном в течение 30 мин.

Выделенные нервные стволовые клетки и/или нервные клетки-предшественники, полученные из центральной нервной системы млекопитающего, культивируют в свободной от сыворотки культуральной среде заданного химического состава, позволяющей клеткам размножаться без стимуляции дифференцировки клеток (например, с образованием нейронов, астроцитов или олигодендроцитов). Культуральная среда содержит основную среду, такую как, без ограничения, модифицированная по способу Дульбекко среда Игла со смесью питательных веществ F-12, 1:1 (DMEM/F12) (Invitrogen®) (например, среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков, RPMI-1640 и Neurobasal). Основная среда может быть дополнена различными компонентами для поддержания жизнедеятельности и выживания клеток. Такие компоненты могут включать, без ограничения, по меньшей мере 0,25% заменимых аминокислот [NEAA (Invitrogen®) - 1%-ный раствор содержит 100 мкМ L-аланин, L-аспарагин, H<sub>2</sub>O, L-аспарагиновую кислоту, L-глутаминовую кислоту, глицин, L-пролин и L-серин], по меньшей мере 1,0 мМ глутамин, по меньшей мере 0,5 мМ пируват, по меньшей мере 1%-ную добавку B27 (Invitrogen®), по меньшей мере 0,1 мМ N-ацетилцистеин и/или по меньшей мере 10 мкМ β-меркаптоэтанол. В некоторых воплощениях основная среда может содержать NS21 (как описано в Y. Chen et al., J. Neurosci. Methods., 171:239, 2008) вместо добавки B27. Добавка B27 содержит бычий сывороточный альбумин, трансферрин, инсулин, прогестерон, кортикостерон, трийод-L-тиронин, ацетат ретинола, DL-токоферол, ацетат DL-токоферола, биотин, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, этаноламин, селенит Na, L-карнитин, восстановленный глутатион, каталазу, супероксиддисмутазу, D-галактозу и путресцин. Invitrogen раскрыл ее ингредиенты, но не раскрыл их концентрацию. Тем не менее, концентрация каждого ингредиента в их исходной композиции, добавке B18, была раскрыта. NS21 была разработана на основании этой информации, и концентрация каждого ингредиента была раскрыта. В культуре нейронов она действовала так же хорошо, как добавка B27. Кроме того, NS21 можно использовать для культивирования нервных стволовых клеток и предшественников олигодендроцитов, имеющих происхождение от человеческих эмбриональных стволовых клеток. По этой причине полагают, что данная добавка является хорошим кандидатом на замену добавки B27. В предпочтительном воплощении культуральная среда содержит DMEM/F12, дополненную 1-4 мМ, более предпочтительно 2,5 мМ глутамином; 10-25 мМ, более предпочтительно 15 мМ NEPES; 0,5-2,0 мМ, более предпочтительно 1 мМ пируватом; 1-4%-ной, более предпочтительно 2%-ной добавкой B27; 0,25-3%-ными, более предпочтительно 1%-ными NEAA; 1-200 мкМ, более предпочтительно 50 мкМ 1-тиоглицерин; 0,1-3 мМ, более предпочтительно 1 мМ N-ацетилцистеином; и/или 10-100 мкМ, более предпочтительно 55 мкМ β-меркаптоэтанолом.

Кроме того, кислород может способствовать дифференцировке нервных клеток-предшественников. Поэтому для ослабления дифференцировки клеток их можно культивировать в ростовой среде с 1-20% O<sub>2</sub>. В предпочтительном воплощении клетки культивируют в культуральной колбе в инкубаторе, обеспечивающем ростовую среду с 37°C, 1-10%, более предпочтительно 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. После получения HFSC-клеток оценивали эффект концентрации кислорода, но увеличения количества дифференцированных клеток в условиях с 20% O<sub>2</sub>, по сравнению с условиями с 5% O<sub>2</sub>, в условиях культивирования для размножения HFSC-клеток не было. Рост HFSC-клеток в условиях с 5% O<sub>2</sub> был несколько быстрее, чем в условиях с 20% O<sub>2</sub>. Кислород приводит к окислительному стрессу, и известно, что он индуцирует мутации p53 в клетках грызунов. Для снижения риска мутаций авторы изобретения продолжили культивирование HFSC-клеток в условиях с 5% O<sub>2</sub>.

Нервные стволовые клетки и/или нервные клетки-предшественники культивируют в культуральной среде, дополнительно содержащей факторы роста для стимуляции пролиферации и выделения клеток. Культуральная среда может содержать по меньшей мере 5, 10, 20 или 40 нг/мл тромбоцитарного фактора роста-AA (PDGF-AA), по меньшей мере 2,5, 5 или 10 нг/мл основного FGF (bFGF) и/или 10, 25 или 50 мкМ 1-тиоглицерин для выделения клеток. В некоторых воплощениях культуральная среда дополнительно содержит по меньшей мере 1, 5 или 10 нг/мл инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1). В некоторых воплощениях PDGF-AA может быть заменен PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC или PDGF-DD. В некоторых воплощениях bFGF может быть заменен другим представителем факторов роста фибробластов (например, FGF-4 или FGF-9). В некоторых воплощениях IGF-1 может быть заменен IGF-2. В предпочтительном воплощении культуральная среда содержит 40-60 мкМ 1-тиоглицерин, 40-200 нг/мл PDGF-AA, 5-100 нг/мл bFGF и 5-100 нг/мл IGF-1 для выделения клеток.

Выделенные нервные стволовые клетки и/или нервные клетки-предшественники культивируют в культуральной среде, дополнительно содержащей факторы роста для стимуляции пролиферации после выделения клеток. Культуральная среда может содержать по меньшей мере 1, 2 или 5 нг/мл тромбоцитарного фактора роста-AA (PDGF-AA), по меньшей мере 0,5, 1 или 5 нг/мл основного FGF (bFGF) и/или по меньшей мере 10, 25 или 50 мкМ 1-тиоглицерин для размножения клеток. В некоторых воплощениях

культуральная среда дополнительно содержит по меньшей мере 1, 2 или 5 нг/мл инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1). В предпочтительном воплощении культуральная среда содержит 40-60 мкМ 1-тиоглицерин, 5-100 нг/мл PDGF-AA, 1-50 нг/мл bFGF и 5-100 нг/мл IGF-1 для размножения клеток после выделения HFSC-клеток.

Выделенные нервные стволовые клетки и/или нервные клетки-предшественники, культивируемые в условиях культивирования по настоящему изобретению, демонстрируют время удвоения 50-120 ч. В предпочтительных воплощениях время удвоения составляет приблизительно от 60 до 100 ч. Клетки могут продолжать пролиферировать с этой скоростью в течение по меньшей мере 8, 11, 14 или 17 пассажей. За месяц число клеток можно увеличивать по меньшей мере в 100, 250 или предпочтительно по меньшей мере в 500 раз. В предпочтительных воплощениях клетки, культивированные с применением способа по настоящему изобретению, демонстрируют скорость размножения  $>1$  в течение более чем 18 пассажей.

#### Примеры

Пример 1. Культивирование и размножение HFSC-клеток; определение основной среды и факторов роста.

Несколько сред и добавок исследовали в предварительном эксперименте с использованием HFSC-клеток, имеющих происхождение от человеческого 12-недельного эмбрионального спинного мозга, полученного от Advanced Bioscience Resources, Inc. (Alameda, CA, USA) с информированного согласия донора. Сначала клетки культивировали в DMEM:F12 (1:1) (DMEM/F12) (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), дополненной 2 мМ глутамином (Invitrogen™), 1 мМ пируватом (Invitrogen™) и 2%-ной добавкой B27 (Invitrogen™). Исследовали различные факторы роста на предмет стимуляции ими роста HFSC-клеток. Наиболее эффективными факторами роста была комбинация PDGF-AA и bFGF. Клетки могли расти в присутствии PDGF-AA и bFGF, но демонстрировали вакуоли и выглядели нездоровыми. Было исследовано несколько добавок, и было обнаружено, что DMEM/F12, дополненная 1%-ными NEAA в дополнение к 2 мМ глутамину, 1 мМ пирувату и 2%-ной добавке B27, могла уменьшать количество вакуолей и несколько увеличивать число клеток (данные не показаны). Другие добавки, включая 1 мМ N-ацетилцистеин (Sigma-Aldrich™, St. Louis, MO, USA) и 55 мкМ β-меркаптоэтанол (Invitrogen™), по-видимому, улучшали состояние клеток, но улучшение не было таким существенным, как при использовании NEAA (данные не показаны). Таким образом, DMEM/F12, дополненная 2 мМ глутамином, 1 мМ пируватом, 2%-ной добавкой B27, 1%-ными NEAA, 1 мМ N-ацетилцистеином и 55 мкМ β-меркаптоэтанолом, была определена как оптимальная основная среда и была использована в дальнейшем для культивирования HFSC-клеток.

Человеческий 15-недельный эмбриональный спинной мозг отделяли от позвоночника с удалением мозговых оболочек и периферических нервов. Затем ткань разделяли на клетки с использованием Accutase, промывали, и клетки, полученные из человеческого эмбрионального спинного мозга, помещали в культуральную емкость, содержащую следующую питательную среду: DMEM/F12, содержащую 2,5 мМ глутамин и 15 мМ NEPEPES, 2%-ную добавку B27 (Invitrogen™), 1%-ные NEAA, 1,5 мМ пируват (Invitrogen™), 55 мкМ β-меркаптоэтанол (Invitrogen™), 1 мМ N-ацетил-L-цистеин (Sigma-Aldrich™), 20 нг/мл PDGF-AA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) и 10 нг/мл bFGF (R&D Systems). Затем клетки помещали в инкубатор с поддержанием 37°C, 5% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>. bFGF (10 нг/мл) добавляли в культуральную среду ежедневно. Среду меняли каждые 2-3 суток при пассировании. По результатам предварительных экспериментов в присутствии PDGF-AA и bFGF растущих клеток было немного, и многие клетки прекращали пролиферировать или погибали в течение нескольких недель. Этот результат был, по-видимому, закономерен, поскольку клетки, экспрессирующие PDGF-Rα, обычно составляют менее 5% клеток. Для удаления клеток, нечувствительных к PDGF-AA и bFGF, клетки культивировали в ультрамалоадгезивном культуральном планшете (Corning Inc., Corning, NY, USA). Клетки, чувствительные к PDGF-AA и bFGF, образовывали сферы (см. фиг. 3, микрофотография А), в то время как клетки, нечувствительные к ним, не образовывали сферы. Сферы собирали при низкоскоростном центрифугировании (300 об/мин для сбора сфер против 1000 об/мин для сбора отдельных клеток) для замены среды и пассирования. Через 9 суток клетки собирали и пассировали в культуральных емкостях, покрытых полиорнитинном. После этого периода клетки пассировали каждые 7-14 суток. На этих ранних стадиях клетки демонстрировали гетерогенную морфологию (см. фиг. 3, микрофотографии В и С), и многие клетки прекращали пролиферировать в течение месяца. Скорость пролиферации уменьшалась с течением времени, и, в конечном счете, клетки не размножались. Кроме того, клетки начинали выглядеть нездоровыми, образуя вакуоли в их цитоплазме.

Пример 2. Определение оптимальных условий роста для размножения HFSC-клеток.

Как указано в примере 1, включение PDGF-AA и bFGF в культуральную среду сначала поддерживало адекватный рост HFSC-клеток, но скорость пролиферации уменьшалась после 2 пассажей. NT-3 (R&D Systems) и IGF-1 (Sigma-Aldrich) исследовали для определения их способности усиливать пролиферацию HFSC-клеток. Присутствие 20 нг/мл PDGF-AA с 10 нг/мл bFGF было недостаточным для стимуляции скорости пролиферации клеток (скорость размножения составляла  $<1$ ) (см. фиг. 4). Последующее добавление 5 нг/мл NT-3 и/или 10 нг/мл IGF-1 приводило к увеличению скорости пролиферации

(скорость размножения составляла  $>1$ ). Комбинация NT-3 и IGF-1 была наиболее эффективной при 3 пассаже. Клетки, полученные при каждом из условий, пассировали далее для подтверждения их эффектов. Клетки собирали раньше, поскольку они начинали образовывать сферы. При 4 пассаже эффект комбинации NT-3 и IGF-1 на скорость пролиферации уменьшался, и наиболее эффективным становилось однократное добавление IGF-1 на 4 пассаже. Комбинация NT-3 и IGF-1 могла приводить к дифференцировке клеток или образованию большего количества сфер, и ее эффект исчезал при замене среды. Таким образом, добавление IGF-1 было определено как наиболее эффективный фактор выживания и было применено в дальнейшем для культивирования HFSC-клеток. Тем не менее, в конце 4 пассажа скорость пролиферации HFSC-клеток снова начинала снижаться, и число клеток было меньше числа высеванных клеток. По этой причине на 5 пассаже исследовали способность еще одной добавки, 1-тиоглицерина, усилить пролиферацию HFSC-клеток.

На фиг. 5 показан эффект 1-тиоглицерина на пролиферацию HFSC-клеток. Начальная комбинация факторов роста (20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF) не позволяла размножать клетки (данные не показаны на фиг. 5, поскольку они выходили за пределы исчисляемого диапазона). Комбинация факторов роста, использованная, начиная с 3 пассажа (20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1), была эффективнее этой комбинации (20 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF), но не могла хорошо стимулировать пролиферацию HFSC-клеток после 4 пассажа (фиг. 4). Было исследовано множество кофакторов, связанных с биосинтезом и расщеплением жирных кислот, и родственных им тиолов с длинными углеводородными цепями. Затем был исследован эффект 1-тиоглицерина на HFSC-клетки, поскольку он является одним из тиоловых антиоксидантов и, согласно сообщениям, стимулирует пролиферацию некоторых клеток (т.е. мышинных эмбриональных нейронов коры и гиппокампа, тучных клеток мышинового костного мозга и человеческих В-клеточных линий) в культуре. Кроме того, исследовали также высокую дозу PDGF-AA (100 нг/мл) на предмет ее способности компенсировать снижение реактивности в отношении факторов роста.

Добавление 50 мкМ 1-тиоглицерина в присутствии 20 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF и 10 нг/мл IGF-1 несколько стимулировало пролиферацию, но число клеток все еще было уменьшенным (скорость размножения  $<1$ ). Этот результат был сходен с полученным в отсутствие 1-тиоглицерина при повышении концентрации PDGF-AA до 100 нг/мл в присутствии 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1. Тем не менее, при одновременном включении 50 мкМ 1-тиоглицерина в культуральную среду и повышенной концентрации PDGF-AA (100 нг/мл) (вместе с 10 нг/мл bFGF и 10 нг/мл IGF-1) эти два компонента, по-видимому, действовали синергично, значительно увеличивая число клеток (скорость размножения  $>1$ ). При удалении IGF-1 из этой смеси добавок (т.е. все добавки представляли собой 100 нг/мл PDGF-AA + 10 нг/мл bFGF + 50 мкМ 1-тиоглицерин), скорость размножения уменьшалась до  $<1$ , показывая, что IGF-1 также стимулировал пролиферацию и/или выживание HFSC-клеток. Тем не менее, при более длительном культивировании HFSC-клеток в этих условиях, их можно было размножать даже в таких условиях. Эти данные показали, что добавление 50 мкМ 1-тиоглицерина и увеличение концентрации PDGF-AA до 100 нг/мл, в дополнение к 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1, были важны для размножения клеток. Кроме того, добавление IGF-1 может не быть необходимым, однако эффективно увеличивало скорость размножения даже в присутствии 50 мкМ 1-тиоглицерина и 100 нг/мл PDGF-AA. Комбинация 50 мкМ 1-тиоглицерина и 100 нг/мл PDGF-AA, в дополнение к 10 нг/мл bFGF + 10 нг/мл IGF-1, была использована в дальнейшем для культивирования HFSC-клеток.

HFSC-клетки размножали далее в присутствии 100 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерина после 6 пассажа. Клетки начинали пролиферировать быстрее в этих условиях после пассажа, и их количество увеличивалось в 3-4 раза за неделю. В этих условиях время удвоения составляло приблизительно 60-100 ч. HFSC-клетки были способны сохранять такое пролиферативное состояние даже после 8 пассажа (см. фиг. 3, микрофотография D), 11 пассажа (см. фиг. 3, микрофотография E) и 19 пассажа (см. фиг. 3, микрофотография F). Таким образом, среда заданного химического состава, содержащая 100 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерин, была определена как оптимальные условия культивирования для длительного размножения нервных стволовых клеток и/или нервных клеток-предшественников.

Пример 3. Методика спонтанной дифференцировки HSCF-клеток.

При исследовании различных условий культивирования наблюдали, что при культивировании HFSC-клеток с удалением bFGF из среды многие из этих клеток, по-видимому, проходили дифференцировку с образованием биполярных или мультиполярных клеток (что характерно для олигодендроцитов) и вскоре погибали. Во избежание такой гибели клеток была разработана методика спонтанной дифференцировки.

Для размножения HFSC-клеток культуральную среду обычно меняли каждые 2 суток и полагали, что крайне важно сохранять пролиферативное состояние HFSC-клеток. В данном эксперименте для усиления дифференцировки клеток среду меняли каждые 3 или 4 суток. Полагали, что основной FGF и высокая концентрация PDGF-AA блокировали дифференцировку HFSC-клеток, но они были также важны для выживания HFSC-клеток. По этой причине концентрацию PDGF-AA снижали со 100 до 20 нг/мл в присутствии 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 с 50 мкМ 1-тиоглицерином или без 1-тиоглицерина. При

удалении bFGF выживание HFSC-клеток было неудовлетворительным. Обычно bFGF добавляли ежедневно для сохранения пролиферативного состояния HFSC-клеток. При прекращении добавления bFGF многие HFSC-клетки отделялись от их скоплений и образовывали сложные паутинообразные отростки (что характерно для проолигодендробластов и/или незрелых олигодендроцитов) при хорошем выживании, как показано на фиг. 7, микрофотографии А и В.

Эти отростчатые клетки с паутинообразной морфологией были положительны в отношении антигена О4 и/или антигена GalC, как показано на фиг. 7, микрофотографии С-Е, поэтому полагали, что они представляли собой проолигодендробласты (О4-положительные и GalC-отрицательные) или незрелые олигодендроциты (О4-положительные и GalC-положительные). Даже в присутствии 1-тиоглицерина HFSC-клетки были способны к дифференцировке, но при наличии в культуральной среде 1-тиоглицерина отростки выглядели менее сложными, как показано на фиг. 7, микрофотографии А и В. Кроме того, клетки других типов (например, астроциты и нейроны) наблюдали редко, и полагали, что HFSC-клетки склонны к дифференцировке с образованием клеток только олигодендроцитарной линии. Эта методика позволила наблюдать дифференцированные клетки олигодендроцитарной линии в здоровом состоянии.

Эти данные дополнительно показывают, что условия культивирования по настоящему изобретению особенно полезны для размножения выделенных нервных стволовых клеток и/или нервных клеток-предшественников, склонных к дифференцировке с образованием олигодендроцитов, поскольку большинство дифференцированных клеток демонстрировали признаки олигодендроцитов и были похожи на олигодендроциты или проолигодендроциты.

Пример 4. Индукция HFSC-клеток из обычных нервных стволовых клеток.

Как показано на фиг. 1, полагают, что обычные нервные стволовые клетки являются предшественниками HFSC-клеток. Для подтверждения этой взаимосвязи исследовали возможность индукции HFSC-клеток из обычных нервных стволовых клеток, о чем было сообщено ранее. Клетки из второго образца ткани человеческого эмбрионального спинного мозга (11 неделя беременности) сначала культивировали в присутствии 10 нг/мл EGF и 10 нг/мл bFGF в DMEM/F12, содержащей 2,5 мМ глутамин, 15 мМ NEPEPES, 2%-ную добавку B27, 1%-ные NEAA, 1,5 мМ пируват, 55 мкМ β-меркаптоэтанол и 1 мМ N-ацетил-L-цистеин, в течение 15 суток для размножения обычных нервных стволовых клеток. Изначально присутствовали клетки многих различных типов, но в конце первичного культивирования была получена популяция некоторых способных к размножению клеток. Эти результаты проиллюстрированы на фиг. 8, микрофотография А, на 15 сутки 0 пассажа. После первого пассажа клетки культивировали в тех же условиях, что и клон #2b (т.е. среда HFSCM1 с 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1, 100 нг/мл PDGF-AA и 50 мкМ 1-тиоглицерином) в течение 15 пассажей.

Морфология клеток из популяции способных к размножению клеток, полученной в конце первичного культивирования, становилась однородной приблизительно на 5 пассаже, и клетки были склонны к образованию скоплений и сфер, сходных с теми, что образовывал клон #2b (см. фиг. 8, микрофотографии В-Е). Кроме того, данный клон был способен к спонтанной дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии (данные не показаны), демонстрировал тот же иммунофенотип, что клон #2b (данные не показаны), и тот же паттерн экспрессии маркеров при проточной цитометрии, как описано в примере 7. Клетки этого клона замораживали для дальнейшего исследования (например, фиг. 12). Эти данные демонстрируют возможность индукции HFSC-клеток из обычных нервных стволовых клеток и то, что согласно предположениям, обычные нервные стволовые клетки являются предшественниками HFSC-клеток.

Полагали, что PDGF-AA действует через α-рецептор PDGF. Известно, что данный рецептор стимулируют все представители семейства PDGF (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC и PDGF-DD). PDGF-BB использовали для исследования возможности замены PDGF-AA на PDGF-BB при использовании HFSC-клеток клона #2b и клона #3. PDGF-BB позволял размножить оба клона в тех же условиях, за исключением PDGF-AA, и было доказано, что PDGF-AA может быть успешно заменен другими представителями семейства PDGF.

Пример 5. Подтверждение оптимальных компонентов клеточной культуры.

При исследовании различных условий культивирования после получения HFSC-клеток (клон #2b), автор изобретения отметил, что ответ на различные дозы каждого фактора роста изменился. Для выделения HFSC-клеток (клон #2b) была необходима повышенная концентрация PDGF-AA (100 нг/мл), в дополнение 50 мкМ 1-тиоглицерину. После того, как этот клон начинал постоянно пролиферировать, повышенная концентрация PDGF-AA (100 нг/мл) больше не была необходима для размножения данного клона. Скорость размножения становилась максимальной при приблизительно 10-20 нг/мл PDGF-AA, и повышенная концентрация PDGF-AA (100 нг/мл) не оказывала дополнительных эффектов на их рост. Это может быть обусловлено длительным культивированием или продолжительным использованием 1-тиоглицерина. Для получения клона #2b и клона #3 HFSC-клеток 1-тиоглицерин использовали после нескольких пассажей. Для исследования эффекта повышенной концентрации PDGF-AA новые клоны получали из исходной культуры в присутствии 1-тиоглицерина. Кроме того, ответ на bFGF и IGF-1, по видимому, становился максимальным при 20 и 40 нг/мл соответственно. При использовании повышен-

ной концентрации IGF-1 (50-500 нг/мл) можно было наблюдать больше дифференцированных клеток (по-видимому, приблизительно 1%). Поэтому 20 нг/мл IGF-1 рассматривали как предпочтительную концентрацию IGF-1 для размножения HFSC-клеток. Использование 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл IGF-1 увеличивало скорость размножения на 5-10%, по сравнению с использованием 10 нг/мл bFGF и 10 нг/мл IGF-1. По этой причине для данного эксперимента использовали 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл IGF-1.

HFSC-клетки из третьего образца (12 неделя беременности) культивировали для оценки необходимости повышенной концентрации PDGF-AA с определенными оптимальными компонентами культуральной среды и их способности обеспечивать сходные показатели роста у другой партии клеток. Клетки культивировали в той же культуральной среде, что клоны #2b и #3 (т.е. среде HFSCM1 и 50 мкМ 1-тиоглицерине) с 20 нг/мл (клон #4A) или 100 нг/мл (клон #4B) PDGF-AA, в дополнение к 20 нг/мл bFGF и 20 нг/мл IGF-1. В конце первого пассажа число клеток клона #4A составляло менее одной трети числа клеток клона #4B (см. фиг. 11, изображение А и изображение В). Тем не менее, после 1 пассажа клон #4A начинал пролиферировать со сходной с клоном #4B скоростью, даже при меньшей концентрации PDGF-AA, чем клон #4B. Морфология клеток становилась однородной на 3 пассаже, и клетки были склонны к образованию скоплений и сфер, сходных с теми, что образовывал клон #2b или #3 (см. фиг. 10, микрофотографии С-Ф). Кроме того, эти клетки были способны к спонтанной дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии, как клоны #2b и #3. Этот результат показал, что повышенная концентрация PDGF-AA не являлась необходимой, но была предпочтительной для выделения HFSC-клеток и что после получения HFSC-клеток не было необходимости в повышенной концентрации PDGF-AA. Кроме того, данный способ культивирования позволял обеспечивать сходные показатели роста у другой партии клеток, и была подтверждена воспроизводимость данного способа. Клетки этого клона замораживали для дальнейшего исследования.

Пример 6. Способность размноженных HFSC-клеток к восстановлению и росту после цикла заморозания-оттаивания.

Клетки клона #2b криоконсервировали в присутствии 8%-ного DMSO (диметилсульфоксид) на 10, 11 и 12 пассажах. HFSC-клетки (клон #2b), замороженные на 11 пассаже, были депонированы в ATCC (Американская коллекция клеточных культур) (регистрационный номер РТА-12291). Клетки клона #3 также криоконсервировали в присутствии 8%-ного DMSO на 9 и 10 пассажах. Клетки клонов #4A и #4B росли быстрее клона #2b или #3, поэтому их криоконсервировали в присутствии 8%-ного DMSO на 4 и 5 пассажах (клон #4A) или на 3, 4 и 5 пассажах (клон #4B) в тех же условиях. Для заморозки HFSC-клеток использовали ту же среду для культивирования HFSC-клеток (среду HFSCM1 и 50 мкМ 1-тиоглицерин). Затем клетки размораживали и культивировали в описанной выше свободной от сыворотки среде HFSCM1 и 50 мкМ 1-тиоглицерине с 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1, 100 нг/мл PDGF-AA или 20 нг/мл bFGF, 20 нг/мл IGF-1, 20 нг/мл PDGF-AA. Наблюдали пролиферацию этих клеток со скоростью, сходной со скоростью пролиферации клеток перед замораживанием (см. фиг. 6, 9 и 11). Замороженные клетки использовали для дальнейших экспериментов, показанных на фиг. 12-15.

Пример 7. Описание размноженных и недифференцированных HFSC-клеток.

При культивировании HFSC-клеток по примеру 2 в присутствии 100 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерина они росли скоплениями и/или сферами, как показано на фиг. 3, микрофотографии D-F. Расположенные поодиночке клетки, отделившиеся от скоплений, демонстрировали тенденцию к дифференцировке с образованием олигодендроцитов, как показано на фиг. 3, микрофотографии D и E. Даже при пассировании клеток в форме отдельных клеток они, в конечном счете, начинали группироваться и снова образовывать скопления. Их форма в этом пролиферативном состоянии была похожа на клетки-предшественники олигодендроцитов (см. Ben-Nur et al., *J. Neurosci.*, 18:5777, 1998; Gago et al., *Mol. Cell. Neurosci.*, 22:162, 2003), но не на O-2A-предшественники, растущие с биполярной морфологией без образования каких-либо скоплений. Даже крысиные клетки-предшественники олигодендроцитов давно описаны, аналогичные человеческие клетки не описаны до сих пор. Тем не менее, в определении точной стадии развития клеток-предшественников олигодендроцитов в данной культуре размноженных клеток не было необходимости, поскольку они в любом случае сохраняли свою способность к дифференцировке с образованием олигодендроцитов (как показано ниже).

Для описания иммунофенотипа недифференцированных HFSC-клеток клетки на 11-15 пассажах разделяли на отдельные клетки с использованием Accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA), выращивали в покрытых полиорнитинном 24-луночных культуральных планшетах и культивировали в течение 3-7 суток в присутствии 100 нг/мл PDGF-AA, 10 нг/мл bFGF, 10 нг/мл IGF-1 и 50 мкМ 1-тиоглицерина. Затем клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом, после чего отмывали PBS (фосфатно-солевой буферный раствор). Для окрашивания поверхностных антигенов, таких как CD133, PDGF-R $\alpha$ , NG2, A2B5, O4, O1, GalC и PSA-NCAM, клетки блокировали с использованием PBS, содержащего 3% нормальной козьей сыворотки (NGS), и окрашивали антителами. Для окрашивания внутриклеточных антигенов, таких как Sox2, нестин, Olig2, основной белок миелина (МВР), виментин, GFAP,  $\beta$ III-тубулин, нейрофиламент-L и MAP2, клетки пермеабелизировали с использованием 0,1% Triton X-100 в ледяном

PBS в течение 10 мин перед блокировкой. Мышиное моноклональное антитело IgG1 против CD133/1 (Clone AC133, Miltenyi Biotec), кроличье поликлональное антитело против PDGF-R $\alpha$  (Upstate), кроличье поликлональное антитело против NG2 (Millipore), мышиное моноклональное антитело IgM против PSA-NCAM (Millipore), мышиное моноклональное антитело IgM против A2B5 (Millipore), мышиное моноклональное антитело IgM против O4 (R&D Systems), мышиное моноклональное антитело IgM против O1 (Millipore), кроличье поликлональное антитело против Sox2 (Millipore), мышиное моноклональное антитело IgG1 против нестина (Millipore), мышиное моноклональное антитело IgG2a против Olig2, моноклональное антитело IgG3 против GalC (Millipore), крысиное моноклональное антитело IgG2a против MBP (Millipore), мышиное моноклональное антитело IgG1 против виментина (Santa Cruz), кроличье поликлональное антитело против GFAP (Millipore), мышиное моноклональное антитело IgG1 против  $\beta$ III-тубулина (Millipore), мышиное моноклональное антитело IgG1 против нейрофиламента-L (Cell Signaling), кроличье поликлональное антитело против MAP2 (Millipore) и мышиное моноклональное антитело IgG1 против MAP2 (Millipore) использовали в разведении 1:300 (CD133/1), 1:300 (PDGF-R $\alpha$ ), 1:600 (NG2), 1:1000 (PSA-NCAM), 1:1000 (A2B5), 1:1000 (O4), 1:1000 (O1), 1:1000 (Sox2), 1:200 (нестин), 1:200 (Olig2), 1:100 (GalC), 1:50 (MBP), 1:500 (виментин), 1:1000 (GFAP), 1:100 ( $\beta$ III-тубулин), 1:200 (нейрофиламент-L), 1:1000 (MAP2, поликлональное) или 1:200 (MAP2, моноклональное) в PBS, содержащем 3% NGS. После инкубации в течение ночи при 4°C лунки отмывали 3 объемами PBS, содержащего 3% NGS. В некоторых случаях применяли окрашивание некоторых поверхностных клеточных антигенов (NG2, A2B5, O4, O1 и GD3) на живых клетках для ослабления неспецифических сигналов. В таком случае клетки окрашивали каждым первичным антителом перед фиксацией без блокировки. Кроличье поликлональное антитело против NG2, мышиное моноклональное антитело IgM против A2B5, мышиное моноклональное антитело IgM против O4, мышиное моноклональное антитело IgM против O1 и мышиное моноклональное антитело IgG3 против дисиаialogанглиозида GD3 (Millipore) использовали в разведении 1:150 (NG2), 1:100 (A2B5), 1:200 (O4), 1:100 (O1) и 1:200 (GD3) в PBS, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA). После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре лунки промывали 3 объемами PBS, содержащего 0,5% BSA. Вторичные антитела, конъюгированное с DyLight 488 козье антитело AffiniPure против кроличьего IgG (специфичное в отношении Fc $\gamma$ -фрагмента), конъюгированное с DyLight 488 козье антитело AffiniPure против мышиного IgG (специфичное в отношении Fc $\gamma$ -фрагмента), конъюгированное с DyLight 488 козье антитело AffiniPure против кроличьего IgG (H+L), конъюгированное с DyLight 488 козье антитело AffiniPure против крысиного IgG (H+L), конъюгированное с DyLight 594 козье антитело AffiniPure против мышиного IgG (H+L) и/или конъюгированное с DyLight 594 козье антитело AffiniPure против мышиного IgM (специфичное в отношении цепи и) (все вторичные антитела были приобретены у Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) использовали в разведении 1:500 в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки отмывали 2 объемами PBS. DAPI использовали для контрастного окрашивания клеточных ядер. Затем клетки наблюдали с использованием Olympus IX81, оборудованного для эпифлуоресцентного исследования.

Большинство HFSC-клеток были CD133-положительны (см. фиг. 12, микрофотографии A и B), Sox2-положительны (см. фиг. 12, микрофотографии C и D) и нестин-положительны (см. фиг. 12, микрофотографии E и F), что характерно для нервных стволовых клеток. Большинство HFSC-клеток были Olig2-положительны (что часто характерно для клеток-предшественников двигательных нейронов и олигодендроцитов) (см. фиг. 12, микрофотографии G и H), PDGF-R $\alpha$ -положительны (что часто характерно для клеток олигодендроцитарной линии) (см. фиг. 12, микрофотографии I и J), A2B5-положительны (A2B5 обычно отсутствует у нервных стволовых клеток, и его обнаруживают на глиальных клетках-предшественниках, клетках-предшественниках олигодендроцитов и астроцитах 2 типа) (см. фиг. 12, микрофотографии M и N), что характерно для клеток-предшественников олигодендроцитов. Большинство HFSC-клеток были PSA-NCAM-положительны (см. фиг. 12, микрофотографии O и P), но уровни ее экспрессии варьировали (PSA-NCAM обычно отсутствует у нервных стволовых клеток, и ее обнаруживают на клетках-предшественниках нейронов и клетках-предшественниках олигодендроцитов). GFAP-положительные клетки обнаружены не были, в то время как большинство клеток были виментин-положительны (см. фиг. 12, микрофотографии Q-S). По меньшей мере 90% HFSC-клеток, по-видимому, были положительны в отношении указанных выше маркеров, за исключением GFAP, но точный подсчет был крайне затруднен, поскольку HFSC-клетки были склонны к образованию скоплений и очень легкому отделению от культуральных емкостей при фиксации и окрашивании. Для количественной оценки их чистоты проводили проточно-цитометрический анализ, показанный на фиг. 13.

Кроме того, недифференцированные HFSC-клетки слабо окрашивались антителом против O4, являющегося маркером проолигодендробластов (O4-положительных, GalC-отрицательных) и незрелых олигодендроцитов (O4-положительных, GalC-положительных), при иммуноцитохимическом исследовании, однако отличить слабое окрашивание от неспецифического было затруднительно. В данной культуре можно было наблюдать некоторое количество проолигодендробластов, демонстрирующие выражено O4-положительные клетки с мультиполярной морфологией, но частота их появления составляла менее 1% всех клеток.

Кроме того, недифференцированные HFSC-клетки слабо окрашивались антителом против MAP2, но их морфология не была похожа на нейроны. При использовании антитела с клетками, прошедшими дифференцировку в присутствии сыворотки, нейроны были определены по сильным сигналам и нейрональной морфологии (см. фиг. 14, микрофотография Н). У недифференцированных HFSC-клеток такого сильного сигнала MAP2 и нейрональной морфологии определено не было. Этот слабый сигнал исчезал при дифференцировке клеток, таким образом, это окрашивание, по-видимому, было специфичным, и окрашивание недифференцированных HFSC-клеток могло не быть неспецифичным.

В целом, HFSC-клетки экспрессировали определенные маркеры нервных стволовых клеток (CD133, Sox2 и нестин) и определенные маркеры клеток олигодендроцитарной линии (Olig2, NG2, A2B5 и O4). Эти данные позволили предположить, что HFSC-клетки могут быть промежуточными клетками между нервными стволовыми клетками и клетками-предшественниками олигодендроцитов. Кроме того, помимо указанных выше антигенов HFSC-клетки экспрессировали PSA-NCAM, указывая на то, что они являются человеческим аналогом крысиных клеток-предшественников олигодендроцитов.

Полисиаловая кислота (PSA) в составе PSA-NCAM представляет собой длинный отрицательно заряженный гликан клеточной поверхности, объем которого значительно увеличивается при гидратации, что позволяет изменять расстояние между клетками. PSA вовлечена в ряд ответов в ЦНС взрослых, связанных с пластичностью, включая изменения циркадных и гормональных паттернов, адаптацию к боли и стрессу и некоторые аспекты обучения и памяти (Rutishauser *Nat. Rev. Neurosci.*, 9:26, 2008). Одна из функций PSA в неонатальной нервной системе состоит в миграции предшественников олигодендроцитов. В раневой модели удаление PSA при миграции O2A-предшественников ингибировало миграцию O2A-предшественников (Barral-Moran et al., *J. Neurosci. Res.*, 72:679, 2003). Другая функция состоит во временном контроле дифференцировки клеток. PSA экспрессирована как на развивающихся аксонах, так и на предшественниках олигодендроцитов, и ее понижающая регуляция в этих клетках коррелирует с началом миелинизации. PSA также связана с ответами в ЦНС взрослых, связанными с пластичностью. С учетом способности PSA регулировать пластичность развития и пластичность у взрослых можно сделать вывод, что клетки, экспрессирующие PSA, могут иметь терапевтическую ценность в ситуации, когда ткани были повреждены в результате травмы или заболевания. В модели травмы наблюдали регенерацию аксонов через рубец в области экспрессии PSA (экспрессии конструированной PSA в рубце или на трансплантированных шванновских клетках). HFSC-клетки являются эндогенными клетками, экспрессирующими PSA, и будут оказывать такой же эффект при лечении травмы, такой как повреждение головного мозга или повреждение спинного мозга.

Для дальнейшего описания HFSC-клеток (клон #2b) клетки, замороженные на 11 пассаже, размораживали, культивировали в ростовых условиях, описанных выше, и пассировали каждые 7-9 суток. Клетки, культивированные в течение 9 суток на 13 пассаже, затем использовали для проточной цитометрии с использованием следующих антител: конъюгированного с фикоэритрином (PE) мышинового моноклонального антитела IgG1 против CD133/1 (клон AC133, Miltenyi Biotec); конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела IgG2a против CD140 $\alpha$  (клон  $\alpha$ R1, BD Pharmingen); конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела IgG1 против CD9 (клон M-L13, BD Pharmingen); конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела IgG2b против CD44 (клон G44-26, BD Pharmingen); конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела IgM против PSA-NCAM (2-2B, Miltenyi Biotec); конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела IgM против A2B5 (клон 105HB29, Miltenyi Biotec); конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела IgM против O4 (клон O4, Miltenyi Biotec); и конъюгированного с PE мышинового моноклонального антитела IgG1 против NG2 (R&D Systems). Кратко, после разделения с использованием Accutase клетки отмывали и ресуспендировали в ледяном PBS с 2 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) и 0,5% BSA и держали на льду. После этого подсчитывали число клеток и корректировали его до  $1 \times 10^7$  клеток/мл с использованием ледяного PBS с 2 мМ EDTA и 0,5% BSA. В каждую пробирку объемом 1,5 мл переносили 25 мкл суспензии клеток (250000 клеток). Затем в каждую пробирку добавляли первичные антитела, следуя рекомендациям изготовителя. Конъюгированные с PE изотипические контроли для каждого антитела использовали для определения подходящих гейтов. После 20 мин инкубации на льду клетки промывали ледяным PBS с 2 мМ EDTA и 0,5% BSA и ресуспендировали в фиксирующем буфере (BD Bioscience). После 20 мин фиксации на льду клетки промывали и ресуспендировали в ледяном PBS с 2 мМ EDTA и 0,5% BSA. Флуоресценцию клеток измеряли с использованием FACS Canto II (BD Bioscience) и все данные анализировали с использованием программного обеспечения Gatelogic (Inivai Technologies Pty Ltd.).

Как показано на фиг. 13, все или почти все HFSC-клетки (клон #2b) были CD133-положительны (100% клеток), CD9-положительны (100% клеток), CD140 $\alpha$ -положительны (98,8% клеток), NG2-положительны (89,8% клеток), A2B5-положительны (99,9% клеток), O4-положительны (94,6% клеток), PSA-NCAM-положительны (68,9% клеток) и CD44-отрицательны (0,4% клеток были положительны). При иммуноцитохимическом исследовании сигнал O4 был трудноотличим от неспецифического окрашивания и был значительно слабее сигнала O4 проолигодендробластов или олигодендроцитов. По результатам проточной цитометрии сигнал O4 HFSC-клеток (клон #2b) можно было отличить от изотипи-

ческого контроля, и HFSC-клетки (клон #2b), по-видимому, были слабоположительны в отношении антигена O4. HFSC-клетки (клон #3) демонстрировали почти такой же фенотип при проточной цитометрии. Они были CD133-положительны (98,4% клеток), CD9-положительны (99,4% клеток), CD140 $\alpha$ -положительны (91,5% клеток), NG2-положительны (63,4% клеток), A2B5-положительны (99,8% клеток), O4-положительны (71,6% клеток), PSA-NCAM-положительны (74,7% клеток) и CD44-отрицательны (0,3% клеток были положительны).

Пример 8. Потенциал дифференцировки размноженных HFSC-клеток в среде, содержащей сыворотку.

Для исследования потенциала дифференцировки размноженных клеток, HFSC-клетки (клон #3) пассировали для разделения на отдельные клетки и культивировали в среде, содержащей сыворотку [среде для дифференцировки клеток-предшественников олигодендроцитов (OPCDM)] (ScienCell™ Research Laboratories) для стимуляции дифференцировки. Затем клетки окрашивали антителами, распознающими нейроны (антителом против  $\beta$ III-тубулина, антителом против нейрофиламента-L и антителом против MAP2), клетки-предшественники олигодендроцитов и олигодендроциты [антителом против O4, антителом против O1, антителом против GalC и антителом против основного белка миелина (MBP)] и астроциты (антителом против GFAP), с последующей окраской вторичным антителом, конъюгированным с флуоресцентным красителем (DyLight 488 или DyLight 594, Jackson ImmunoResearch). DAPI использовали для контрастного окрашивания ядер.

После обработки, стимулирующей дифференцировку HFSC-клеток, наблюдали все три основных фенотипа центральной нервной системы (ЦНС). При культивировании HFSC-клеток в среде, содержащей сыворотку, были выявлены  $\beta$ III-тубулин-положительные, нейрофиламент-L-положительные и MAP-2-положительные клетки (что характерно для нейронов),  $\beta$ III-тубулин-положительных клеток было много (фиг. 14, микрофотография В), в то время как число клеток, положительных в отношении нейрофиламента-L (фиг. 14, микрофотография Е) или MAP2 (фиг. 14, микрофотография Н), было небольшим. Этот результат показывает, что многие из них представляют собой незрелые нейроны. HFSC-клетки могли также проходить дифференцировку с образованием MBP-положительных клеток. MBP является основным компонентом миелина и экспрессирован только в зрелых олигодендроцитах. Эти данные показывают, что HFSC-клетки способны к дифференцировке с образованием зрелых олигодендроцитов. Оценивали колокализацию MBP и указанных выше маркеров нейронов, однако можно было наблюдать лишь незначительную колокализацию (фиг. 14, микрофотографии С, F, I). Это может быть обусловлено незрелостью нейронов, поскольку аксоны незрелых нейронов не покрыты миелином. Также оценивали колокализацию MBP и антигена O4 (фиг. 14, микрофотографии J-L). Большая часть сигнала MBP была колокализована с сигналом антигена O4, но лишь половина сигнала антигена O4 была колокализована с сигналом MBP. Этот результат был объясним, поскольку антиген O4 экспрессирован на предшественниках олигодендроцитов, незрелых олигодендроцитах и зрелых олигодендроцитах, в то время как MBP экспрессирован только на зрелых олигодендроцитах. Эти клетки были также положительны в отношении антигена GalC, являющегося маркером незрелых олигодендроцитов (данные не показаны). Также были выявлены GFAP-положительные клетки (астроциты) и виментин-положительные клетки, как показано на фиг. 14, микрофотографии M-O. Эти данные показывают, что размноженные HFSC-клетки мультипотентны, и, следовательно, они, вероятно, представляют собой нервные стволовые клетки, поскольку они способны образовывать клетки трех основных фенотипов центральной нервной системы, в зависимости от среды. HFSC-клетки (клон #2b) также исследовали в тех же условиях, и они демонстрировали такую же мультипотентность, что и HFSC-клетки (клон #3).

Пример 9. Потенциал дифференцировки размноженных HFSC-клеток в свободной от сыворотки среде.

HFSC-клетки продемонстрировали хороший потенциал дифференцировки с образованием олигодендроцитов при снижении концентрации PDGF-AA без добавления bFGF, как показано на фиг. 5. Тем не менее, дифференцированные клетки составляли менее половины общего числа клеток. При высевании HFSC-клеток в очень низкой плотности ( $<0,5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>) без bFGF с 10 нг/мл PDGF-AA и 100 нг/мл IGF-1, большинство клеток, по-видимому, проходили дифференцировку, но были утрачены в течение суток. Полагали, что для дальнейшего исследования их способности к дифференцировке с образованием олигодендроцитов крайне важными были индукция дифференцировки и длительное выживание клеток. Известно, что cAMP (циклический аденозинмонофосфат) индуцирует дифференцировку клеток многих типов. Исследовали возможность индукции дифференцировки HFSC-клеток с использованием pCPT-cAMP, являющегося аналогом cAMP, проникающим в клетки. 100 мкМ pCPT-cAMP позволял индуцировать дифференцировку HFSC-клеток при их высокой плотности ( $3 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>), но клетки не могли эффективно выживать даже в присутствии 100 нг/мл IGF-1. Согласно сообщениям, BDNF усиливает дифференцировку предшественников олигодендроцитов и поддерживает выживание дифференцированных клеток. При дифференцировке HFSC-клеток в присутствии 10 нг/мл PDGF-AA, 100 нг/мл IGF-1, 100 мкМ pCPT-cAMP и 10 нг/мл BDNF в DMEM/F12, содержащей глутамин и HEPES и дополненной добавкой B27, добавкой N2 и 50 мкМ 1-тиоглицерином по меньшей мере более половины HFSC-клеток

проходили дифференцировку с образованием отростчатых клеток. Поскольку HFSC-клетки экспрессируют несколько маркеров олигодендроцитов, таких как O4 или NG2, был необходим новый способ различения HFSC-клеток и клеток олигодендроцитарной линии. На основании нескольких экспериментов автор изобретения отметил, что недифференцированные клетки экспрессируют GD3 сильнее клеток-предшественников олигодендроцитов, а в случае O4 - наоборот (стрелки на фиг. 11, микрофотография А, микрофотография В и микрофотография С). При окрашивании клеток на GD3 и O4 олигодендроциты можно было отличить по характеру их окрашивания и их морфологии. Кроме того, также можно было определить клетки других типов, такие как нейроны или астроциты, поскольку они не экспрессируют GD3 или антиген O4. На фиг. 15, изображение D, показана доля клеток каждого типа. Недифференцированные клетки составляли  $23,5 \pm 2,0\%$  всех клеток. Клетки-предшественники олигодендроцитов составляли  $75,8 \pm 2,1\%$  всех клеток. Клетки других типов составляли лишь  $0,9 \pm 0,6\%$ . Как указано выше, отношение клеток-предшественников олигодендроцитов к дифференцированным клеткам других типов (клетки-предшественники олигодендроцитов плюс клетки других типов) составляло  $99,1 \pm 0,56\%$  дифференцированных клеток, в то время как клетки других типов составляли  $0,9 \pm 0,56\%$  дифференцированных клеток. Эти данные показывают, что HFSC-клетки обладают высоким потенциалом дифференцировки с образованием клеток олигодендроцитарной линии.

Пример 10. Обогащение или селекция HFSC-клетки способом сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) или способом магнитной сортировки.

Согласно настоящему изобретению раскрыт фенотип HFSC-клетки, являющейся CD133-положительной, CD140 $\alpha$ -положительной, CD9-положительной, CD44-отрицательной, PSA-NCAM-положительной, A2B5-положительной, O4-положительной и NG2-положительной. Эта информация позволяет проводить селекцию или обогащение HFSC-клетки без культивирования. CD133 является маркером нервных стволовых клеток и не экспрессирован на клетках-предшественниках. CD9 также используют как маркер нервных стволовых клеток, однако известно, что некоторые олигодендроциты экспрессируют CD9. PSA-NCAM и A2B5 используют для выявления нейрон-рестриктированных предшественников или глия-рестриктированных предшественников. Полагают, что большинство предшественников нейронов экспрессируют PSA-NCAM и A2B5 или один из PSA-NCAM и A2B5, их использование не позволяет эффективно проводить обогащение HFSC-клеток, особенно в первом и втором триместрах. CD140 $\alpha$ , NG2, A2B5 и O4 используют в качестве маркеров клеток-предшественников олигодендроцитов, проолигодендроглии и олигодендроцитов. Уровень экспрессии CD140 $\alpha$  и NG2 в HFSC-клетках был выше, чем у клеток-предшественников олигодендроцитов, проолигодендроглии или олигодендроцитов, в то время как уровень экспрессии A2B5 и O4 в HFSC-клетках был ниже, чем у клеток-предшественников олигодендроцитов, проолигодендроглии или олигодендроцитов. Полагают, что применение CD140 $\alpha$  и NG2 будет более подходящим для обогащения HFSC-клетки. На основании приведенной выше информации и данных, описанных в данном изобретении, эффективность каждого маркера для обогащения HFSC-клетки будет следующей: CD140 $\alpha$  > NG2 > CD9 > CD133 > A2B5 > O4, PSA-NCAM, но этот порядок будет варьировать в зависимости от недели беременности.

Тем не менее, одного маркера может быть недостаточно для селекции HFSC-клеток, и комбинация 2 маркеров может обеспечить более специфичную селекцию HFSC-клетки. Комбинация одного из маркеров нервных стволовых клеток (CD133 или CD9) и одного из маркеров олигодендроцитарной линии (CD140 $\alpha$ , NG2) будет очень эффективной для селекции HFSC-клеток. На основании приведенных выше сведений, наиболее эффективной из этих комбинаций маркеров для селекции HFSC-клеток будет комбинация CD33 и CD140 $\alpha$ , но другие комбинации также должны быть более эффективными, чем селекция с использованием одного маркера.

Частота появления CD133 или CD140 $\alpha$  обычно невысока (менее 5%) и CD140 $\alpha$  появляется позже (экспрессия начинается приблизительно на 8 неделе и максимальна приблизительно на 18 неделе беременности), чем CD133. Поэтому клеток, экспрессирующих как CD133, так и CD140 $\alpha$ , будет очень мало (менее 1% общего числа клеток), в зависимости от недели беременности. Большинство CD133-положительных клеток не могут экспрессировать CD140 $\alpha$ , если клетки имеют происхождение от человеческой эмбриональной ткани на 15 недели беременности или ранее. Поскольку CD133-положительные и CD140 $\alpha$ -отрицательные клетки будут экспрессировать CD140 $\alpha$  позднее, HFSC-клетки могут быть получены при культивировании в тех же условиях для HFSC-клеток после начального обогащения CD133-положительных клеток.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способная к размножению человеческая нервная клетка, представляющая собой клетку-предшественник или стволовую клетку, экспрессирующую поверхностные клеточные антигены CD133, CD140 $\alpha$ , A2B5 и PSA-NCAM (полисиалирированная молекула адгезии нервных клеток), которая была выделена из человеческой эмбриональной нервной ткани и которая была получена путем культивирования в подходящих для размножения нервной клетки условиях в бессывороточной культуральной среде, со-

держашей ростовую добавку, два фактора роста и один фактор выживания, где ростовая добавка представляет собой 20-40 мкМ 1-тиоглицерина, факторы роста представляют собой тромбоцитарный фактор роста (PDGF) в концентрации 10-100 нг/мл и основной фактор роста фибробластов (bFGF) в концентрации 10-20 нг/мл, а фактор выживания представляет собой инсулиноподобный фактор роста (IGF) в концентрации 10-40 нг/мл, причем указанная клетка сохраняет свою способность к дифференцировке с образованием нейронов, астроцитов и олигодендроцитов, а также способность к эффективной дифференцировке с образованием клеток олигодендроцитарной линии в течение последующих пассажей.

2. Способная к размножению человеческая нервная клетка по п.1, депонированная в АТСС под номером РТА-12291.

3. Способная к размножению человеческая нервная клетка по п.1, где указанная эмбриональная нервная ткань выбрана из ткани спинного мозга, коры головного мозга, гиппокампа, полосатого тела, базальной части переднего мозга, вентральной части среднего мозга, голубого пятна, гипоталамуса, мозжечка, мозолистого тела и зрительного нерва.

4. Способная к размножению человеческая нервная клетка по п.3, где ткань спинного мозга представляет собой ткань спинного мозга человеческого эмбриона на 8-24 неделе беременности.

5. Способная к размножению человеческая нервная клетка по п.1, представляющая собой HFSC-клетку, выделенную из человеческого эмбрионального спинного мозга с использованием бессывороточной среды, содержащей PDGF в концентрации от 20 до 100 нг/мл и bFGF в концентрации от 10 до 20 нг/мл.

6. Способная к размножению человеческая нервная клетка по п.1, представляющая собой HFSC-клетку, выделенную из человеческого эмбрионального спинного мозга с использованием бессывороточной среды, содержащей приблизительно от 40 нг/мл до 100 нг/мл PDGF и приблизительно от 10 нг/мл до 20 нг/мл bFGF.

7. Способная к размножению человеческая нервная клетка по п.1, представляющая собой HFSC-клетку, выделенную из человеческого эмбрионального спинного мозга с использованием бессывороточной среды, содержащей приблизительно 100 нг/мл PDGF и приблизительно 20 нг/мл bFGF.

8. Способная к размножению человеческая нервная клетка по п.1, которая была культивирована в бессывороточной среде, содержащей приблизительно 20 нг/мл PDGF и приблизительно 20 нг/мл bFGF.

9. Способная к размножению человеческая нервная клетка по п.1, которая была культивирована в бессывороточной среде, содержащей приблизительно 20 нг/мл IGF.

10. Способ получения клетки по п.1 *in vitro*, включающий:

а) выделение по меньшей мере одной клетки-предшественника или стволовой клетки из человеческой эмбриональной нервной ткани;

б) культивирование клетки при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 1-20% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>, и в бессывороточной культуральной среде, содержащей

10-100 нг/мл PDGF,

10-20 нг/мл bFGF,

10-40 нг/мл IGF-1 и

20-40 мкМ 1-тиоглицерина;

в) пассирование клетки, полученной на стадии (б), с получением охарактеризованной в п.1 клетки.

11. Способ по п.10, где указанная эмбриональная нервная ткань выбрана из ткани спинного мозга, коры головного мозга, гиппокампа, полосатого тела, базальной части переднего мозга, вентральной части среднего мозга, голубого пятна, гипоталамуса, мозжечка, мозолистого тела и зрительного нерва.

12. Способ по п.11, где указанная ткань спинного мозга представляет собой ткань спинного мозга человеческого эмбриона на 8-24 неделе беременности.

13. Способ по п.11, где на стадии (а) выделение клетки проводят посредством сортировки клеток с возбуждением флуоресценции (FACS) или иммунологического пэннинга.

14. Способ по п.10, где указанная культуральная среда содержит

40-100 нг/мл PDGF,

10-20 нг/мл bFGF,

20-40 мкМ 1-тиоглицерина и

10-40 нг/мл IGF-1.

15. Способ по п.10, где указанная культуральная среда содержит

приблизительно 100 нг/мл PDGF,

приблизительно 20 нг/мл bFGF,

приблизительно 40 мкМ 1-тиоглицерина и

приблизительно 20 нг/мл IGF-1.

16. Способ по п.10, где указанная культуральная среда содержит

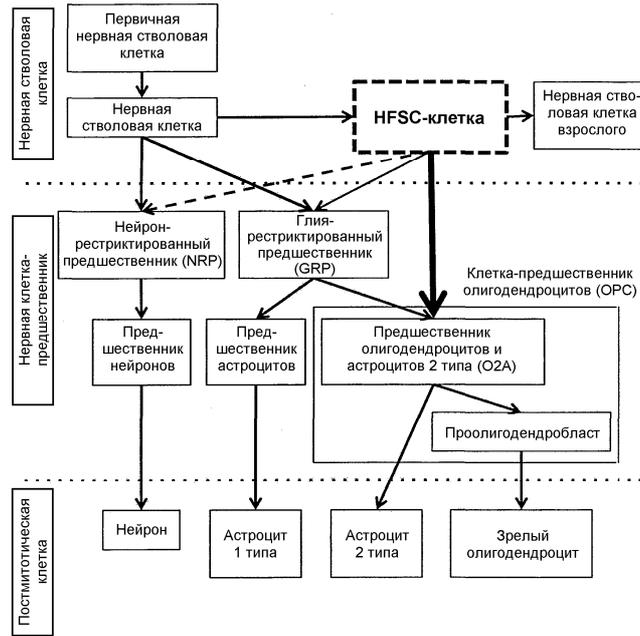
приблизительно 20 нг/мл PDGF,

приблизительно 20 нг/мл bFGF,

приблизительно 40 мкМ 1-тиоглицерина и

приблизительно 20 нг/мл IGF-1.

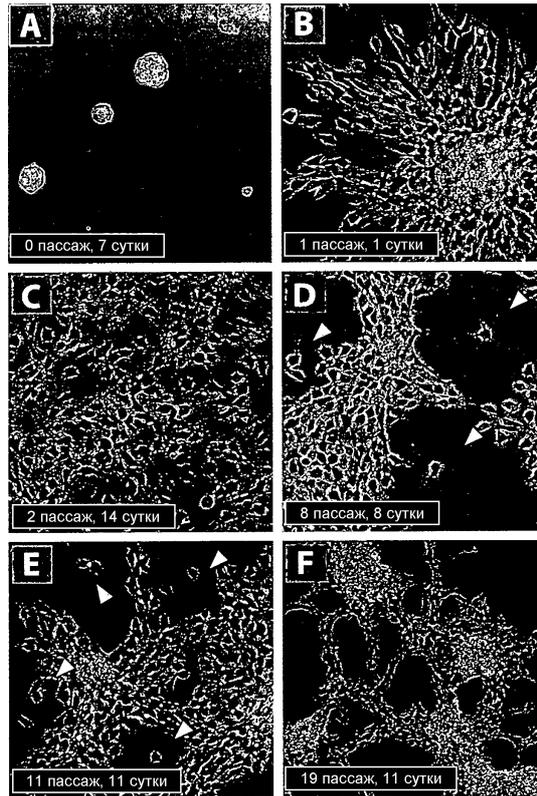
17. Способ по п.10, где указанную стадию культивирования проводят в культуральной емкости, покрытой полиорнитиним или полилизиним.
18. Способ по п.10, где бессывороточная культуральная среда дополнительно содержит DMEM/F12, заменимые аминокислоты, глутамин, пируват, добавку B27, N-ацетилцистеин и  $\beta$ -меркаптоэтанол.
19. Клеточная культура для лечения состояния, вызванного утратой миелина или утратой олигодендроцитов, содержащая более чем одну выделенную нервную клетку по п.1, погруженную в бессывороточную культуральную среду, содержащую
- 5-100 нг/мл PDGF,
  - 5-20 нг/мл bFGF и
  - 10-40 мкМ 1-тиоглицерина.
20. Клеточная культура по п.19, дополнительно содержащая 1,0-40 нг/мл IGF-1.
21. Клеточная культура по п.19, которая находится в культуральной емкости, покрытой полиорнитиним или полилизиним.
22. Клеточная культура по п.19, где бессывороточная культуральная среда дополнительно содержит DMEM/F12, заменимые аминокислоты, глутамин, пируват, добавку B27, N-ацетилцистеин и  $\beta$ -меркаптоэтанол.
23. Способ лечения состояния, вызванного утратой миелина или утратой олигодендроцитов, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества композиции, содержащей клетку по п.1.
24. Способ по п.23, где указанное состояние представляет собой демиелинизирующее заболевание или нейродегенеративное заболевание.
25. Способ по п.24, где указанное демиелинизирующее заболевание выбрано из группы, состоящей из повреждения спинного мозга (SCI), рассеянного склероза (MS), наследственной лейкодистрофии, поперечной миелопатии/поперечного миелита, прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии и других врожденных демиелинизирующих заболеваний.
26. Способ по п.24, где указанное нейродегенеративное заболевание выбрано из болезни Альцгеймера, сенильной деменции альцгеймеровского типа (SDAT), болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, бокового амиотрофического склероза (ALS), ишемии, слепоты и нейродегенеративного заболевания, вызванного повреждением миелинизированных нейронов.
27. Способ по п.24, где введение указанной композиции осуществляют путем инъекции в нервную ткань или боковые желудочки головного мозга, пораженные демиелинизирующим заболеванием или нейродегенеративным заболеванием.
28. Способ по п.27, где указанная нервная ткань выбрана из ткани спинного мозга, субвентрикулярной зоны, мозолистого тела, мозжечка, базальных ганглиев, базального ядра и черной субстанции.
29. Способ по п.25, где введение указанной композиции осуществляют путем интравентрикулярной инъекции, интрапаренхимальной инъекции, инъекции в стекловидное тело, внутрисосудистой инъекции или, когда субъектом является плод, интравентрикулярной инъекции плоду через стенку матки.
30. Фармацевтическая композиция для лечения состояния, вызванного утратой миелина или утратой олигодендроцитов, содержащая клетку по п.1.
31. Применение фармацевтической композиции по п.30 в изготовлении лекарственного средства для лечения состояния, вызванного утратой миелина или утратой олигодендроцитов.
32. Применение по п.31, где указанное состояние представляет собой демиелинизирующее заболевание или нейродегенеративное заболевание.
33. Применение по п.32, где указанное демиелинизирующее заболевание выбрано из группы, состоящей из повреждения спинного мозга (SCI), рассеянного склероза (MS), наследственной лейкодистрофии, поперечной миелопатии/поперечного миелита, прогрессирующей мультифокальной лейкоэнцефалопатии и других врожденных демиелинизирующих заболеваний.
34. Способ получения линии олигодендроцитарных клеток *in vitro*, включающий
- выделение нервной клетки из человеческой эмбриональной нервной ткани;
  - культивирование выделенной клетки в подходящих для размножения клетки условиях в бессывороточной культуральной среде, содержащей ростовую добавку, два фактора роста и один фактор выживания, где ростовая добавка представляет собой 20-40 мкМ 1-тиоглицерина, факторы роста представляют собой тромбоцитарный фактор роста (PDGF) в концентрации 10-100 нг/мл и основной фактор роста фибробластов (bFGF) в концентрации 10-20 нг/мл, а фактор выживания представляет собой инсулиноподобный фактор роста (IGF) в концентрации 10-40 нг/мл, с получением клетки по п.1; и
  - обеспечение дифференцировки полученной клетки по п.1 в линию олигодендроцитарных клеток.



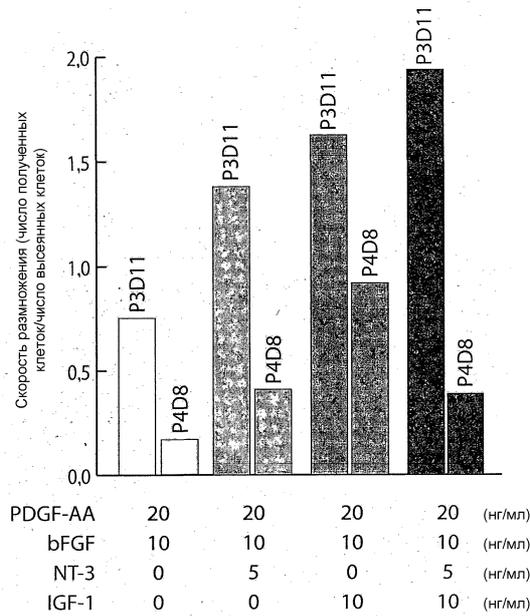
Фиг. 1

Тип клеток	Положительные маркеры	Отрицательные маркеры
HFSC-клетка	CD133, Sox2, нестин, CD9, NG2, CD140 $\alpha$ (PDGF-R1), A2B5 (слабый), O4 (слабый), Olig2, PSA-NCAM	CD44, GFAP, нейрофиламент
Нервная стволовая клетка	CD133, нестин, Sox2, интегрин- $\beta$ 1/CD29, SSEA-1/LEX/CD15, CXCR4/CD184	CD34, CD45, CD44
Радиальная глия	GLAST, виментин, RC2, BLBP	
Нейрон-рестриктированный предшественник (NRP)	PSA-NCAM, CD56	A2B5
Глия-рестриктированный предшественник (GRP)	A2B5	PSA-NCAM
Предшественник нейронов	PSA-NCAM, бета-III-тубулин, нестин	A2B5
Незрелый нейрон	бета-III-тубулин, даблкортин	
Зрелый нейрон	MAP2, нейрофиламент, Тау	
Предшественник астроцитов	S100 $\beta$ , CD44	GFAP
Астроцит 1 типа	GFAP	A2B5
Астроцит 2 типа	GFAP, A2B5	
Предшественник олигодендроцитов и астроцитов 2 типа (O2A)	CD140 $\alpha$ (PDGF-R1), Olig2, NG2, A2B5, GD3, O4 (слабый)	CD133
Проолигодендробласт	NG2, A2B5, GD3 (слабый), O4, Sox10	CD133, Sox2, GalC, CNPase, MBP, PLP
Незрелый олигодендроцит	A2B5, O4 (сильный), GalC, CNPase (3'-фосфодиэстераза 2',3'-циклических нуклеотидов)	MBP
Зрелый олигодендроцит	MBP, CNPase, PLP	NG2, GalC

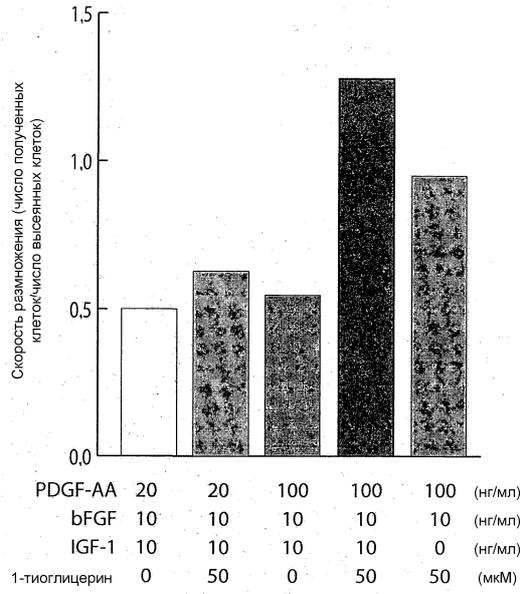
Фиг. 2



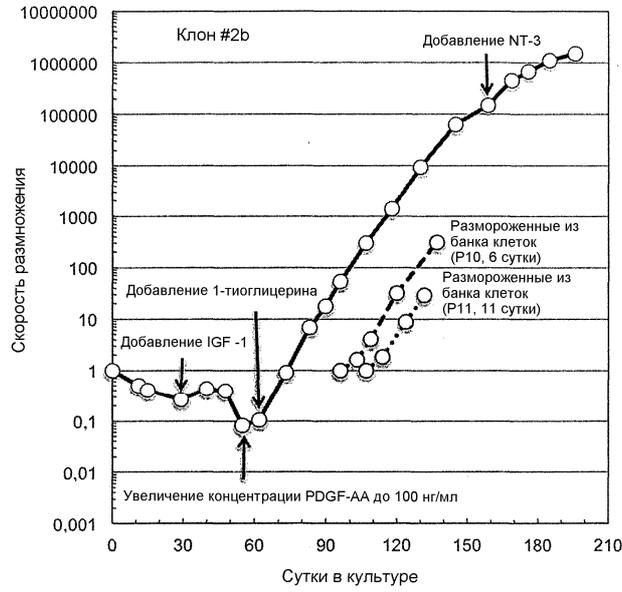
Фиг. 3



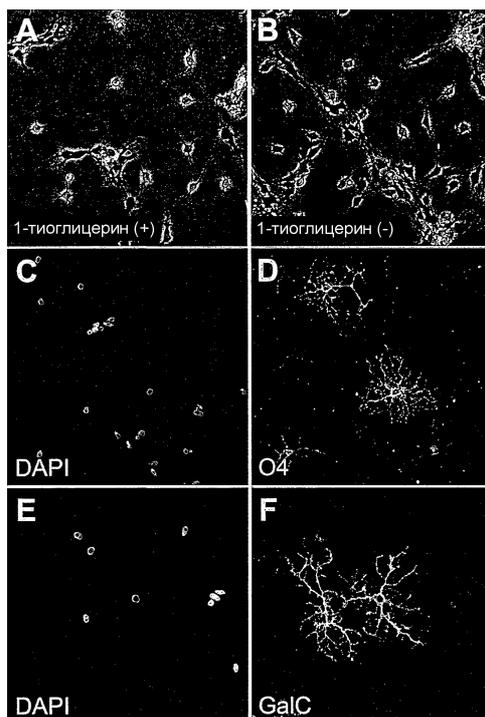
Фиг. 4



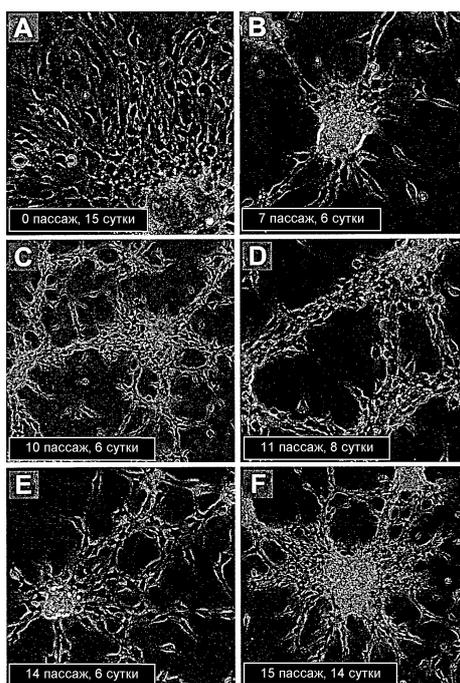
Фиг. 5



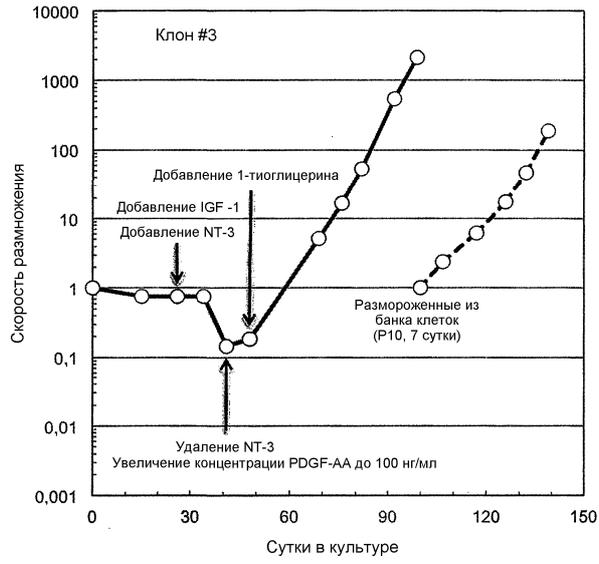
Фиг. 6



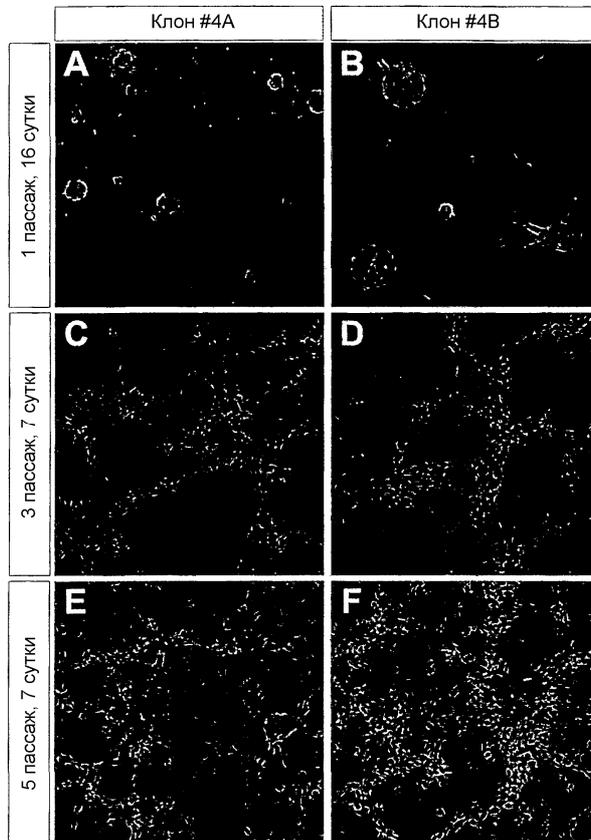
Фиг. 7



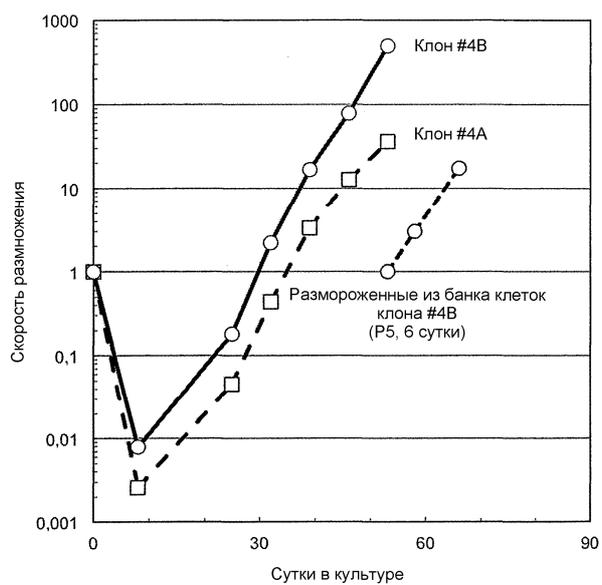
Фиг. 8



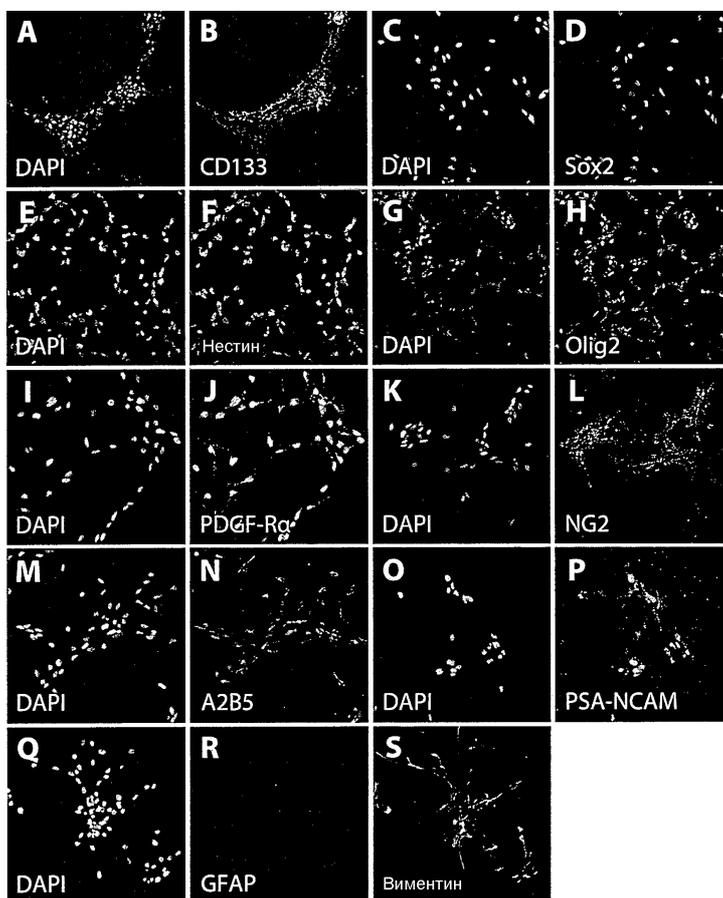
Фиг. 9



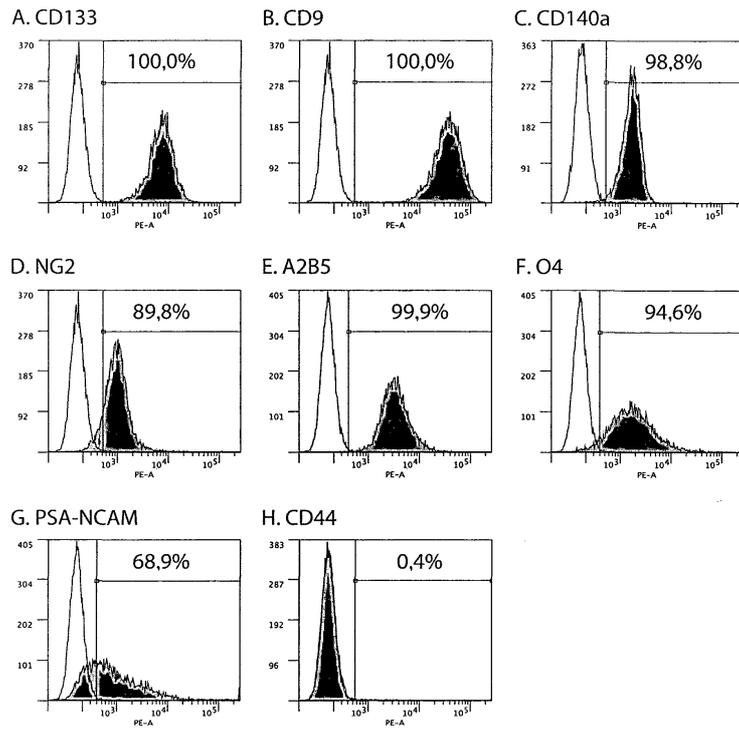
Фиг. 10



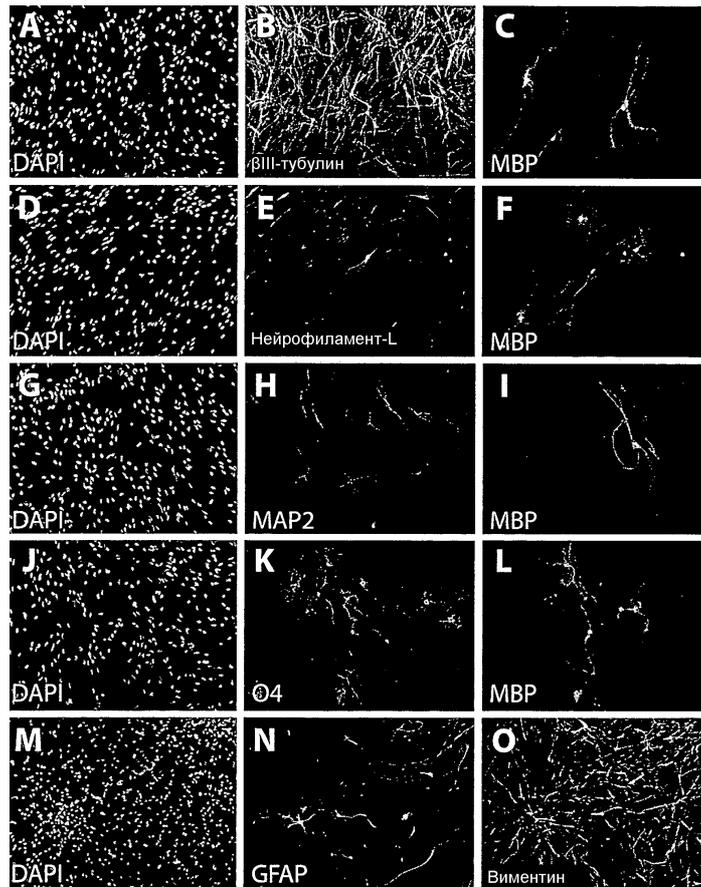
Фиг. 11



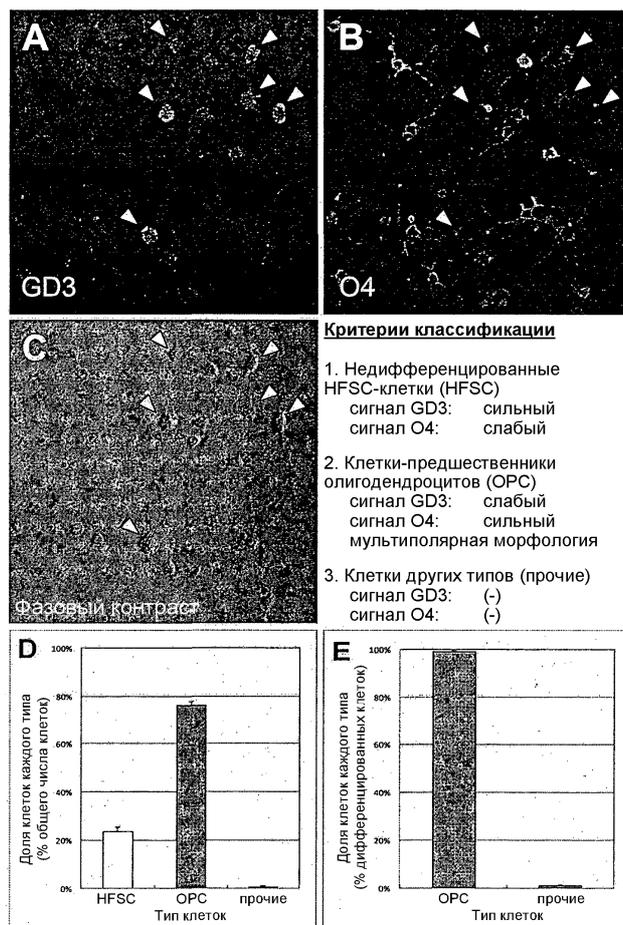
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15

