

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035214**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.18

(21) Номер заявки
201790357

(22) Дата подачи заявки
2015.08.28

(51) Int. Cl. **C12N 5/071** (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ЗРЕЛОЙ ПЕЧЕНИ

(31) РСТ/EP2014/068317; 15157664.2

(32) 2014.08.28; 2015.03.04

(33) EP

(43) 2017.08.31

(86) РСТ/EP2015/069786

(87) WO 2016/030525 2016.03.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРОМЕТЕРА БАЙОСАЙЕНСИЗ
С.А./Н.В. (BE)

(72) Изобретатель:
Сокаль Этьенн, Сникерс Сара, Баран
Тюба, Желленк Крис, Фальчола Лука
(BE)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В. (RU)

(56) LEE M. D. Seoung Woo et al. The use of single-pass albumin dialysis to correct severe hyperbilirubinemia in acute hepatitis a : a case report. The Korea Journal of Nephrology 2010:29:260-264, реферат, с. 262-263

EP-B1-1969118

US-A1-20070065520

WO-A1-2007071339

ISABELLE SCHEERS ET AL.: "Adult-Derived Human Liver Progenitor Cells in Long-Term Culture Maintain Appropriate Gatekeeper Mechanisms Against Transformation" CELL TRANSPLANTATION, vol. 21, no. 10, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 2241-2255, XP055153009, ISSN: 0963-6897, DOI: 10.3727/096368912X639026 page 2242, paragraph 3 - paragraph 4, page 2245, last paragraph - page 224, paragraph 3 page 2252; figure 7C page 2249, paragraph 2 - paragraph 3

Seoung Woo Lee et al.: "The use of single-pass albumin dialysis to correct severe hyperbilirubinemia in acute Hepatitis A: a case Report", The Korean Journal of Nephrology, vol. 29 1 January 2010 (2010-01-01), pages 260-264, XP055153061, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.ksn.or.kr/upload/thesis/2902260.pdf> [retrieved on 2014-11-18] the whole document

KAVITHA SIVASUBRAMANIYAN ET AL.: "Prospective Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow Using Novel Antibodies Directed Against Sushi Domain Containing 2", STEM CELLS AND DEVELOPMENT, vol. 22, no. 13, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 1944-1954, XP055152723, ISSN: 1547-3287, DOI: 10.1089/scd.2012.0584 the whole document

(57) Новые клетки-предшественники зрелой печени (названные клетки H2Stem) охарактеризованы на основе ряда биологических активностей и маркеров. Способы получения клеток H2Stem обеспечивают получение таких клеток в форме прикрепленных клеток и трехмерных кластеров клеток в суспензии, которые могут дифференцироваться в клетки, имеющие сильные печеночно-специфические активности и/или которые могут быть использованы для лечения заболеваний печени или для оценки эффективности, метаболизма и/или токсичности соединения.

B1

035214

035214 B1

Область техники

Изобретение относится к клеткам-предшественникам зрелой печени, которые получают с использованием первичных клеток печени, и к их применению для лечения болезней печени или для скрининга соединений, представляющих интерес для медицины.

Область изобретения

Печень представляет собой ключевой орган в регуляции гомеостаза организма и является сайтом многих жизненно важных метаболических путей. Нарушение функции лишь одного белка в сложном метаболическом пути может быть очень вредным. Наличие большого числа важных ферментов печени значительно увеличивает риск появления различных заболеваний печени. В целом существуют 200 различных врожденных нарушений метаболизма в печени, поражающих 1 ребенка среди 2500 живорожденных детей. Современные способы лечения и долговременная терапия не являются достаточно эффективными. Ортоотопическая трансплантация печени (OLT) является высокоинвазивной, необратимой, ограниченной недостатком донорских трансплантатов и требующей современной хирургии. Трансплантация клеток печени (LCT) может давать эффективность лишь от краткосрочной до среднесрочной из-за качества препаратов гепатоцитов. Дальнейшие улучшения устойчивости в отношении криоконсервации, постоянного приживания и высокой функциональности инфундированных клеток были бы важным прорывом (Sokal EM, 2011; Russo FP and Parola M, 2012; Allameh A and Kazemnejad S, 2012; Parveen N et al., 2011).

Это улучшение могло быть обеспечено применением стволовых клеток или клеток-предшественников, в частности, клеток-предшественников печени, которые были идентифицированы в литературе с использованием тканей печени из разных организмов, а также в фетальных или взрослых тканях печени (Schmelzer E et al., 2007; Sahin MB et al., 2008; Azuma H et al., 2003; Herrera MB et al., 2006; Najimi M et al., 2007; Darwiche H and Petersen BE, 2010; Shiojiri N and Nitou M, 2012; Tanaka M and Miyajima A, 2012). После воздействия гепатогенных стимулов *in vitro* и/или после введения *in vivo* такие клетки могут давать клетки с морфологическими и функциональными характеристиками, обычно ассоциированными с печеночной дифференциацией, такие как ферментативные активности фазы 1/11.

Данные клетки-предшественники печени или гепатоцитоподобные клетки, которые генерируются из них, можно использовать в трансплантации клеток, а также для тестирования лекарственных средств при разработке новых лекарственных средств, так как они представляют собой замену первичных человеческих гепатоцитов в метаболизме лекарственного средства и фармакологическом или токсикологическом скрининге *in vitro* (Dan YY, 2012; Hook LA, 2012). Однако в настоящее время невозможно определить, какие из клеток-предшественников печени, идентифицированных до настоящего времени, являются наилучшими для терапии данного заболевания или применения. Это главным образом обусловлено большим разнообразием способов, используемых для характеристики клеток и их способности к дифференциации, разнообразием моделей трансплантации и несогласующимися способами для определения эффекта трансплантации клеток *in vivo*.

Сфероиды гепатоцитов или органоиды печени, которые представляют собой сферические, многоклеточные агрегаты гепатоцитов, более чем 50 мкм в диаметре, могут обеспечить полезную трехмерную конструкцию ткани для трансплантации клеток и получения биосинтетической печени. Для образования сфероидов из гепатоцитов млекопитающего использовали несколько способов, таких как культивирование гепатоцитов на не допускающих прикрепления пластмассовых поверхностях для самосборки и ротационное культивирование посредством вращающихся колб (Lu Y et al., 2012; Saito R et al., 2011; Soto-Gutierrez A et al., 2010; Mitaka T and Ooe H, 2010; Tostoes RM et al., 2012). Данные структуры можно получать путем обеспечения адекватной подложки для трехмерного роста клеток, в частности, посредством имитирования их взаимодействий с микроокружением печени и особенно с внеклеточным матриксом (ECM).

Имеется обстоятельное доказательство из исследований *in vivo* того, что белки матрикса воздействуют на активацию, размножение, миграцию и дифференциацию клеток-предшественников зрелой печени, но информация о роли, которую играют специфические белки ECM в активностях *in vivo* и *in vitro*, все еще является ограниченной (Zhu C et al., 2013). Были опубликованы некоторые данные по экспрессии ECM-белков в клетках-предшественниках печени (Najimi M et al., 2007; Miyazaki M et al., 2007) или по их иммунологическому профилю (Busser H et al., 2015; Najar M et al., 2012; Najar M et al., 2013; Raicevic G et al., 2015) в мезенхимальных стволовых клетках и, в частности, в клетках-предшественниках печени.

Однако отсутствуют данные о том, как могут быть получены в культуре клеток клетки-предшественники печени или другие плохо дифференцированные клетки печеночного происхождения, которые демонстрируют специфическую комбинацию печеночных маркеров, мезенхимальных маркеров и специфичных для печени метаболических активностей, и которые образуют трехмерные кластеры клеток, без применения неадекватных и/или сложных технических решений, вовлекающих эмбриональные или плюрипотентные стволовые клетки, методики генной инженерии или химические реактивы. Кроме того, промышленное изготовление клеток-предшественников печени для клинического применения требует идентификации дополнительных, надежных критериев, которые позволят оценивать их качество на протяжении всего процесса их получения, приготовления в виде препарата и/или отбора пациента, и за-

тем их эффективного фармацевтического приготовления и применения.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение основано на результатах исследований о том, что специфические условия культуры клеток обеспечивают получение новых клеток-предшественников зрелой печени со специфическим профилем экспрессии и улучшенными биологическими характеристиками, которые можно использовать для получения либо фармацевтических композиций на основе клеток, которые можно вводить для лечения заболеваний печени, либо метаболически и гепатоактивных клеток, которые можно использовать для характеристики эффективности, метаболизма и/или токсичности соединения.

Такие клетки, названные клетки H2Stem, представляют собой популяцию клеток, которая имеет морфологические и функциональные характеристики, которые отличаются от характеристик, идентифицированных у ранее описанных клеток-предшественников зрелой печени, которые выделены или получены иным образом у доноров-людей, в частности, в том, что касается высокого уровня экспрессии белков, обеспечивающих печеночно-специфические метаболические активности (например, активность CYP3A4), в комбинации с по меньшей мере одним мезенхимальным (например, выбранным из виментина, CD90, CD73, CD29, CD44, альфа-актина гладких мышц) и по меньшей мере одним печеночным маркером (например, выбранным из альбумина, HNF-3b, HNF-4). Кроме того, в некоторых воплощениях дополнительные внутриклеточные маркеры могут предоставлять релевантные критерии для характеристики клеток H2Stem, такие как значимое присутствие клеток, экспрессирующих цитокератин 19.

В некоторых других воплощениях один или более чем один маркер поверхности может давать релевантные критерии для характеристики клеток-предшественников печени (в частности, клеток H2Stem, но также и других клеток, идентифицированных в литературе, таких как клетки ADHLS; см. Najimi M et al., 2007, Khuu DN et al., 2011; Scheers I et al., 2012) во время их изготовления, которые обеспечивают получение фармацевтических препаратов таких клеток с улучшенной жизнеспособностью, пролиферацией, хранением и/или функциональными характеристиками. Этот один или более чем один маркер поверхности клетки, когда его определение комбинируется с определением маркеров, которые характеризуют такие клетки, может помогать, направляя улучшения в изготовлении, приготовлении в виде препарата и/или медицинских условиях для конкретного фармацевтического препарата и применений.

Клетки H2Stem, которые получают или которые можно получать способами по изобретению, определяют как популяцию клеток, являющихся позитивными в отношении по меньшей мере одного мезенхимального маркера (возможно выбранного из ASMA, виментина, CD90, CD73, CD44 и CD29), являющихся позитивными в отношении по меньшей мере одного печеночного маркера (возможно выбранного из HNF-4, HNF-3B и альбумина), и являются позитивными в отношении по меньшей мере одной специфичной для печени метаболической активности (возможно выбранной из секреции мочевины, конъюгирования билирубина и активности CYP3A4). Кроме того, клетки H2Stem могут дополнительно иметь одно или более чем одно из следующих дополнительных свойств: содержание по меньшей мере 20%, от 20 до 90% или от 20 до 40% цитокератин-19-позитивных клеток (при измерении посредством проточной цитометрии), позитивность в отношении маркера белка, содержащего домен 2 Sushi, наличие кубовидной мезо-эпителиальной морфологии (то есть морфологии, аналогичной морфологии эпителиальных клеток, происходящих из мезодермы), позитивность в отношении по меньшей мере дополнительного маркера (выбранного из CD49b, CD51 и маркеров, перечисленных в табл. 2 или табл. 4) и/или способность образовывать трехмерные кластеры клеток, которые демонстрируют печеночно-специфические метаболические активности.

Главное воплощение изобретения включает клетку-предшественника зрелой печени, которая определена как позитивная в отношении комбинации биологических активностей и в отношении маркеров, которые можно идентифицировать на ее поверхности, внутриклеточных и/или секретируемых, включая следующие:

(а) по меньшей мере один печеночный маркер, выбранный из альбумина, HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 и CYP3A4;

(б) по меньшей мере один мезенхимальный маркер, выбранный из виментина, CD90, CD73, CD44 и CD29;

(в) по меньшей мере одна печеночно-специфическая активность, выбранная из секреции мочевины, конъюгирования билирубина, секреции альфа-1-антитрипсина и активности CYP3A4;

(г) белок 2, содержащий домен Sushi (SUSD2);

(д) по меньшей мере один дополнительный маркер, выбранный из CD49b и CD51; и

(е) цитокератин-19 (СК-19).

В некоторых воплощениях клетка-предшественник зрелой печени может дополнительно отличаться рядом негативных маркеров, в частности клетки H2Stem могут быть определены как негативные в отношении одного или более чем одного из CD140b, CD45, CD117, CD31, CD133, CD271 и CD326. Другими негативными маркерами-кандидатами являются маркеры, перечисленные в табл. 3 и табл. 5. В дополнительных воплощениях клетки H2Stem также могут быть определены как позитивные в отношении одной или более чем одной из следующих активностей и маркеров: цитокератин-18 (СК-18); альфа-актин гладких мышц (ASMA); один или более чем один секретируемый белок, связанный со свертыванием крови

(такой как альфа-фибриноген, бета-фибриноген, гамма-фибриноген, Фактор V, Фактор VII, Фактор VIII, Фактор IX и Фактор XIII); одна или более чем одна дополнительная активность, специфичная в отношении печени (такая как сульфотрансферазная активность, триптофан-2,3-диоксигеназная активность, карбоксилазная активность печени, метаболизм аммония и накопление гликогена).

Биологические активности, маркеры и морфологические/функциональные характеристики, перечисленные выше, могут быть представлены в клетках H2Stem в разнообразных комбинациях. В некоторых воплощениях клетки H2Stem определены как:

(а) позитивные в отношении альбумина, виментина, CD90, CD73, секреции мочевины, конъюгирования билирубина, секреции альфа-1-антитрипсина, активности CYP3A4, белка 2, содержащего домен Sushi, цитокератина-19 и активности карбоксилазы печени; и также

(б) негативные в отношении CD140b и CD271.

Для клеток H2Stem из приведенных выше воплощений также могут быть определены дополнительные критерии в любой функциональной и технической комбинации, например, посредством оценки позитивности в отношении:

по меньшей мере одного дополнительного печеночного маркера, выбранного из HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 и CYP3A4;

по меньшей мере одного дополнительного мезенхимального маркера, выбранного из CD44 и CD29;

по меньшей мере одной дополнительной печеночно-специфической активности, выбранной из сульфотрансферазной активности, триптофан-2,3-диоксигеназной активности, метаболизма аммиака и хранения гликогена;

по меньшей мере одного из цитокератина-18 (CK-18) и альфа-актина гладких мышц (ASMA);

по меньшей мере одного из ATP2B4, ITGA3, TFRC, SLC3A2, CD59, ITGB5, CD151, ICAM1, ANPEP, CD46 и CD81;

по меньшей мере одного из HP, CP, RBP4, APOB, LBP, ORM1, CD24, CPM и APOC1; и/или

по меньшей мере одного секретируемого белка, связанного со свертыванием крови, выбранного из альфа-фибриногена, бета-фибриногена, гамма-фибриногена, Фактора V, Фактора VII, Фактора VIII, Фактора IX, Фактора XI и Фактора XIII.

В некоторых из приведенных выше воплощений клетки H2Stem также могут быть определены как позитивные в отношении одной или более чем одной ферментативной активности, которые перечислены в табл. 6 и табл. 7. В некоторых из приведенных выше воплощений клетки H2Stem могут быть определены как негативные в отношении по меньшей мере одного дополнительного маркера, выбранного из CD45, CD117, CD31, CD133, CD271 и CD326. Клетки H2Stem также могут быть определены как негативные в отношении одного или более чем одного из следующих маркеров: ITGAM, ITGAX, IL1R2, CDH5 и NCAM1. Кроме того, клетки H2Stem также могут быть определены как негативные в отношении одного или более чем одного из следующих маркеров: MMP1, ITGA11, FMOD, KCND2, CCL11, ASPN, KCNK2 и HMCN1.

В еще одном другом воплощении клетки H2Stem демонстрируют специфическую морфологию и/или функциональные характеристики. В частности, клетки H2Stem приведенных выше воплощений могут быть прикрепленными и могут демонстрировать кубовидную мезо-эпителиальную морфологию. Кроме того, клетки H2Stem из приведенных выше воплощений дополнительно могут иметь способность к образованию трехмерных кластеров клеток в суспензии (названных клетки H3Stem). Как обобщается на фиг. 1, как клетки H2Stem, так и H3Stem могут дополнительно дифференцироваться в клетки, которые демонстрируют сильные печеночно-специфические активности, будучи прикрепленными клетками (названными клетки H2Screen) и трехмерными кластерами клеток в суспензии (названными клетки H3Screen).

В самом деле, клетки H2Stem в соответствии с любым из приведенных выше воплощений можно использовать для предоставления дополнительных, выделенных популяций клеток, в совокупности группируемых под названием потомство H2Stem, содержащее клетки H2Stem, как определено выше, которые получают их пассированием в условиях культуры клеток. В частности, потомство H2Stem возникает в результате поддержания, пролиферации и/или дифференциации клеток H2Stem в условиях культуры клеток (или после имплантации в животную модель), как требуется для желательного применения, и в частности в виде трехмерных кластеров клеток (трехмерное потомство H2Stem). Данные трехмерные структуры не только демонстрируют улучшенные печеночно-специфические метаболические активности и сохраняют комбинацию специфичных маркеров клетки, но также и предоставляют потомство H2Stem в формате, который особенно подходит для получения композиций для терапевтических применений и высокопроизводительного скрининга.

Таким образом, приведенные выше воплощения популяций клеток включают выделенное потомство H2Stem, которое включает клетки, демонстрирующие перечисленные выше биологические активности, маркеры, морфологию и/или функциональные характеристики, в значительном большинстве (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%). В предпочтительном воплощении популяция клеток H2Stem содержит по меньшей мере 60% или от 60 до 99%, или от 70 до 90% клеток, которые определены

как:

(а) позитивные в отношении альбумина, виментина, CD90, CD73, секретиции мочевины, конъюгирования билирубина, секретиции альфа-1-антитрипсина, активности CYP3A4, белка 2, содержащего домен Sushi, цитокератина-19, CD49b, CD51 и активности карбоксилазы печени; и

(б) негативные в отношении CD140b и CD271.

Кроме того, потомство H2Stem может быть представлено в виде прикрепленных клеток или образующих трехмерные кластеры клеток в суспензии, которые пассируются в культуре в виде прикрепленных клеток или в виде трехмерных кластеров клеток не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4 или не более чем 5 раз. Такое потомство H2Stem также предпочтительно демонстрирует индуцибельную CYP-зависимую активность Фазы I и поглощение таурохолата, эстрон-3-сульфата или 1-метил-4-фенилпиридиния. Кроме того, такая популяция клеток может дополнительно дифференцироваться в клетки, демонстрирующие печеночно-специфические активности, *in vitro* и *in vivo*.

Клетки H2Stem и потомство H2Stem также могут быть модифицированы посредством одного или более чем одного химического агента, среды для культуры клеток, факторов роста и/или векторов на основе нуклеиновых кислот для любого применения *in vivo* или *in vitro*, для которого требуется подходящее добавление или устранение любых свойств таких клеток.

В другом главном воплощении настоящее изобретение обеспечивает получение клеток H2Stem и потомства H2Stem посредством способа получения клеток-предшественников зрелой печени, включающего:

(а) диссоциацию зрелой печени или ее части с образованием популяции первичных клеток печени;

(б) получение препарата первичных клеток печени со стадии (а);

(в) культивирование клеток, содержащихся в препарате со стадии (б), на подложке, которая обеспечивает прикрепление и рост на ней клеток и появление популяции клеток, имеющих кубовидную мезоэпителиальную морфологию;

(г) пассирование клеток со стадии (в) по меньшей мере один раз; и

(д) выделение популяции клеток, полученных после пассирования (г), которые являются позитивными в отношении по меньшей мере одного печеночного маркера и по меньшей мере одного мезенхимального маркера, имеют по меньшей мере одну метаболическую активность, специфичную для печени, и сохраняют кубовидную мезоэпителиальную морфологию.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения клеток-предшественников зрелой печени, включающему:

(а) диссоциацию зрелой печени или ее части с образованием популяции первичных клеток печени;

(б) получение препарата первичных клеток печени со стадии (а);

(в) культивирование клеток, содержащихся в препарате со стадии (б), на подложке, которая обеспечивает прикрепление и рост на ней клеток и появление популяции клеток, имеющих кубовидную мезоэпителиальную морфологию;

(г) пассирование клеток со стадии (в) по меньшей мере один раз; и

(д) выделение популяции клеток, полученных после пассирования на стадии (г), которые сохраняют кубовидную мезоэпителиальную морфологию, и которые являются позитивными в отношении по меньшей мере одного печеночного маркера, по меньшей мере одного мезенхимального маркера и имеют по меньшей мере одну активность, специфичную для печени, где по меньшей мере доля популяции клеток со стадии (д), которая может варьировать от по меньшей мере 20% или от 20 до 40% от всей популяции клеток стадии (д), является позитивной в отношении цитокератина-19 при определении проточной цитометрией.

Способы по настоящему изобретению относятся к выделению клеток печени, которые могут дать клетки H2Stem (и следовательно также к предоставлению потомства H2Stem) после поддержания при подходящих условиях культивирования клеток. Эти способы применимы, начиная со свежих первичных клеток печени человеческого происхождения и/или с криоконсервированных препаратов первичных клеток печени. В некоторых воплощениях способов данные способы также могут включать определение позитивности в отношении одного или более чем одного маркера на стадии (д) и/или на стадии (в).

Например, клетки на стадии (в) и/или популяция клеток на стадии (д) могут быть определены как позитивные в отношении по меньшей мере одного маркера или активности, выбранных из цитокератина-19, альбумина, секретиции альфа-1-антитрипсина, белка 2, содержащего домен Sushi, и CYP3A4. В предпочтительном воплощении клетки стадии (в) и/или популяция клеток стадии (д) определены как позитивные в отношении:

(1) по меньшей мере одного мезенхимального маркера, выбранного из виментина, CD90, CD73, CD44 и CD29;

(2) по меньшей мере одного печеночного маркера, выбранного из альфа-1-антитрипсина, HNF-3B, HNF-4, альбумина, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1;

(3) по меньшей мере одной печеночно-специфичной метаболической активности, выбранной из секретиции мочевины, конъюгирования билирубина, секретиции альфа-1-антитрипсина и активности CYP3A4;

(4) белка 2, содержащего домен Sushi;

(5) по меньшей мере одного из ATP2B4, ITGA3, TFRC, SLC3A2, CD59, ITGB5, CD151, ICAM1, ANPEP, CD46 и CD81;

(6) по меньшей мере одного из HP, CP, RBP4, APOB, LBP, ORM1, CD24, CPM и APOC1; и

(7) цитокератина-19 (СК-19).

Клетки со стадии (в) и/или популяция клеток со стадии (д) могут быть дополнительно определены как позитивные в отношении цитокератина-18 (СК-18) и/или альфа-актина гладких мышц (ASMA) и могут быть определены как негативные в отношении CD140b и CD271. В некоторых из приведенных выше воплощений клетки H2Stem также могут быть определены как позитивные в отношении одной или более чем одной ферментативной активности, которые перечислены в табл. 6 или 7.

В некоторых воплощениях данных способов клетки со стадии (в) и/или популяция клеток со стадии (д) определены как позитивные в отношении маркера, если по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или от 60 до 99%, или от 70 до 90% клеток в популяции определены как позитивные в отношении данного маркера. В некоторых из приведенных выше воплощений клетки со стадии (в) и/или популяция клеток со стадии (д) определены как негативные в отношении маркера, если меньше, чем 20% или меньше, чем 10% клеток в популяции определены как негативные в отношении данного маркера. В некоторых из приведенных выше воплощений популяция клеток со стадии (д) содержит прикрепленные клетки или образует трехмерные кластеры клеток в суспензии, тогда как в других приведенных выше воплощениях популяция клеток со стадии (д) демонстрирует индуцибельную СУР-зависимую активность Фазы 1 и поглощение по меньшей мере одного из таурохолата, эстрон-3-сульфата и 1-метил-4-фенилпиридиния. Клетки со стадии (в) и/или популяцию клеток со стадии (д) также можно модифицировать посредством химических агентов, среды для культуры клеток, факторов роста и/или векторов на основе нуклеиновых кислот для любого подходящего последующего применения *in vivo* или *in vitro*, также согласно сведениям в таблицах 6 и 7.

Таким образом, приведенные выше способы обеспечивают получение клеток H2Stem и потомства H2Stem из приведенных выше воплощений. В некоторых воплощениях способов клетки со стадии (в) и/или популяцию клеток со стадии (д) можно культивировать на подложке, которую можно покрывать коллагеном или другим подходящим пептидом или белком внеклеточного матрикса, можно выделять посредством определения по меньшей мере позитивности в отношении специфических комбинаций печеночных маркеров, мезенхимальных маркеров и метаболических активностей, специфичных для печени. Затем, в зависимости от желательного применения клеток H2Stem и потомства H2Stem, клетки, которые получают или могут быть получены данным способом, можно поддерживать в условиях культуры клеток, обеспечивая их пролиферацию в качестве прикрепленных клеток, суспензий клеток или посредством применения специфических условий для их поддержания в виде гепатоцитоподобных или гепатоактивных клеток. В частности, можно получать трехмерные кластеры клеток (трехмерное потомство H2Stem), которые могут особенно эффективно формироваться с использованием имеющегося в продаже контейнера, обеспечивающего слабое прикрепление (в виде планшетов или U-образных лунок), или в биореакторе, и они могут характеризоваться согласно их функциональным, размерным, морфологическим и/или антигенным свойствам. Способ по изобретению может дополнительно включать стадию (е), на которой популяцию клеток со стадии (д) поддерживают в условиях культуры клеток для их дифференциации в клетки, демонстрирующие активности, печеночно-специфичные.

Потомство H2Stem представляет собой популяцию клеток, которую можно получать способами по изобретению, и она содержит клетки, демонстрирующие перечисленные выше биологическую активность, маркеры, морфологию и/или функциональные характеристики, в значительном большинстве (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%). В предпочтительном воплощении популяция клеток H2Stem, которую можно получать способами по изобретению, содержит от 60 до 99% или от 70 до 90% клеток, демонстрирующих перечисленные выше характеристики, в связи со стадией (д).

Согласно способу по изобретению также предложено потомство H2Stem в виде прикрепленных клеток или клеток, образующих трехмерные кластеры в суспензии, которые предпочтительно также демонстрируют индуцибельную СУР-зависимую активность Фазы I и поглощение по меньшей мере одного из таурохолата, эстрон-3-сульфата и 1-метил-4-фенилпиридиния. Кроме того, такие популяции клеток могут дополнительно дифференцироваться в клетки, демонстрирующие печеночно-специфические активности. Популяцию клеток H2Stem, которую получают способами по изобретению, также можно модифицировать посредством химических агентов, среды для культуры клеток, факторов роста и/или векторов на основе нуклеиновых кислот для любого подходящего применения *in vivo* или *in vitro*.

Биологические материалы, которые получают при генерации клеток H2Stem или потомства H2Stem согласно изобретению, можно дополнительно использовать для идентификации биологических объектов, которые могут иметь специфические применения, в частности, особые медицинские применения. Данные биологические материалы включают не только клетки H2Stem и потомство H2Stem (или субпопуляцию, линии клеток и их фракцию), которые демонстрируют специфические характеристики (например,

маркеры на основе белка или нуклеиновой кислоты, биологические активности и/или морфология), но также и любой другой объект, который получают при приготовлении препаратов клеток H2Stem или потомства H2Stem из культуры первичных клеток печени. Биологические материалы по изобретению включают, например, кондиционированные среды культуры клеток (например в виде супернатанта культуры клеток) и фракции данных сред, которые могут содержать белки, метаболиты, мембранные везикулы, антигены и/или нуклеиновые кислоты, которые, совместно или без других характеристик, описывающих сами клетки (например, антиген поверхности клетки или ферментативные активности), могут быть идентифицированы и использованы в качестве маркеров для выявления клеток, представляющих медицинский интерес, или в качестве соединений, которые демонстрируют активности или распределение, представляющие медицинский интерес, в частности, в связи с заболеваниями печени. В самом деле, сравнительный анализ белковых экстрактов, которые были получены из клеток H2Stem, сделал возможным идентификацию белка 2, содержащего домен Sushi, в качестве дополнительного маркера, в отношении которого клетки H2Stem являются позитивными, и который может использоваться для характеристики клеток H2Stem и потомства H2Stem.

Клетки H2Stem, потомство H2Stem, биологические материалы, которые получают при генерации клеток H2Stem или потомства H2Stem, и композиции, содержащие такие клетки или биологические материалы (в совокупности названные "продукты H2Stem"), могут быть полезными для большого числа способов и применений либо *in vivo*, либо *in vitro*. В частности, продукт H2Stem можно использовать для лечения заболеваний (например заболеваний печени) и для установления способов и биологических анализов, для которых требуются клетки, демонстрирующие биологические характеристики (такие как метаболические или ферментативные активности, или антигенный профиль) настолько сходные, насколько это возможно, с характеристиками, наблюдаемыми для первичных гепатоцитов, в течение желательного периода времени, как только они дифференцировались либо *in vivo*, либо *in vitro*. Предпочтительные продукты H2Stem представляют собой потомство H2Stem, биологический материал, который получают при генерации потомства H2Stem, и композицию, содержащую либо потомство H2Stem, либо такой биологический материал. Более предпочтительно продукт H2Stem представляет собой потомство H2Stem или композицию, содержащую потомство H2Stem.

В частности, продукт H2Stem можно использовать для введения *in vivo* (у человека или у животных, например в животных моделях), например, в форме фармацевтической композиции, содержащей такие клетки, для лечения заболевания печени (такого как врожденное нарушение метаболизма в печени, наследственное расстройство свертывания крови, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз типа 1/2/3, недостаточность альфа-1-антитрипсина, дефект транспортеров клеток печени, порфирия, жировая инфильтрация печени или другое фиброзное заболевание печени, первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, дегенеративное заболевание печени и острая либо хроническая недостаточность печени). Клетки H2Stem также можно использовать в форме фармацевтической композиции, содержащей такие клетки, для лечения заболевания, которое связано с недостатком или инактивацией любой из ферментативных активностей, перечисленных в табл. 6 или 7. Данные фармацевтические композиции могут быть предоставлены в виде продуктов H2Stem, объединяющих клетки H2Stem (или данное потомство H2Stem) с подложкой (например, матрица, капсула, каркас или устройство) и/или раствором (например, среда культуры клеток или буфер), которые являются подходящими для желательного способа лечения, введения и/или хранения, а также в предпочтительных средствах для предоставления таких фармацевтических композиций (например, в виде набора). В таких композициях также могут быть объединены другие агенты биологического (например, антитела или фактор роста) или химического происхождения (например, лекарственные средства, консервирующие или метящие соединения), которые могут давать любой другой полезный эффект.

Способ предупреждения и/или лечения заболевания включает введение продукта H2Stem, такого как клетки H2Stem или данное потомство H2Stem, и предпочтительно в композиции, субъекту, нуждающемуся в этом. В частности, способ лечения заболевания (например, заболевания печени) у пациента, нуждающегося в этом, включает введение эффективного количества продукта H2Stem пациенту.

Введение или терапевтическое применение продукта H2Stem может включать введение или применение другого продукта (который может представлять собой, например, лекарственное средство, терапевтический агент, другой тип клетки или другой биологический материал). Продукт H2Stem может быть использован (или предназначен для применения) в способе лечения, как здесь описано, в котором пациенту также вводят такой другой продукт в качестве части данного способа. Другой продукт можно вводить в комбинации с продуктом H2Stem, например, в виде части той же самой композиции, или раздельно, одновременно или последовательно (в любом порядке). Другой продукт может иметь эффекты, которые являются сопоставимыми или даже синергетическими с эффектами (в частности, с терапевтическими эффектами) продукта H2Stem, например, потомство H2Stem или кондиционированные среды культуры клеток, полученные от потомства H2Stem.

Продукт H2Stem также можно использовать для исследований *in vitro*, в частности, для фармакологических исследований для оценки эффективности, метаболизма, стабильности и/или токсичности одного или более чем одного экзогенного компонента, такого как биологический продукт (такой как белок,

нуклеиновая кислота, липиды или сахар) или химическое соединение (органическое или неорганическое, включая соли или металлы). Данный подход также можно использовать для исследования эффектов других клеток (таких как бактерии или другие клетки, предпочтительно человеческого происхождения) на продукт H2Stem, а также для оценки инфекции и/или репликации специфичных для печени вирусов (например, вирусов гепатита), или паразитов (подобных видам Plasmodium в связи с исследованием малярии и противомаларийных лекарственных средств), которых можно позднее очищать или выявлять иным образом.

Таким образом, согласно настоящему изобретению также предложены способы оценки эффективности, метаболизма, стабильности и/или токсичности одного или более чем одного экзогенного компонента либо *in vitro*, либо *in vivo*, причем указанный способ включает:

(а) предоставление продукта H2Stem;

(б) подвергание указанного продукта H2Stem воздействию одного или более чем одного экзогенного компонента, выбранного из химических соединений, белков, нуклеиновых кислот, липидов, Сахаров, металлов, солей, вирусов, бактерий и клеток; и

(в) выявление эффектов указанного одного или более чем одного экзогенного компонента на указанный продукт H2Stem и/или выявление присутствия, локализации или модификации указанного одного или более чем одного экзогенного компонента после воздействия на указанный продукт H2Stem.

Этот общий способ может включать в некоторых воплощениях дополнительные этапы и характеристики, которые применимы к специфическим применениям и/или технологиям. Например, стадия (в), как определено выше, может включать выявление эффектов на морфологию клетки, на жизнеспособность клетки, на повышающую или понижающую регуляцию специфичных для печени или неспецифичных белков и/или на деградацию, агрегацию, активацию или ингибирование белков в продукте H2Stem. Кроме того, стадия (в), как определено выше, может включать выявление интернализации такого одного или более чем одного экзогенного компонента в продукт H2Stem или физической ассоциации с ним. Продукт H2Stem также может быть предоставлен животному на стадии (а), и затем указанному животному на стадии (б) вводят один или более чем один экзогенный компонент. Наконец, стадия (в) включает выявление эффектов указанного одного или более чем одного экзогенного компонента на указанный продукт H2Stem или указанное животное и/или выявление присутствия, локализации или модификации указанного одного или более чем одного экзогенного компонента после воздействия на указанный продукт H2Stem у животного.

Способы применения продуктов H2Stem также могут включать воздействие на популяцию клеток, композицию или биологический материал на стадии (б), одновременно или последовательно в любом порядке:

(1) одного или более чем одного экзогенного компонента, который имеет влияние на морфологию клетки, жизнеспособность клетки, повышающую или понижающую регуляцию специфичных для печени или неспецифичных белков, и/или который деградирует, агрегирует, активирует или ингибирует белки в продукте H2Stem; и

(2) одного или более чем одного экзогенного компонента, который предназначен для того, чтобы блокировать или избегать таких эффектов в продукте H2Stem.

В некоторых воплощениях данный способ предназначен для применения любого продукта H2Stem, и в частности потомства H2Stem, в качестве модели клеток печени для определения того, имеет ли при воздействии экзогенного компонента, который представляет собой патогенный агент, дополнительный экзогенный компонент, который представляет собой лекарственное средство-кандидат, специфично нацеленное на патогенный агент и/или его эффекты, терапевтические свойства, поскольку он предупреждает или блокирует любой нежелательный эффект патогенного агента (например, вирусную инфекцию, апоптоз, онкогенную трансформацию, уменьшение активностей, специфичных для печени и т.д.). В частности, экзогенный компонент (1), приведенный выше, который представляет собой патогенный агент, содержит инфекционный, канцерогенный, цитотоксический или генотоксический агент, и дополнительные экзогенные компоненты (2), приведенные выше, которые представляют собой лекарственное средство-кандидат, специфично нацеленное на патогенный агент и/или его эффекты, содержат белок, нуклеиновую кислоту, клетку, вирус или химическое соединение.

Продукт H2Stem также может быть предоставлен в наборе, например, для применений и способов использования, как описано выше, включая транспортировку продукта H2Stem в клиническое учреждение и предоставление средств для его введения пациенту. Данный набор может содержать продукт H2Stem и возможно дополнительные элементы, которые обеспечивают применение и/или выявление продукта H2Stem и его активностей, а также для применения и/или выявления любого релевантного дополнительного соединения. Данный набор может содержать один или более чем один флакон, содержащий продукт H2Stem (например, потомство H2Stem или композицию, содержащую потомство H2Stem) и один или более чем один из следующих элементов, подлежащих выбору согласно конкретному применению: устройства, расходные материалы, растворы, химические продукты, биологические продукты и/или инструкции для применения элементов указанного набора.

Другое воплощение изобретения включает клетки-предшественники зрелой печени (которые могут

быть названы ННАЛРС), которые могут быть предоставлены в виде популяции клеток, а также препараты клеток и содержащие их фармацевтические композиции, в частности, полученные посредством способа фармацевтического изготовления. Данные клетки и популяции клеток демонстрируют комбинацию биологических активностей и маркеров, которые могут быть идентифицированы на их поверхности, быть внутриклеточными и/или секретируемыми, причем указанные клетки являются:

- (а) позитивными в отношении альфа-актина гладких мышц (ASMA), альбумина (ALB) и CD140b; и
- (б) негативными в отношении цитокератина-19 (СК-19) и SUSD2. Данные клетки могут быть дополнительно позитивными также и в отношении:
 - (а) по меньшей мере одного печеночного маркера, выбранного из альбумина, HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 и CYP3A4;
 - (б) по меньшей мере одного мезенхимального маркера, выбранного из виментина, CD90, CD73, CD44 и CD29;
 - (в) по меньшей мере одной специфичной для печени активности, выбранной из секреции мочевины, конъюгирования билирубина, секреции альфа-1-антитрипсина и активности CYP3A4;
 - (г) по меньшей мере одного маркера, выбранного из ATP2B4, ITGA3, TFRC, SLC3A2, CD59, ITGB5, CD151, ICAM1, ANPEP, CD46 и CD81; и
 - (д) по меньшей мере одного маркера, выбранного из MMP1, ITGA11, FMOD, KCND2, CCL11, ASPN, KCN2 и HMCN1.

ННАЛРС также могут быть определены как позитивные в отношении одной или более чем одной ферментативной активности, перечисленной в табл. 6. В некоторых воплощениях данный тип клетки-предшественника зрелой печени может быть дополнительно охарактеризован рядом негативных маркеров, в частности в отношении одной или более чем одной группы, состоящей из ITGAM, ITGAX, IL1R2, CDH5 и NCAM1. Дополнительно ННАЛРС также могут быть негативными в отношении одной или более чем одной группы, состоящей из HP, CP, RBP4, APOB, LBP, ORM1, CD24, CPM и APOC1.

Биологические активности, маркеры и морфологические/функциональные характеристики, перечисленные выше, могут присутствовать в ННАЛРС в разных комбинациях маркеров, такие как:

- (а) позитивные в отношении а-актина гладких мышц, альбумина, виментина, CD90, CD73, CD44, CD29, CD140b и активности CYP3A4; и
- (б) негативные в отношении белка 2, содержащего домен Sushi, цитокератина-19 и CD271.

Дополнительные критерии для ННАЛРС из приведенного выше воплощения также могут быть определены в любой функциональной и технической комбинации, например, путем определения позитивности в отношении по меньшей мере одного дополнительного маркера, выбранного из ATP2B4, ITGA3, TFRC, SLC3A2, CD59, ITGB5, CD151, ICAM1, ANPEP, CD46 и CD81. В некоторых из таких воплощений ННАЛРС могут быть определены как негативные в отношении по меньшей мере одного дополнительного маркера, выбранного из группы, состоящей из ITGAM, ITGAX, IL1R2, CDH5 и NCAM1. В некоторых из таких воплощений ННАЛРС могут быть определены как негативные в отношении по меньшей мере одного из HP, CP, RBP4, APOB, LBP, ORM1, CD24, CPM и APOC1.

ННАЛРС могут быть использованы согласно описанию WO2007071339 и другой литературе по клеткам ADHLS, а также другим приведенным выше раскрытиям, относящимся к клеткам H2Stem (в показателях способов, применений, наборов, биологического материала или клеточных композиций в отношении ННАЛРС, заложенных в виде суспензий выделенных гепатоактивных клеток, а не трехмерных многоклеточных структур. ННАЛРС также могут использоваться в форме фармацевтической композиции, содержащей такие клетки, для лечения заболевания, которое относится к недостатку или инактивации любой из ферментативных активностей, перечисленных в табл. 6.

Подробное описание и примеры предоставляют дополнительные подробности о клетках, популяциях клеток, способах, клетках, которые можно получать данными способами, и о дополнительных воплощениях изобретения, которые ассоциированы с указанными способами, с продуктами H2Stem и с ННАЛРС.

Описание графических материалов

Фиг. 1. Блок-схема, на которой сравнивается способ получения и применения клеток ADHLS и клеток H2Stem. И клетки ADHLS, и клетки H2Stem можно получать, начиная с первичных клеток, выделенных из печени человека, которые можно использовать непосредственно или путем получения криоконсервированных препаратов первичных клеток печени человека для долговременного хранения, в частности из зрелой печени человека. Клетки H2Stem с улучшенными специфичными для печени характеристиками и кубовидной мезо-эпителиальной морфологией можно использовать для получения потомства H2Stem для подходящих применений *in vivo* или *in vitro* либо в условиях двухмерной (2D), либо трехмерной (3D) культуры клеток (т.е. путем поддержания клеток H2Stem и потомства H2Stem в виде прикрепленных клеток или в колбах и других контейнерах со слабыми адгезионными свойствами в отношении клеток соответственно). Трехмерное потомство H2Stem образуется кластерами клеток, которые характеризуются посредством специфичных маркеров и/или биологических активностей. Исходно клетки H2Stem можно использовать для получения, с промежуточным размножением в виде прикрепленных клеток или без него (например, на субстрате, таком как коллаген), потомства H2Stem, которое характери-

зуются как либо дифференцированные, прикрепленные гепатоцитоподобные клетки (клетки H2Screen), либо трехмерные кластеры, содержащие клетки-предшественники печени (клетки H3Stem). Каждый из этих двух типов потомства H2Stem можно дополнительно использовать для получения трехмерного потомства H2Stem, содержащего высоко метаболически активные клетки, которые определяются соответственно как клетки H3Screen-1 и клетки H3Screen-2 согласно двум альтернативным протоколам их получения. Клетки H3Screen-2 также могут быть непосредственно получены из потомства H2Stem (т.е. без стадии получения клеток H3Stem) путем культивирования потомства H2Stem в трехмерных условиях и в среде для культуры клеток, обеспечивающей специфичную для печени дифференциацию *in vitro*. В зависимости от условий культуры клеток, в которых поддерживают клетки H3Screen, данные клетки могут формировать альтернативные форматы трехмерных кластеров клеток в суспензии (клетки H3Screen-2a и клетки H3Screen-1) или в виде прикрепленных клеток (клетки H3Screen-2b и клетки H3Screen-2c). Долговременное хранение посредством криоконсервации, при необходимости, применимо и к клеткам ADHLSC, и к клеткам H2Stem (т.е., если размножение, дифференциация и/или культивирование в виде трехмерного потомства H2Stem не является немедленным, но применяется в способе позднее), а также к специфическому потомству H2Stem в данном структурном состоянии или состоянии дифференциации.

Фиг. 2. Характеристики, отличающие прикрепленные, недифференцированные клетки ADHLSC или первичные человеческие гепатоциты от прикрепленных, недифференцированных клеток H2Stem и потомства H2Stem, при культивировании на таком субстрате как коллаген. Морфологически недифференцированные клетки ADHLSC проявляются как гомогенная популяция удлинённых клеток, тогда как клетки H2Stem проявляются как гомогенная популяция кубовидных мезо-эпителиальных клеток (А). При анализе посредством иммуноцитохимии с использованием антитела против СК-19 первичные человеческие гепатоциты являются (как и клетки ADHLSC) слабо экспрессирующими СК-19, тогда как клетки H2Stem являются высоко позитивными в отношении СК-19 с ядрами, окруженными сильно позитивными в отношении СК-19 более темными нитями (Б). Клетки фотографировали при увеличении 10× (А) или 40× для (Б).

Фиг. 3. Морфология клеток H2Stem, которые получены культивированием первичных клеток печени в подходящих условиях культуры клеток. Изображения получали с использованием оборудования Cell-IQ каждый час в том же самом положении на чашке с суток 1 до -8, и выбор изображений в указанные часы был сделан для демонстрации морфологического перехода первичных клеток печени в кластер прикрепленных пролиферирующих клеток H2Stem. Клетки фотографировали при увеличении 20×.

Фиг. 4. Характеристики, отличающие прикрепленные дифференцированные клетки ADHLSC от прикрепленных недифференцированных клеток H2Screen, при культивировании на субстрате, таком как коллаген. Морфологически, после дифференциации в виде прикрепленных клеток, клетки ADHLSC проявляются в виде популяции негранулярных полигональных гомогенных клеток (А, левая панель, ранняя стадия), тогда как потомство H2Stem, содержащее клетки H2Screen, проявляется в виде гомогенной популяции гранулярных кубовидных/полигональных клеток со стромальной поддержкой, которые на более продвинутой стадии культуры и дифференциации клеток могут формировать кластеры клеток, распределенные в больших стромальных структурах (А, правая панель, поздняя стадия). На этих последних изображениях белый прямоугольник 1 показывает области клеток с морфологией, аналогичной гепатоцитам, и начинают появляться желчные каналцы; белый прямоугольник 2 показывает область с двухъядерными клетками и внеклеточным матриксом. Клетки фотографировали при увеличении 20×. Дифференцированные клетки ADHLSC и клетки H2Screen характеризовали согласно их активности CYP3A4 (Б) и секреции мочевины (В). Исходный уровень активности составляет 10^9 пмоль/клетку/4 ч и 5 пг/клетку/24 ч соответственно. Более высокие уровни секреции мочевины для клеток H2Screen по сравнению с клетками ADHLSC также измеряли путем проведения анализов в течение более коротких периодов (2-6 часов). Иммуногистохимия (Г) дополнительно подтверждает сильную экспрессию у H2Screen по сравнению с негативным контролем (без первичного антитела) внутриклеточного альбумина и СК-19, а также выводящего переносчика MRP2 (на поверхности контакта между клетками; см. стрелки).

Фиг. 5. Морфология отличных форм потомства H2Stem, состоящего из трехмерных кластеров клеток. Клетки H3Stem исходно образуют кластеры размером примерно 50-100 мкм с более плотным ядром клеток, которые позднее могут образовать большие структуры (вплоть до 1000 мкм или более), и которые содержат 100000 или более таких клеток (А). Клетки H3Screen-1, которые получают из клеток H2Screen, проявляются в виде кластера гранулярных кубовидных/полигональных гепатоцитоподобных клеток, окруженных поддерживающей стромой (Б). Клетки H3Screen-2a также состоят из трехмерных кластеров гранулярных кубовидных/полигональных гепатоцитоподобных клеток, окруженных поддерживающей стромой, которые могут быть получены путем проведения дифференциации *in vitro* с использованием планшетов, обеспечивающих слабое связывание (В), или в U-образных лунках, обеспечивающих слабое связывание, где получают более однородные трехмерные клетки H3Screen-2a (Г; клетки H3Stem также образуют аналогичные структуры при использовании такого же подхода для их культивирования). Наконец, при культивировании клеток H3Screen на субстрате, подобном коллагену, образующиеся клетки H3Screen-2b проявляются в виде прикрепленных кластеров клеток, которые являются ана-

логичными гепатоцитам, и распределены в поддерживающей строме и обширных внутриклеточных гранулярных структурах (Д; белый прямоугольник на панели 1 увеличен на панели 2). Клетки сфотографировали при увеличении 10× (панель 1 Д).

Фиг. 6. Отдельные типы потомства H2Stem могут обеспечивать трехмерное потомство H2Stem, имеющее гомогенный размер, согласно разным подходам. Блок-схема обобщает стадии получения таких препаратов клеток (А). Для посева клеток используется определенное потомство H2Stem в заданном объеме и концентрации, в каждой из колб для культуры клеток, обеспечивающих ультранизкое связывание, добавление 5 мл свежей среды для культуры клеток проводят с одинаковой частотой. Иным образом, для посева и роста данных клеток можно использовать микропланшеты для культуры клеток, обеспечивающие ультранизкое связывание, имеющие 96 U-образных/круглых лунок, для того, чтобы получать для каждой лунки шароподобную структуру. Образующееся трехмерное потомство H2Stem можно использовать в пределах той же самой лунки (путем замены среды для культуры клеток и/или добавления реактивов) или после переноса и объединения содержимого 2, 5, 10 или более лунок в подходящем контейнере. На фотографии в рамке с текстом внизу блок-схемы в (А) показан такой объединенный препарат клеток H3Screen-2a, но он является репрезентативным для другого трехмерного потомства H2Stem, которое является либо недифференцированным (клетки H3Stem), либо дифференцированным (клетки H3Screen-1) и полученным с использованием того же самого подхода. Можно сравнивать морфологию шароподобных структур, содержащих клетки H3Stem или клетки H3Screen-2a, которые получены с использованием микропланшетов для культуры клеток, обеспечивающих ультранизкое связывание, имеющих U-образные/круглые лунки (Б). Из-за дифференциации, которая дает большие клетки, шароподобные структуры, содержащие клетки H3Screen-2a, больше, чем шароподобные структуры, содержащие эквивалентное число клеток H3Stem.

Фиг. 7. Сравнение экспрессии белка и активностей ферментов печени в разных категориях потомства H2Stem и в препарате первичных человеческих гепатоцитов. Сравняется активность CYP3A4 на протяжении периода 4 ч (А). Вестерн-блотт анализ (Б) показывает, что в присутствии аналогичных количеств белка в экстрактах (что подтверждается использованием антитела против бета-актина в качестве контроля) клетки H2Stem демонстрируют малое количество белков SULT1 и UGT1A, которые в большей степени экспрессируются в клетках H3Stem (в частности, в том, что касается SULT1) и в клетках H3Screen-2a. Для SULT1 видны многочисленные полосы, так как антитело, которое использовали, представляет собой имеющийся в продаже препарат кроличьего поликлонального антитела, которое распознает общий эпитоп для разных изоформ человеческой SULT1A (сульфотрансфераза 1A1, 1A2 и 1A3) и частично перекрестно реагирует с другими членами семейства SULT человеческого происхождения (см. описание антитела H-55 против SULT1; Santa Cruz кат. № sc-32928). Данные по экспрессии белка качественно подтверждаются тестированием соответствующих ферментативных активностей (В). Способность клеток H3Stem и клеток H3Screen-2a поглощать три специфических химических субстрата (таурохолат, эстрон-3-сульфат, 1-метил-4-фенилпиридиний) посредством их соответствующих транспортеров (котранспортирующий полипептид таурохолата натрия, NTCР; полипептид, транспортирующий органические анионы, OATP; транспортер органических катионов, OCT) была определена в таких клетках в два момента времени, с кинетическим профилем поглощения, который подтверждает, что H3Screen-2b демонстрирует для таких соединений подлинно активный процесс, а не простой процесс пассивной диффузии (Г). Качественно сопоставимые данные были получены по исходной и индуцированной метаболизации лекарственных средств ферментами Фазы I (феноацетин посредством CYP1A2; бупропион посредством CYP2B6; диклофенак посредством CYP2C9; мидазолам посредством CYP3A4) после 4 часов при сравнении H3Stem и H3Screen-2a с первичными гепатоцитами.

Фиг. 8. Другие печеночно-специфические активности и маркеры характеризуют потомство H2Stem. Активность карбоксилазы печени (активность CES1) сравнивали с использованием клеток ADHLS, контрольной линии клеток HepG2, первичных гепатоцитов, клеток H2Stem и клеток H3Stem на протяжении указанного периода времени (А). Секрецию альфа-1-антитрипсина (ААТ) сравнивали с использованием ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) между клетками ADHLS и клетками H2Stem (Б).

Фиг. 9. Протеом клеток ADHLS и клеток H2Stem может быть охарактеризован анализом главных компонент (АГК), идентифицирующим группы белков, которые чрезмерно/недостаточно представлены в данных специфических популяциях клеток-предшественников зрелой печени при сравнении друг с другом. Общий протеом отдельных клеточных препаратов представлен графически (см. точки для отдельных препаратов клеток ADHLS и звездочки для отдельных препаратов клеток H2Stem). Данный подход позволяет сделать заключение о том, что разные препараты клеток ADHLS и клеток H2Stem все еще могут группироваться по типу клеток (А). Этот основанный на протеомике анализ по объединенному присутствию (или отсутствию) специфических белков (или изоформ белка), установленному таким образом, может быть дополнительно подтвержден исследованиями на основе транскриптомики, ПЦР-ОТ (полимеразная цепная реакция с обратной транскриптазой) или методик на основе антител (таких как проточная цитометрия, вестерн-блоттинг, иммуноцитохимия). Данный подход также может применяться для идентификации маркеров, различающих клетки H2Stem (или тип потомства H2Stem) от других попу-

ляций клеток *in vivo* и/или *in vitro*, а также для оценки специфичных для печени метаболических активностей или специфичных для клеток H2Stem характеристик среди разных препаратов клеток H2Stem или потомства H2Stem.

Фиг. 10. Белки поверхности клетки можно использовать в качестве биомаркеров для различения клеток H2Stem от клеток ADHLSC. Белок поверхности клетки, названный белком 2, содержащим домен Sushi (SUSD2), экспрессируется значительно сильнее при сравнении белковых экстрактов клеток H2Stem и ADHLSC посредством вестерн-блоттинга с использованием антитела против SUSD2 и (в качестве контроля для количества всех белков в образце) антитела против бета-актина (А). При проведении анализа посредством FACS (флуоресцентная сортировка клеток) для сравнения экспрессии SUSD2 с другим маркером поверхности клетки, таким как CD140b, и точкой отсечки между экспрессирующими и неэкспрессирующими клетками, установленной при интенсивности, когда 3% клеток являются позитивными в отношении изотипического негативного контроля, разница в экспрессии SUSD2 является более пониженной, особенно при сравнении позитивности в отношении CD140b, что позволяет ясно различать слабо экспрессирующие клетки H2Stem и сильно экспрессирующие клетки ADHLSC (Б). Однако подробности по распределению интенсивности сигнала для специфического флуорофора в позитивных клетках (PE-пол.) показывают, что те клетки ADHLSC, которые экспрессируют SUSD2, на самом деле экспрессируют его на гораздо меньшем уровне, чем клетки H2Stem, тогда как данные по CD140b показывают то, что данный маркер явно сильно экспрессируется только при значительном большинстве клеток ADHLSC.

Фиг. 11. В качестве биомаркеров для характеристики клеток H2Stem и HNALPC можно использовать дополнительные белки поверхности клетки. А) Подробности по распределению интенсивности сигнала проточной цитометрии (с использованием той же самой точки отсечения 3% между экспрессирующими и неэкспрессирующими клетками, которая назначена для изотипического негативного контроля) для специфического флуорофора в позитивных клетках (PE-пол.) с использованием либо антитела против человеческого CD49b, либо антитела против CD51 показаны для исходного препарата первичных человеческих клеток печени (главным образом содержащих гепатоциты, верхние панели), которые использовали для получения HNALPC (средние панели) и клеток H2Stem (нижние панели). Б) Те же самые препараты клеток аналогично анализировали посредством проточной цитометрии с использованием антитела против человеческого CD271, дополнительно осуществляя сравнение с человеческой линией клеток, названной LX-2, в качестве позитивного контроля (Castilho-Fernandes A et al., 2011).

Фиг. 12. Активность и присутствие клеток H2Stem, которые инъецируют в мышиную модель FRG. А) Клетки H2Stem или первичные человеческие гепатоциты инъецируются либо внутripеченочно, либо внутриселезеночно, и концентрация человеческого альбумина (hAlb) в сыворотке измеряется в контроле и в разные моменты времени после инъекции (типичные данные показаны для мышей M1 и M2 для каждой обработки). Б) Иммуногистохимия (ИHC) срезов печени, полученных с использованием мышей FRG, которым внутripеченочно инъецировали клетки H2Stem или первичные человеческие гепатоциты, используя ядерный антиген Ku80 в качестве маркера для клеток человеческого происхождения, которые приживаются, дифференцируются и пролиферируют в ткани печени мыши (кластеры человеческих клеток находятся в пределах области, ограниченной белыми пунктирными линиями). Клетки фотографировали при увеличении 10×. В) Иммуногистохимия срезов печени, полученных с использованием мышей FRG, которым внутripеченочно инъецировали клетки H2Stem, демонстрирующая присутствие кластеров клеток человеческого происхождения, которые приживаются, дифференцируются, пролиферируют и экспрессируют человеческую аргиназу (ARG1) в ткани печени мыши (заключенная в рамку область на левой панели увеличена на правой панели; аналогичные данные были получены для гена орнитинкарбамоилтрансферазы и альбумина). Клетки фотографировали при увеличении 1× и 4× соответственно. Г) Иммуногистохимия срезов печени, полученных с использованием мышей FRG, которым внутripеченочно инъецировали клетки H2Stem, демонстрирующая присутствие кластеров клеток человеческого происхождения (в пределах области, ограниченной белыми пунктирными линиями), которые приживаются, дифференцируются и пролиферируют, теряя экспрессию цитокератина-19 (левая панель) при одновременном поддержании сильной экспрессии альфа-1-антитрипсина (AAT, распространенный по всему кластеру клеток) и цитохрома P450 3A4 (CYP3A4, сконцентрированный, главным образом, в областях внешней границы каждого кластера клеток). Распределение выводящего транспортера MRP2 на поверхности контакта между клетками (см. Фиг. 4Г) также подтверждали с использованием данной животной модели в пределах тех же самых кластеров человеческих клеток. Клетки фотографировали при увеличении 10×.

Подробное описание изобретения

Главное воплощение изобретения включает клетки H2Stem и потомство H2Stem, отличающиеся новыми комбинациями биологических активностей и маркеров, которые могут быть идентифицированы на их поверхности, внутриклеточных и/или секретируемых в среду культуры клеток. Данные характеристики, наряду с морфологическими и функциональными характеристиками, были определены в ассоциации со способами получения клеток H2Stem и потомства H2Stem в условиях культуры клеток, определяя позитивные (или негативные) критерии, характеризующие такие клетки, в частности, в отношении способа,

включающего:

- (а) диссоциацию зрелой печени или ее части с образованием популяции первичных клеток печени;
- (б) получение препаратов первичных клеток печени со стадии (а);
- (в) культивирование клеток, содержащихся в препаратах со стадии (б), на подложке, которая обеспечивает прикрепление и рост на ней клеток и появление популяции клеток, имеющих кубовидную мезо-эпителиальную морфологию;
- (г) пассирование клеток со стадии (в) по меньшей мере один раз; и
- (д) выделение популяции клеток, которая получена после пассирования на стадии (г), которые являются позитивными в отношении по меньшей мере одного печеночного маркера и одного мезенхимального маркера, и в отношении по меньшей мере метаболической активности, специфичной для печени, и сохраняют кубовидную мезо-эпителиальную морфологию.

В том, что касается стадии (а) данного способа, стадия диссоциации включает получение зрелой печени или ее части, которая содержит, наряду с полностью дифференцированными гепатоцитами, некоторое количество первичных клеток, которые могут быть использованы для получения клеток H2Stem. Первичные клетки печени предпочтительно выделяют из тканей печени человека, которые могут быть получены из зрелой печени.

Термин "печень" относится к органу печень. Термин "часть печени" обычно относится к образцу ткани, происходящему из любой части органа печень, без какого-либо ограничения в отношении количества указанной части или области органа печень, из которой она происходит. Предпочтительно все типы клеток, присутствующих в органе печень, также могут быть представлены в указанной части печени. Количество части печени, по меньшей мере частично, может следовать из практических соображений относительно необходимости получения достаточного числа первичных клеток печени для разумного воплощения способа по изобретению на практике. Следовательно, часть печени может представлять собой процентную долю органа печень (например, по меньшей мере 1%, 10%, 20%, 50%, 70%, 90% или более, обычно мас./мас.). В других неограничивающих примерах часть печени может быть определена по массе (например, по меньшей мере 1 г, 10 г, 100 г, 250 г, 500 г или более). Например, часть печени может представлять собой долю печени, например, правую долю или левую долю, или любой сегмент или образец ткани, содержащий достаточное число клеток, которое отсекают во время операции по рассечению печени или в биопсии печени.

Термин "зрелая печень" относится к печени субъектов после рождения, т.е. через любое время после рождения, предпочтительно своевременного, и может относиться, например, к по меньшей мере 1-суточному, 1-недельному, 1-месячному или более чем 1-месячному возрасту после рождения, или по меньшей мере к возрасту 1, 5, 10 лет или более. Следовательно, "взрослая" печень или зрелая печень может находиться у субъектов-людей, которые иным образом были бы описаны традиционными терминами "младенец", "ребенок", "подросток" или "взрослый". Печень или ее часть получают от "субъекта" или "донора", взаимозаменяемо относящихся к позвоночному животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку. В другом воплощении "взрослая" печень или ее часть может происходить от субъекта-животного, не являющегося человеком, предпочтительно от млекопитающего субъекта, не являющегося человеком (например, грызуна или свиньи).

Донор может быть живым или мертвым при определении по клинически принятым критериям, таким как критерии "сердце-легкое" (включающие необратимую остановку функций кровообращения и дыхания), или критерии "смерти мозга" (включающие необратимую остановку всех функций всего мозга, включая ствол мозга). Отбор может включать известные процедуры, такие как биопсия, резекция или отсечение. Отбор ткани печени у живого донора-человека может требовать совместимости с поддержанием дальнейшей жизни донора. Печень или ее часть можно получать у донора, особенно донора-человека, у которого поддерживается кровообращение, например, бьется сердце и поддерживаются дыхательные функции, например, дышат легкие или осуществляется искусственная вентиляция. У живого донора-человека обычно может быть удалена только часть печени (например, посредством биопсии или резекции), так что у донора поддерживается адекватный уровень нормальных функций печени, чего требуют правовые и этические нормы.

В соответствии с этическими и правовыми нормами может быть необходимым или может не быть необходимым, чтобы у донора умер мозг (например, удаление всей печени или ее части, которое было бы несовместимым с дальнейшим выживанием донора-человека, может быть разрешено у людей с мертвым мозгом). Отбор печени или ее части у таких доноров имеет преимущество, так как данная ткань не страдает от значительной аноксии (недостаток оксигенации), которая обычно возникает в результате ишемии (прекращение кровотока). Во время отбора ткани возможно прекратилось кровообращение и/или дыхательные функции при отсутствии искусственной вентиляции. В то время как печень или ее часть от этих доноров могла пострадать по меньшей мере от некоторой степени аноксии, печень от трупных доноров можно использовать для получения клеток H2Stem в условиях культуры клеток, например, в пределах примерно 1 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч или более после остановки кровообращения у донора.

Ткани (из образцов печени, полученных хирургической резекцией, или из биопсий печени), которые отобраны, как описано выше, можно охлаждать до примерно комнатной температуры или до темпе-

ратуры ниже, чем комнатная температура, но обычно избегают замораживания ткани или ее частей, особенно когда такое замораживание привело бы к зарождению кристаллов или росту кристаллов льда. Например, ткань можно поддерживать при любой температуре от примерно 1°C или примерно 4°C и до комнатной температуры и преимущественно можно поддерживать при примерно 4°C, например, на льду. Данную ткань можно охлаждать в течение всего или части времени ишемии, т.е. в течение времени после остановки кровообращения у донора. То есть, ткань может подвергаться теплой ишемии, холодной ишемии или комбинации теплой и холодной ишемии. Отобранную ткань можно таким образом выдерживать, например, вплоть до 48 ч до обработки, предпочтительно в течение менее чем 24 ч, например, более предпочтительно в течение менее чем 12 ч (например, меньше чем 6, 3 или 1 ч). Отобранную ткань можно преимущественно, но не обязательно, выдерживать, например, полностью или по меньшей мере частично погруженной в подходящую среду и/или она может, но не обязательно, подвергаться перфузии подходящей средой перед дальнейшей обработке ткани. Специалист может выбрать подходящую среду, которая может поддерживать выживание клеток ткани на протяжении периода до обработки.

Способ по изобретению включает диссоциацию ткани зрелой печени, как описано выше, с образованием популяции первичных клеток. Термин "диссоциация" в том виде, как он здесь используется, обычно относится к частичному или полному нарушению клеточной организации ткани или органа, т.е. к частичному или полному нарушению ассоциации между клетками и клеточными компонентами ткани или органа для получения из указанной ткани или органа суспензии клеток (или популяции клеток). Данная суспензия может содержать единичные или одиночные клетки, а также физически соединенные клетки с образованием кластеров или групп из двух или более чем двух клеток. Диссоциация предпочтительно не вызывает или вызывает настолько малое, насколько это возможно, уменьшение жизнеспособности клеток. Подходящим способом диссоциации печени или ее части с получением из нее популяции (суспензии) первичных клеток может быть любой способ, хорошо известный в данной области, включающий ферментативное расщепление, механическое разделение, фильтрование, центрифугирование и их комбинации, но не ограничивающийся ими. В частности, способ диссоциации печени или ее части может включать ферментативное расщепление ткани печени с высвобождением клеток печени и/или механическое разрушение или разделение ткани печени с высвобождением клеток печени. Маленькие, тонкие фрагменты тканей печени, которые получают биопсией печени, можно использовать непосредственно для проведения культуры клеток согласно следующей стадии (в) без ферментативного или механического разрушения.

Способы диссоциации печени или ее части, как описано выше, описаны в литературе, например, широко используемая методика перфузии с коллагеназой в два или более чем два этапа, которую по разному адаптировали и модифицировали для ее осуществления с использованием целой печени или сегментов печени. Осуществляют перфузию ткани печени буферным раствором, не содержащим двухвалентных катионов, предварительно нагретым при 37°C, содержащим агент, хелатирующий катионы (например, EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) или EGTA (этиленгликольтетрауксусная кислота)). Буферные растворы могут содержать солевые растворы (например, HEPES, среда Вильямса E) или любой другой сбалансированный солевой раствор, который также может включать соли, такие как, среди прочих, NaCl и KCl. Это приводит к разрушению десмосомных структур, которые удерживают клетки вместе. Затем осуществляют перфузию ткани буферным раствором, содержащим двухвалентный(ные) катион(ы), такой как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и ферменты, деградирующие матрикс, которые действуют, расщепляя ткань.

Первичные клетки печени обычно высвобождают мягким механическим разрушением и/или продавливанием через фильтры для механического завершения процесса диссоциации клеток. Такие фильтры могут иметь размеры сита, которые обеспечивают прохождение клеток, примерно 0,1 мм, 0,25 мм, 0,50 мм, 1 мм или более. Для постепенной диссоциации ткани и высвобождения клеток можно использовать последовательность фильтров с прогрессирующе меньшими размерами сит. Диссоциированные клетки промывают буфером, содержащим ингибитор протеазы, сыворотку и/или плазму, для инактивации коллагеназы и другие ферменты, используемые в процессе перфузии, и затем отделяют от смеси путем их осаждения низкоскоростным центрифугированием (например, при 10g и 500g). Можно осадить большинство или даже все жизнеспособные клетки, тогда как мертвые клетки и обломки клеток по существу устраняются, и затем промыть их ледяным буферным раствором для очистки суспензии клеток. Число и качество первичных клеток печени может варьировать, в зависимости от качества ткани, составов разных растворов, которые используются, и типа, и концентрации фермента. Ферментом часто является коллагеназа, но также можно использовать проназу, трипсин, гиалуронидазу, термолизин и их комбинации. Коллагеназа может состоять из плохо очищенной смеси ферментов и/или демонстрировать протеазную активность, которая может вызывать нежелательные реакции, влияющие на качество и количество жизнеспособных клеток, которых, в свою очередь, можно избегать путем выбора ферментативных препаратов достаточной чистоты и качества. Другие способы отбора первичных клеток печени могут исключать методики ферментативного расщепления и могут включать перфузию печени растворами, содержащими сахарозу, с последующим механическим разрушением.

Относительно стадии (б) способа, препарат первичных клеток печени, который получают после диссоциации ткани печени, обычно может представлять собой гетерогенную популяцию первичных клеток печени, содержащую клетки, принадлежащие к любым типам клеток, составляющим печень, включая клетки-предшественники или стволовые клетки, которые возможно присутствовали в паренхиме печени и/или в ее непаренхимной части.

Примеры типов клеток, составляющих печень, включают гепатоциты, холангиоциты, клетки Купфера, звездчатые клетки печени и эндотелиальные клетки печени, помимо стволовых клеток или клеток-предшественников, которые могут присутствовать или происходить из образца ткани печени.

Термин "гепатоцит" охватывает эпителиальные, паренхимные клетки печени, включая гепатоциты разных размеров или плоидности (например, диплоидные, тетраплоидные, октаплоидные), но не ограничиваясь ими.

Термин "первичная клетка" включает клетки, присутствующие в суспензии клеток, полученных из ткани или органа субъекта, например печени, путем диссоциации клеток, присутствующих в такой эксплантированной ткани или органе, с использованием подходящих методик.

Способы по изобретению предпочтительно могут начинаться с популяции клеток, представляющей большинство или даже все типы клеток печени, с целью получения желательных клеток-предшественников зрелой печени в условиях культуры клеток. Подходящая исходная популяция клеток для получения клеток H2Stem может содержать гепатоциты в разных пропорциях (0,1%, 1%, 10% или более от общего числа клеток) согласно способу диссоциации печени и/или любым способам фракционирования или обогащения исходного препарата в отношении гепатоцитов и/или других типов клеток на основе физических свойств (размер, морфология), жизнеспособности, условий культуры клеток или экспрессии маркера поверхности клетки путем применения любых подходящих методик.

Популяцию первичных клеток в том виде, в котором она здесь определена и получена посредством диссоциации печени (или ее части), можно немедленно использовать для закладки культур клеток в виде свежих первичных клеток печени или, предпочтительно, хранить в виде криоконсервированных препаратов первичных клеток печени с использованием обычных методик для их длительного хранения. В самом деле, применение криоконсервированных препаратов клеток, по-видимому, имеет положительное влияние на эффективность, с которой клетки H2Stem и потомство H2Stem позднее продуцируются в культуре клеток. Клетки в этих образцах могут быть заморожены в среде для культуры клеток или в растворе для консервации клеток или органов (например, Viaspan, Cryostor, Celsior), который дополнен или не дополнен другими соединениями, такими как факторы роста, сыворотка, буферные растворы, глюкоза, альбумин, этиленгликоль, сахароза, декстроза, DMSO (диметилсульфоксид) или любой другой криопротектор. Каждый криоконсервированный препарат может содержать по меньшей мере 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 или более клеток на криобирку или мешок с целью получения и выделения большего количества клеток H2Stem в условиях культуры клеток после оттаивания образца подходящим образом и, при необходимости, промывки клеток подходящим буфером или средой для культуры клеток для устарения остаточной среды для культуры клеток или раствора для консервации клеток или органов.

Относительно стадии (в) способа, препарат первичных клеток печени (в виде суспензии клеток или в виде фрагментов тканей печени, которые получают посредством биопсии печени) можно культивировать непосредственно на полностью синтетической подложке (например, на пластмассе или любом полимерном веществе) или на синтетической подложке, предварительно покрытой питающими клетками, белковыми экстрактами или любым другим веществом биологического происхождения, которое обеспечивает прикрепление и пролиферацию аналогичных первичных клеток и появление популяции клеток-предшественников зрелой печени, имеющих кубовидную мезо-эпителиальную морфологию. Предпочтительно клетки из популяции первичных клеток, которые прикрепилась к указанному субстрату, культивируют в течение по меньшей мере 7 суток, предпочтительно по меньшей мере 10 или по меньшей мере 12 суток. Более предпочтительно клетки из популяции первичных клеток культивируют в пределах 7 и 12 суток для получения популяции прикрепленных клеток, которые достаточно обогащены жизнеспособными первичными клетками, которые могут давать клетки H2Stem.

Термин "культивирование" в широком смысле относится к условиям поддержания и/или роста клеток и, в частности, клеток H2Stem и/или потомства H2Stem в культуре клеток. Элементы, такие как подложка, где культивируются клетки, и которая обеспечивает прикрепление клеток (или, при необходимости, обеспечивает рост кластеров клеток в суспензии), состав среды для культуры клеток, плотность, с которой высевают и поддерживают клетки, концентрация O_2 и CO_2 , могут быть адаптированы для культивирования клеток H2Stem и потомства H2Stem, как подробно описано ниже в подробном описании и в примерах.

Термин "клетка-предшественник печени" относится к неспециализированной и компетентной в отношении пролиферации клетке, которая продуцируется с использованием культивирования клеток, которые выделены из печени, и которые или потомство которых может давать по меньшей мере один относительно более специализированный тип клеток. Клетка-предшественник печени дает потомков, которые могут дифференцироваться в направлении одной или более чем одной линии с образованием все более и более специализированных клеток (но предпочтительно гепатоцитов или гепатоактивных клеток), где

такие потомки сами могут быть клетками-предшественниками или даже могут продуцировать терминально дифференцированные клетки печени (например, полностью специализированные клетки, в частности, клетки, демонстрирующие морфологические и функциональные характеристики, аналогичные характеристикам первичных человеческих гепатоцитов).

При условии, что ткани печени, которые используются в способах по изобретению, происходят из зрелой печени, клетки H2Stem могут быть определены как клетки-предшественники зрелой печени, имеющие кубовидную мезоэпителиальную морфологию с большой и прозрачной цитоплазмой, искривленной мембраной без выпячиваний, развивающие межклеточные контакты и соединения и демонстрирующие ингибирование роста при контакте. После появления и пролиферации в виде прикрепленной колонии или кластеров клеток (см. фиг. 3) клетки H2Stem могут быть дополнительно охарактеризованы методиками, которые обеспечивают выявление релевантных маркеров уже на данной стадии (то есть, до пассирования клеток, как указано на стадии (г)), и которые были исходно охарактеризованы на более поздней стадии, как описано ниже на стадии (д), как демонстрирующие один печеночный маркер и по меньшей мере один мезенхимальный маркер и по меньшей мере одну активность, специфичную для печени.

Среди методик для идентификации таких маркеров и оценки их в качестве позитивных или негативных предпочтительными являются иммуноцитохимия или анализ сред культуры клеток, поскольку они обеспечивают выявление маркера даже при использовании малого количества клеток H2Stem, которое доступно на данной стадии, без их разрушения (что происходило бы в случае вестерн-блоттинга или проточной цитометрии). В частности, на данной стадии можно осуществлять выявление клеток, позитивных в отношении цитокератина-19 (как показано на фиг. 2Б), или секретируемых белков печени, включая альбумин или ферменты, подобные альфа-1-антитрипсину (см. фиг. 8Б и фиг. 12В), вместе или без выявления других релевантных маркеров, как описано ниже, включая белок поверхности клетки (такой как SUSD2, CD90, CD73, CD29, CD44 и/или печеночно-специфические транспортеры), внутриклеточные белки (такие как виментин или ASMA) и ферменты печени и связанные с ними активности (такие как карбоксилаза печени, тирозинтрансферазы, триптофан-2,3-диоксигеназа, секреция мочевины, CYP3A4 или любые другие активности цитохрома P450 фазы I). Дополнительными позитивными маркерами являются маркеры, идентифицированные в примере 3 (посредством FACS (флуоресцентная сортировка клеток) и/или такими технологиями как протеомика или транскриптомика) и/или в Примере 4 (посредством ELISA, иммуногистохимии или других методик на основе антител). В частности один или более чем один из белков группы в списке табл. 2 можно использовать, помимо CD49b и CD51, в качестве дополнительных позитивных маркеров поверхности.

Клетки H2Stem возникают из первичной популяции клеток печени, которые высевают на субстрат, обеспечивающий прикрепление клеток в среде *in vitro*, способной стимулировать выживание и/или рост таких клеток. Данная среда может предотвращать нежелательный обмен вещества между указанной средой (т.е. контейнером с культурой клеток) и окружением (например, путем избегания загрязнения лабораторного окружения), тогда как она может обеспечивать непрерывную или периодическую замену других полезных компонентов между сосудами для культивирования (например, путем случайющейся время от времени замены части или всей культуральной среды, непрерывной замены газов).

Сосуды для культивирования могут представлять собой колбы для культуры клеток, бутылки, луночные планшеты, многоярусные стеллажи для клеток (multi-tray cell stacks), биореакторы и чашки разных форматов, но имеющие одну или более чем одну поверхность субстрата, совместимого с прикреплением клеток, так что посеянные клетки могут контактировать с данным субстратом для поддержания культур прикрепленных клеток. В общем, субстрат, который обеспечивает прикрепление к нему клеток, может быть любым в значительной степени гидрофильным субстратом, представляющим собой стекло или синтетическое полимерное вещество (такое как поликарбонаты, полистиролы, полиортоэфиры, полифосфазены, полифосфаты, полиэфиры, нейлоны или их смеси), которое обычно формуют или обрабатывают для того, чтобы предоставить поверхности гидрофильного субстрата и, посредством этого, увеличить вероятность эффективного прикрепления клеток (как показано в Примерах посредством применения имеющихся в продаже веществ CellBind). Обработка поверхности может принимать форму покрытия поверхности или может включать получение химических групп на поверхности полимера, которые имеют общую аффинность в отношении воды или иным образом демонстрируют достаточную полярность для обеспечения стабильной адсорбции с другой полярной группой. Данные функциональные группы приводят к гидрофильности и/или к увеличению содержания кислорода на поверхности и придают свойства, которые, как считается, усиливают рост клеток на модифицированных таким образом поверхностях субстрата. Такие химические группы могут включать такие группы, как амины, амиды, карбонилы, карбоксилаты, сложные эфиры, гидроксилы или сульфгидрилы, которые также могут быть введены обработкой их специфическими методиками на основе воздействия частоты волн.

Прикрепление клеток может быть облегчено покрытием обработанных пластмассовых поверхностей слоем подходящего матрикса. Покрытие может включать подходящие поликарбонаты (например, полиомитин или полилизин) или, предпочтительно, один или более чем один компонент внеклеточного матрикса: фибрин, ламинин, не-/волоконистые коллагены (предпочтительно коллаген I типа), гликозами-

ногликаны (например, гепарин или сульфат гепарина) или белки, такие как фибронектин, желатин, витронектин, эластин, тенасцин, аггрекан, аргин, сиалопротеин кости, белок матрикса хряща, фибриноген, фибулин, муцины, энтактин, остеопонтин, плазминоген, рестриктин, серглицин, остеонектин, версикан, тромбоспондин 1 или молекулы клеточной адгезии, включающие кадгерины, коннексины, селектины, сами по себе или в разных комбинациях. Предпочтительные примеры могут включать композиции коллагена, содержащие или не содержащие другие компоненты внеклеточного матрикса). В качестве альтернативы, с данной целью могут быть использованы синтетические пептиды, которые являются фрагментами или иным образом происходят из белков, перечисленных выше, гели, молекулярные каркасы и другие трехмерные структуры, которые образуются из синтетических и/или биологических веществ.

Суспензия первичных клеток может приводиться в контакт с поверхностью прикрепления в течение определенного периода времени (например, по меньшей мере 2, 4, 6, 12, 24 ч или более), которое является достаточным для обеспечения прикрепления популяций первичных клеток печени к субстрату прикрепления до удаления какого-либо не прикрепившегося материала из культуральной системы (например, нежизнеспособных или мертвых клеток и обломков клеток) путем отбрасывания среды из культуральной системы и возможной промывки, один раз или повторно, прикрепившихся клеток. Затем для культуральной системы предоставляют любую подходящую среду или изотоничный буфер (например, PBS (фосфатно-солевой буферный раствор)). Тем самым клетки из популяции первичных клеток печени, которые прикрепилась к поверхности, отбирают для дальнейшего культивирования, и их можно считать для того, чтобы оценить плотность посева, которую можно выражать в виде числа клеток, высеянных на см² указанной поверхности (например, от 10 до 10⁵ клеток/см²).

Препарат первичных клеток, непосредственно в момент посева или после промывки клеток, поддерживают в жидкой среде, которая поддерживает их выживание и/или рост клеток. Среду можно добавлять в систему до, одновременно или после введения в нее клеток. Среда может быть свежей (т.е. не использованной ранее для культивирования клеток) или может содержать по меньшей мере фракцию, которая была кондиционирована посредством предшествующего культивирования в ней клеток, происходящих из печени (или имеющих любое другое происхождение). В частности, среда может представлять собой любую подходящую культуральную среду для культивирования клеток-предшественников печени, как описано в литературе, и ее можно регулярно заменять (например, каждый час, 3 ч, 12 ч, 24 ч или более) свежей средой, имеющей такие же или другие характеристики (например, состав, pH или окислительный статус). Можно заменять весь объем среды или, в качестве альтернативы, можно заменять только часть среды так, что сохраняется часть среды, кондиционированной предыдущим культивированием клеток. В качестве альтернативы, среду не заменяют, пока клетки не переносят в другой культуральный сосуд, продолжая культивирование клеток таким образом, что большинство клеток, не представляющих интерес (например, гепатоцитов и других полностью дифференцированных клеток, происходящих из печени), открепляется и погибает, а свежую среду можно просто регулярно добавлять.

Прикрепившиеся первичные клетки культивируют в присутствии жидкой культуральной среды для выращивания прикрепленных клеток, которая основана на определенных химических средах с добавлением бычьей, человеческой сыворотки или сыворотки другого животного, которая, помимо предоставления питательных веществ и/или стимуляторов роста, также может стимулировать рост/прикрепление или устранение/открепление специфических типов клеток.

Для культивирования описанных здесь первичных клеток можно использовать композиции минимальных сред (доступные, например, в Американской коллекции типовых культур, ATCC; или от Invitrogen, Carlsbad, Калифорния), включающих минимальную питательную среду (MEM) Игла, среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), альфа-модифицированную минимальную питательную среду (альфа-MEM), базальную питательную среду (BME), среду Дульбекко, модифицированную по способу Исков (IMDM), среду BGJb, питательную среду F-12 (Ham), среду Либовица L-15, DMEM/F-12, минимальную питательную среду, модифицированную по Иглу (EMEM), RPMI-1640, среду 199, среду Уеймауса MB 752/1 или среду Уильямса E и их модификации и/или комбинации, но не ограничивающихся ими. Составы данных минимальных сред и критерии для адаптации концентраций сред и/или добавок в среды, необходимых для культивирования клеток, обычно известны. Предпочтительной композицией минимальной среды может быть одна из композиций, имеющихся в продаже, таких как среда Уильямса E, IMDM или DMEM, которые, как описано, поддерживают культуру клеток зрелой печени *in vitro*, и включающая смесь факторов роста для их подходящего роста, пролиферации, поддержания желательных маркеров и/или биологической активности или долговременного хранения.

Такие композиции минимальных сред содержат необходимые ингредиенты для развития клеток млекопитающих, которые известны как таковые, такие как неорганические соли (в частности соли, содержащие Na, K, Mg, Ca, Cl, P и возможно Cu, Fe, Se и Zn), физиологические буферы (например HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота), бикарбонат), нуклеотиды, нуклеозиды и/или основания нуклеиновых кислот, рибоза, дезоксирибоза, аминокислоты, витамины, антиоксиданты (например, глутатион) и источники углерода (например, глюкоза, пируват). Дополнительные добавки можно использовать для снабжения клеток необходимыми следовыми элементами и веществами для оптимального роста и размножения. Такие добавки включают инсулин, трансферрин, соли селена и их

комбинации. Данные компоненты могут быть включены в солевой раствор, такой как сбалансированный солевой раствор Хэнка (HBSS), солевой раствор Эрла. Могут быть добавлены дополнительные антиоксидантные добавки, например, β -меркаптоэтанол. В то время как многие минимальные среды уже содержат аминокислоты, некоторые аминокислоты могут быть добавлены позднее, например, L-глутамин, который, как известно, является менее стабильным при нахождении в растворе. Среда может быть дополнительно дополнена антибиотиками и/или противогрибковыми соединениями, такими как, обычно, смеси пенициллина и стрептомицина, и/или другими соединениями. Важнее всего то, что культуральные среды для клеток могут быть дополнены плазмой или сывороткой млекопитающего, которая содержит клеточные факторы и компоненты, которые необходимы для жизнеспособности и размножения клеток, и которые, при определенных условиях, могут быть заменены синтетическими компонентами.

"Сыворотку", как ее традиционно определяют, получают из образца цельной крови, сперва обеспечивая осуществление свертывания в образце и затем отделяя образовавшийся таким образом сгусток и клеточные компоненты образца крови от жидкого компонента (сыворотки) посредством подходящей методики, обычно центрифугированием. Инертный катализатор, например, стеклянные шарики или порошок, может облегчать свертывание. Преимущественно сыворотку можно получать с использованием сосудов для отделения сыворотки (SST), которые содержат инертный для млекопитающих катализатор.

Сыворотка или плазма может быть получена коммерчески и из организма того же самого вида, что и вид, из которого получают первичные клетки печени. Человеческая сыворотка или плазма могут использоваться для культивирования первичных клеток человеческой печени. В качестве альтернативы, среда содержит бычью сыворотку или плазму, предпочтительно fetalную бычью (телячью) сыворотку или плазму, более предпочтительно fetalную бычью (телячью) сыворотку (FCS или FBS). Среда содержит от примерно 0,5% до примерно 40% (об./об.) сыворотки или плазмы, или заменителя сыворотки, предпочтительно примерно от 5 до 20% (об./об.), например, примерно от 5 до 15% (об./об.), например, примерно 10% (об./об.). Среда для культивирования человеческих клеток печени может содержать смесь человеческой плазмы или сыворотки, предпочтительно человеческую сыворотку, и бычью плазму или сыворотку, предпочтительно бычью сыворотку.

Перед хранением или применением плазму или сыворотку можно облучать (например, гамма-излучением) или подвергать тепловой инактивации. Тепловую инактивацию в данной области техники, главным образом, используют для удаления комплемента. Тепловая инактивация обычно включает инкубирование плазмы или сыворотки при 56°C в течение 30-60 мин, например 30 мин, при постоянном перемешивании, после которого плазме или сыворотке дают постепенно охлаждаться до температуры окружающей среды. Возможно, плазму или сыворотку также можно стерилизовать перед хранением или применением (например, посредством фильтрования через один или более чем один фильтр с размером пор меньше, чем 1 мкм) или обрабатывать согласно любой применимой надзорной политике для культивирования человеческих клеток для терапевтического применения.

Обычные компоненты минимальных сред (до добавления сыворотки или плазмы), например, в частности, изотонический физиологический раствор, буферы, неорганические соли, аминокислоты, источники углерода, витамины, антиоксиданты, индикаторы pH и антибиотики, не считаются в данной области факторами роста или факторами дифференциации. С другой стороны, сыворотка или плазма представляет собой сложную композицию, возможно содержащую один или более чем один из таких факторов роста.

Термин "фактор роста" в том виде, как он здесь используется, относится к биологически активному веществу, которое влияет на пролиферацию, рост, дифференциацию, выживание и/или миграцию разных типов клеток и может осуществлять изменения развития, морфологии и функциональные изменения в организме, либо в одиночку, либо при модулировании другими веществами. Фактор роста обычно может действовать путем связывания, в качестве лиганда, с рецептором (например, рецептором поверхности или внутриклеточным рецептором), присутствующим в клетках. Фактором роста здесь, в частности, может быть белковое соединение, содержащее одну или более чем одну полипептидную цепь. Термин "фактор роста" охватывает членов семейства фактора роста фибробластов (FGF), семейства морфогенного белка кости (BMP), семейства фактора роста тромбоцитов (PDGF), семейства трансформирующего фактора роста бета (TGF-бета), семейства фактора роста нейронов (NGF), семейства эпидермального фактора роста (EGF), семейства инсулиноподобного фактора роста (IGF), семейства фактора роста гепатоцитов (HGF), семейства интерлейкина-6 (IL-6) (например, онкостатин M), гематопоэтические факторы роста (HeGF), происходящий из тромбоцитов фактор роста эндотелия клеток (PD-ECGF), ангиопоэтин, семейство фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) или глюкокортикоиды. Когда способ применяется в отношении человеческих клеток печени, фактором роста, используемым в настоящем способе, может быть человеческий или рекомбинантный фактор роста. Применение человеческого и рекомбинантных факторов роста в настоящем способе является предпочтительным, так как ожидается, что такие факторы роста вызывают желательное влияние на клеточную функцию.

Среда может содержать комбинацию сыворотки или плазмы с одним или более чем одним экзогенно добавленным фактором роста, как определено выше, предпочтительно в концентрациях, в которых

конкретные факторы роста могут индуцировать влияние на клетки, культивируемые *in vitro*. Например, среда может содержать EGF и инсулин или EGF и дексаметазон, или инсулин и дексаметазон, или каждый из EGF, инсулина и дексаметазона. EGF обычно можно использовать в концентрациях примерно от 0,1 нг/мл до 1 мкг/мл и предпочтительно от 1 нг/мл до 100 нг/мл, например, примерно 25 нг/мл; инсулин обычно можно использовать в концентрациях примерно от 0,1 мкг/мл до 1 мг/мл и предпочтительно примерно от 1 мкг/мл до 100 мкг/мл, например, примерно 10 мкг/мл; дексаметазон обычно можно использовать в концентрациях примерно от 0,1 нМ до 1 мкМ, предпочтительно примерно от 1 нМ до 100 нМ, например, примерно 10 нМ.

В культуре клеток также можно использовать гормоны, например, D-альдостерон, диэтилстильбестрол (DES), дексаметазон, инсулин, эстрадиол, гидрокортизон, пролактин, прогестерон, гиротропин, тироксин, L-тиронин. Клетки печени также могут получать пользу от культивирования с трийодтиронином, α -токоферола ацетатом и глюкагоном. Для дополнения сред для культуры клеток также могут использоваться липиды и липидные носители. Такие липиды и носители могут включать циклодекстрин, холестерин, линолевую кислоту, конъюгированную с альбумином, линолевую кислоту и олеиновую кислоту, конъюгированные с альбумином, неконъюгированную линолевую кислоту, линолевою-олеиновую арахидоновую кислоту, конъюгированные с альбумином, олеиновую кислоту, неконъюгированную и конъюгированную с альбумином, среди прочих, но не ограничиваются ими. В композициях, не содержащих жирных кислот, также можно использовать альбумин.

Морфологические и фенотипические характеристики клеток H2Stem, описанных в Примерах, могут обеспечивать получение таких клеток не только, когда криоконсервированные препараты первичных клеток печени имеют низкую эффективность посева, но также путем тестирования и/или адаптации известных технологий для получения прикрепленных клеток из гетерогенных препаратов первичных клеток путем отбора и объединения разных технологий, условий и/или веществ (например, синтетического полимерного вещества, компонента(-ов) внеклеточного матрикса, среды для культуры клеток, определенного количества кислорода и/или CO₂ в инкубаторе, промывочного буфера и т.д.). В частности, культивирование в условиях гипоксии (полученных путем добавления антиоксидантного соединения в миллимолярных или меньших концентрациях), наряду с одной или более чем одной комбинацией этих других элементов, можно применять для того, чтобы получать клетки H2Stem из клеточной культуры в большем количестве и/или быстрее.

Данная стадия культивирования первичных клеток печени, как определено выше, приводит к появлению и пролиферации клеток H2Stem в культуре и может продолжаться, пока клетки H2Stem не пролиферируют в достаточной степени. Например, указанное культивирование можно продолжать, пока популяция клеток не достигнет определенной степени конфлюентности (например, не будет конфлюентной по меньшей мере на 50%, 70% или по меньшей мере 90% или более). Термин "конфлюентность" в том виде, как он здесь используется, относится к плотности культивируемых клеток, при которой клетки контактируют друг с другом, покрывая по существу все поверхности, доступные для роста (т.е. полностью конфлюентные).

В отношении стадии (г) способа, первичные клетки культивируют в среде для культуры клеток, поддерживающей их прикрепление, пролиферацию и появление гомогенной популяции клеток, которая, после по меньшей мере одного пассажа, прогрессивно обогащается клетками H2Stem. Клетки H2Stem можно быстро размножать для получения достаточного числа клеток для получения потомства H2Stem, имеющего желательные свойства (например, в виде двумерных прикрепленных клеток или трехмерных кластеров клеток при данной плотности и/или статусе дифференциации), с удвоением числа клеток, которое можно получать в пределах 48-72 ч, и поддержанием потомства H2Stem, имеющего желательные свойства в течение по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более пассажей.

При пассировании культивируемые клетки отделяются и диссоциируют от культурального субстрата и друг от друга. Отделение и диссоциацию клеток можно проводить, как общеизвестно в данной области, например, посредством ферментативной обработки протеолитическими ферментами (например, выбранными из трипсина, коллагеназы, например, типа I, II, III или IV, диспазы, проназы, папаина и т.д.), обработки хелаторами двухвалентных ионов (например EDTA или EGTA) или механической обработкой (например повторным пропусканием через пипетку или наконечник пипетки с маленьким отверстием) или любой комбинации этих методик.

Подходящий способ отделения и диспергирования клеток должен обеспечивать желательную степень отделения и диспергирования клеток, при сохранении большинства клеток в культуре. Предпочтительно отделение и диссоциация культивируемых клеток давала бы существенную долю клеток в виде единичных жизнеспособных клеток (например, по меньшей мере 50%, 70%, 90% клеток или более). Остальные клетки могут присутствовать в кластерах клеток, каждый из которых содержит относительно небольшое число клеток (например, в среднем, от 1 до 100 клеток).

Затем отделенные и диссоциированные таким образом клетки (обычно в виде суспензии клеток в изотоничном буфере или среде) могут быть повторно посеяны на субстрат, который обеспечивает прикрепление к нему клеток, и затем культивируются в среде, как описано выше, поддерживающей дальнейшую пролиферацию клеток H2Stem и потомства H2Stem. Эти клетки можно затем культивировать

путем их повторного посева при плотности от 10 до 10^5 клеток/см², и при коэффициенте деления примерно от 1/16 до 1/2, предпочтительно примерно от 1/8 до 1/2, более предпочтительно примерно от 1/4 до 1/2. Коэффициент деления обозначает долю пассированных клеток, которые высевают в пустой (обычно новый) культуральный сосуд с такой же площадью поверхности, что и сосуд, из которого были получены клетки. Тип культурального сосуда, а также поверхность, обеспечивающая прикрепление клеток в культуральном сосуде и среде для культуры клеток, могут быть такими же, что и исходно используемые и как описано выше, или могут быть отличными. Предпочтительно клетки поддерживают на CellBind или любой другой подходящей подложке, которая покрыта белками внеклеточного матрикса (такими как коллагены и, предпочтительно, коллаген типа I) или синтетическими пептидами.

В том, что касается стадии (д), приведенной выше, выделение популяции клеток H2Stem применимо к клеткам, которые поддерживали кубовидную мезо-эпителиальную морфологию, которые являются позитивными в отношении по меньшей мере одного печеночного маркера и по меньшей мере одного мезенхимального маркера, и которые имеют по меньшей мере одну специфичную для печени активность, дополнительно подтверждающая критерии для исходной идентификации клеток H2Stem на стадии (в), приведенные выше, но которые можно легче установить, при условии большего числа клеток, которое доступно после пассирования.

Термины "проведение выделения" или "выделение" относятся и к физической идентификации, и к выделению популяции клеток из культуры клеток или биологического образца, которые можно проводить путем применения подходящих методик клеточной биологии, которые либо основаны на проверке культур клеток и на характеристике (и на физическом разделении, когда это возможно и желательно) клеток, соответствующих критериям, или на автоматической сортировке клеток согласно присутствию/отсутствию антигенов и/или размеру клеток (как, например, посредством FACS). В некоторых воплощениях термины "проведение выделения" или "выделение" могут включать дополнительную стадию физического разделения и/или количественной оценки клеток, особенно путем проведения проточной цитометрии.

Термины "клеточная популяция" и "популяция клеток" обычно относятся к группе клеток. Если не указано иное, данный термин относится к группе клеток, по существу состоящей или содержащей определенные здесь клетки. Клеточная популяция может по существу состоять из клеток, имеющих общий фенотип, или может содержать по меньшей мере долю клеток, имеющих общий фенотип. Говорят, что клетки имеют общий фенотип, когда они являются по существу сходными или идентичными по одной или более чем одной демонстрируемой характеристике, включая морфологический вид, уровень экспрессии конкретных клеточных компонентов или продуктов (например, РНК или белков), активность определенных биохимических путей, способность к и/или кинетику пролиферации, потенциал к дифференциации и/или ответ на сигналы дифференциации или поведение во время культивирования *in vitro* (например, прикрепление или рост в виде монослоя), но не ограничиваясь ими. Такие демонстрируемые характеристики, следовательно, могут определять популяцию клеток или ее часть. Клеточная популяция может быть "по существу гомогенной", если значительное большинство клеток имеет общий фенотип. "По существу гомогенная" популяция клеток может содержать по меньшей мере 60%, например, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или даже по меньшей мере 99% клеток, имеющих общий фенотип, такой как фенотип, специфически относящийся к клеткам H2Stem (или к потомству H2Stem). Кроме того, популяция клеток может по существу состоять из клеток, имеющих общий фенотип, такой как фенотип клеток H2Stem (т.е. потомство H2Stem), если любые другие клетки, присутствующие в популяции, не изменяют или не имеют существенного влияния на общие свойства клеточной популяции, и следовательно она может быть определена как линия клеток.

В общем, для характеристики клеток H2Stem и потомства H2Stem можно считать подходящей любую технологию для идентификации и характеристики клеточных маркеров для конкретного типа клеток (например, мезенхимальные, печеночные, гематопозитические, эпителиальные, эндотелиальные маркеры) или имеющих специфичную локализацию (например, внутриклеточная, на поверхности клетки или секретруемые), которая опубликована в литературе. Такие технологии можно классифицировать на две категории: технологии, которые позволяют поддерживать целостность клеток во время анализа, и технологии, основанные на экстрактах (содержащих белки, нуклеиновые кислоты, мембраны и т.д.), которые получают, используя такие клетки. Примеры содержат данные о том, как такие технологии были использованы для характеристики клеток H2Stem и потомства H2Stem, например, посредством проведения анализа присутствия антигенов поверхности клетки до проведения более подробного и сравнительного анализа с другими клетками-предшественниками печени или первичными клетками зрелой печени для того, чтобы оценить их отличительные характеристики и биологические активности.

На уровне белка такие технологии, как проточная цитометрия, FACS или иммуноцитохимия, обеспечивают определение присутствия/отсутствия в клетках H2Stem поверхностных или внутриклеточных белков путем применения антител или других специфичных в отношении белка реагентов. Проточная цитометрия является предпочтительной технологией для характеристики клеточных популяций согласно комбинированному присутствию/отсутствию поверхностных или внутриклеточных маркеров при определении методиками с одним или многими окрашиваниями и/или посредством оценки размера и грану-

лярности. Иммуноцитохимия также дает релевантную информацию относительно морфологических характеристик, которые ассоциированы с комбинированным присутствием/отсутствием поверхностных, цитоскелетных и/или других внутриклеточных маркеров. На самом деле Примеры показывают то, что в некоторых воплощениях значимая процентная доля клеток в препарате клеток H2Stem является позитивной в отношении цитокератина-19 (СК-19), цитоскелетного и внутриклеточного маркера. Эту процентную долю можно оценивать как составляющую по меньшей мере 20% или от 20 до 40% при выявлении проточной цитометрией, но она может быть значительно выше (т.е. вплоть до 90% или более) при выявлении СК-19 посредством иммуноцитохимии (см. фиг. 2Б). Эта дополнительная характеристика (т.е. позитивность в отношении СК-19) позволяет устанавливать и идентифицировать популяцию клеток, которую получают путем культивирования первичных клеток печени, таких как клетки H2Stem.

В частности, присутствие по меньшей мере одного мезенхимального маркера (в частности выбранного из ASMA, виментина, CD90, CD73 и CD29) и по меньшей мере одного печеночного маркера следует измерять проточной цитометрией, иммуноцитохимией или любой другой методикой (обычно с применением антител, лектинов или других белков и не требующей экстракции белка или нуклеиновой кислоты), которая позволяет оценивать процентную долю клеток, презентующих рецептор. Позитивность в отношении дополнительных маркеров клеточной поверхности, отличных от маркеров, строго ассоциированных с печеночными или мезенхимальными характеристиками (таких как CD140b, CD49b, CD51 или любой другой позитивный маркер, который упомянут в табл. 2, табл. 4, табл. 6 и табл. 7 в примере 3) можно измерять аналогичным образом. Позитивность посредством проточной цитометрии и иммуноцитохимии здесь определяется, когда по меньшей мере 60% клеток презентуют желательный маркер или рецептор (как показано в примерах). Аналогичным образом, негативность посредством проточной цитометрии и иммуноцитохимии здесь определяется, когда меньше чем 20% клеток презентуют данный маркер или рецептор (как показано в примерах). В некоторых воплощениях меньше чем 10% клеток презентуют данный негативный маркер, как в случае CD140b (см. фиг. 10Б) или CD271 (см. фиг. 11 Б).

В некоторых воплощениях при измерении данного маркера агент, который используется для выявления маркера, как определено выше, или белка поверхности клетки, иммобилизуют на твердой фазе (например, шарике, планшете или биоматериале), метят (например, флуоресцентно метят) и/или распознают посредством другого соединения, которое является меченым (например, вторичное антитело). Существуют многочисленные способы, посредством которых метка может давать сигнал, выявляемый внешними средствами, например, желательным посредством визуальной проверки или посредством электромагнитного излучения, тепла и химических реактивов. Метка или другой компонент системы, дающий сигнал, также могут быть связаны со специфичным партнером связывания, другой молекулой или с подложкой, такой как шарики, с использованием любого способа, известного в данной области, такого как химическое сшивание или с использованием биотин-стрептавидиновой системы. Метка может непосредственно давать сигнал и, следовательно, для получения сигнала не требуются дополнительные компоненты. Многие органические молекулы, например, флуорохромы (такие как FITC (флуоресцеин изотиоцианат), PE (фикоэритрин), PC5, PC7, APC (аллофикоцианин) или любые другие, для которых известно, что они совместимы с проточной цитометрией), поглощают свет в ультрафиолетовой и видимой области. Другие типы метки, такие как радиоактивные изотопы и красители, непосредственно дают сигнал. В качестве альтернативы, для того, чтобы метка давала сигнал, могут быть нужны другие компоненты, и система, дающая сигнал, тогда включала бы все компоненты, требующиеся для получения измеримого сигнала, которые могут включать субстраты, коферменты, ионы металлов или вещества, которые реагируют с ферментативными продуктами (например, хемилюминисцентное выявление пероксидазы хрена).

Печеночно-специфические метаболические активности клеток H2Stem включают биологические активности, обычно ассоциированные с клетками печени (и в частности с гепатоцитами) и отличающие клетки печени от клеток, присутствующих в других тканях, и в частности включают активности, включающие связывание, активацию и/или деградацию белков или других субстратов, как описано в литературе и в Примерах. Эти биологические активности установлены на основе выявления специфичных для печени метаболических активностей, которые могут представлять собой активности связывания белок/лекарственный препарат и, более предпочтительно, ферментативные активности на данных субстратах или в ассоциации со специфичными для печени молекулами, которые выявляются технологиями блоттинга (вестерн- или нозерн-блоттинга), секвенирования, изоэлектрофокусировки, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) или интернализации синтетических или природных соединений, для которых известно, что они специфическим образом транспортируются и метаболизируются в клетках печени. Другие релевантные ферментативные активности, отличные от активностей, строго ассоциированных с характеристиками печени (такие как активности, упомянутые в примере 3), могут быть аналогичным образом измерены и сравнены с активностями, измеренными в гепатоцитах или других типах клеток с использованием методик, которые описаны в литературе.

На уровне нуклеиновых кислот для характеристики клеток H2Stem или потомства H2Stem можно использовать полногеномное секвенирование, ПЦР (полимеразная цепная реакция) или кПЦР-ОТ (коли-

чественная полимеразная цепная реакция, сопряженная с обратной транскрипцией). Тем самым для количественного измерения экспрессии исследуемого гена можно использовать ПЦР в реальном времени, на основе числа циклов, и осуществив нормирование относительно циклов, полученных для 1 или более чем одного эндогенного контроля. В частности, реакцию ПЦР-ОТ можно проводить с использованием клеток H2Stem и подходящих праймеров и буферов, но число циклов для получения сигнала не должно превосходить 25, 30 или 35 циклов.

При данном уровне активности присутствие печеночно-специфической метаболической активности можно измерять любой подходящей методикой, которая обеспечивает оценку присутствия и/или уровня активности печеночно-специфических ферментов, но предпочтительно должна обеспечивать количественное измерение *in vitro* реальной ферментативной активности с данным порогом выявления специфического конечного продукта (как можно легко установить с поддержкой литературы и имеющихся в продаже продуктов) для измерения активностей CYP450, детоксификации, накопления гликогена, секреции альфа-1-антитрипсина или альбумина, продукции желчи, продукции тромбopoэтина, продукции ангиотензиногена, превращения аммиака до мочевины, синтеза холестерина, гликогенолиза, гликогеноза и липогеноза. В частности, позитивность в отношении по меньшей мере печеночно-специфической метаболической активности здесь определяется при измерении активности как статистически превосходящей предел выявления конечного продукта (являющейся по меньшей мере в два раза, пять раз или десять раз большей, чем предел выявления) или приближающейся к уровню активности первичных гепатоцитов (превышающей, идентичной или на 10%, 25%, 50%, 75% или 90% меньшей).

В литературе приведено подробное описание технологий оценки активностей цитохрома P450 в человеческих гепатоцитах *in vitro*, в частности, в том, что касается соединений, специфически индуцирующих ферментативную активность, и форматов, которые можно использовать для проведения данных

экспериментов (Baudoin R et al., 2012; Gerets HH et al., 2012; Gomes-Lechon MJ et al., 2012; Halladay JS et al., 2012; Hoffmann SA et al., 2012; Lubberstedt M et al., 2011; Smith CM et al., 2012). Среди разных индукторов метаболизм лекарственного средства в данных клетках можно оценивать с использованием мидазолама, этоксирезорурфина, бензоксирезорурфина, бупропиона, фенацетина, диклофенака, толбутамида, фенобарбитала, рифампицина, кофеина, бета-нафтофлавона, омепразола, декстрометорфана, 3-метилхолантрена, репаглинида или других известных цито/гепатотоксических соединений в качестве зондов, которые перечислены в литературе (Bale S et al., 2014). Выявление и количественное измерение метаболита можно связывать с активностью ферментов печени в отношении специфических соединений, таких как CYP1A2 (посредством выявления параксантина или ацетаминофена), CYP3A4 (посредством выявления 1-ОН-мидазолама или сульфона омепразола), CYP2C6 (посредством выявления НО-бупропиона), CYP2C8 (посредством выявления гидроксил-репаглинида), CYP2C9 (посредством выявления 4'НО-диклофенака), CYP2C19 (посредством выявления гидроксимопразола или НО-мефенитоина), CYP2D6 (посредством выявления декстрорфана), CYP2E1 (посредством выявления 6-ОН-хлорзоксазона), а также в отношении других активностей главных цитохромов P450, таких как CYP1A2, CYP2A6, CYP1B1, CYP2B6, CYP3A5, CYP3A7 или CYP7A1 (одиночно или в подходящих комбинациях).

Другими ферментами, чью экспрессию или (предпочтительно) активность можно установить в клетках H2Stem и в потомстве H2Stem, являются УДФ-глюкуронозилтрансферазы (такие как UGT1A1, UGT2B4, UGT2B7), сульфотрансферазы (катализирующие конъюгирование с сульфатом нескольких фармакологически важных эндогенных молекул и ксенобиотиков), тирозинтрансферазы, триптофан-2,3-диоксигеназа (TDO2 или TDO), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO1 или IDO2), лизилоксидаза (LOX), глутатион-S-трансферазы (например, СЭТальфа), белки множественной лекарственной устойчивости (MDR или MRP-1/-2/-3), печеночно-специфические транспортеры (такие как OATP1B1) и другие биотрансформирующие ферменты фазы I/II/III. Кроме того, путем применения хорошо установленных протоколов также можно наблюдать и сравнивать продукцию и секрецию альбумина/мочевины, метаболизм аммиака, накопление гликогена, продукцию желчи, продукцию тромбopoэтина/ангиотензиногена и скорости выведения галактозы/сорбита.

При получении препарата клеток H2Stem способами по изобретению, данную популяцию клеток можно либо поддерживать и/или размножить в условиях, которые обеспечивают рост и удвоение без дифференциации. Предпочтительно клетки H2Stem пассируют, как и недифференцированные прикрепленные клетки (или, как указано выше, трехмерные кластеры клеток, названные клетки H3Stem), не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4 или не более чем 5 раз в культуре, таким образом, что можно оценивать число удвоений клеток для установления наиболее подходящих условий для дальнейшего применения *in vivo* или *in vitro*. После одного или более чем одного пассирования в данном статусе, их можно индуцировать к дифференциации в гепатоцитоподобные или гепатоактивные клетки (см. фиг. 1, фиг. 4А и фиг. 5Б-Д). В обоих случаях образующиеся клетки представляют собой потомство H2Stem. В первом случае условиями для поддержания клеток H2Stem в виде недифференцированного потомства H2Stem могут быть те же самые условия, которые используются для получения исходной популяции клеток H2Stem, с целью увеличения числа доступных клеток или, как показано в Примерах, генерации трехмерных кластеров клеток (клетки H3Stem). Во втором случае можно использовать хорошо установленные условия культуры клеток для дифференциации клеток-предшественников зрелой печени в клет-

ки, имеющие морфологические, биологические, функциональные признаки, типичные для клеток, дифференцирующихся в гепатоциты.

После стадии (д) способов по изобретению возможная дополнительная стадия (е) может включать поддержание клеток H2Stem в условиях культуры клеток, обеспечивающих дифференциацию в клетки, демонстрирующие печеночно-специфические активности, являющиеся, например, гепатоцитоподобными или гепатоактивными клетками (то есть, клетки-предшественники зрелой печени, которые потеряли их позитивность в отношении большинства или даже всех мезенхимальных маркеров, и которые являются позитивными в отношении большинства или даже всех морфологических, биологических и функциональных характеристик гепатоцитов). В Примерах приведены подробности того, как получать такие гепатоцитоподобные или гепатоактивные клетки в виде потомства H2Stem в форме прикрепленных клеток (таких как клетки H3Screen-2b, H3Screen-2c или H2Screen) или трехмерных кластеров клеток, которые можно легко поддерживать в суспензии (таких как клетки H3Screen-1 или как клетки H3Screen-2a).

По этому последнему аспекту Примеры показывают то, что чашки или колбы для культуры клеток, обеспечивающие ультразвуковое связывание, и даже более подходящим образом культуральные микропланшеты с U-образными/круглыми лунками, обеспечивающие ультразвуковое связывание, дают трехмерное потомство H2Stem в виде кластеров клеток в суспензии, демонстрирующих улучшенные функциональные и структурные характеристики, которые характеризуют гепатоциты и в общем гепатоактивные клетки. Культуральные микропланшеты с U-образными/круглыми лунками, содержащие 96 или 384 лунки (или в любом другом доступном формате, содержащем другое число лунок с U-образным дном и позволяющем поддерживать культуры клеток в объеме среды для культуры клеток меньше 0,5 мл и, даже лучше, меньше 0,25 мл), дают трехмерное потомство H2Stem в виде кластеров клеток в суспензии с более регулярным размером и формой, что делает их более подходящими для применений *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, популяцию клеток, которую получают и выделяют на стадии (д), приведенной выше, в некоторых воплощениях можно поддерживать в условиях культуры клеток, обеспечивающих образование кластеров клеток, которые представляют собой специфическое трехмерное потомство H2Stem. Данная стадия способа может быть представлена в виде дополнительной стадии (ж) (например, для получения клеток H3Screen-1 из клеток H2Screen), в виде альтернативной стадии (e1) (например, для получения клеток H3Stem из клеток H2Stem), или в виде дополнительной альтернативной стадии (e2), которая объединяет дифференциацию *in vitro* и образование трехмерного потомства H2Stem (например, для получения клеток H2Screen-2a непосредственно из клеток H2Stem).

Дополнительные пассирования (например, открепление и диспергирование клеток, повторный посев и т.д.) и культивирование (например, добавление или замены среды после достижения конfluence и т.д.) можно проводить при условиях, по существу идентичных или аналогичных условиям первого пассажа, как описано выше, или включая модификации, которые могут быть предложены в литературе и/или для конкретного применения клеток H2Stem или потомства H2Stem, в частности, в форме трехмерных кластеров клеток (трехмерного потомства H2Stem). Таким образом, условия для поддержания и/или дифференциации клеток H2Stem или потомства H2Stem в культуре клеток могут быть дополнительно оптимизированы согласно разным критериям, таким как выбор временной схемы/среды для дифференциации в гепатоцитоподобные или гепатоактивные клетки, систем для поддержания трехмерных клеточных культур в виде суспензий клеток, применение специфических субстратов или каркасов, гипоксия, комбинированное или последовательное добавление факторов роста и химических соединений в среде для культуры клеток, или плотность клеток.

Согласно способам по изобретению предложены клетки H2Stem, демонстрирующие характеристики морфологии, экспрессии белка и функциональные характеристики, которые отличаются от характеристик, идентифицированных у описанных ранее клеток-предшественников зрелой печени. Следовательно, клетки H2Stem, которые получают или можно получать определенными выше способами, представляют собой дополнительное воплощение изобретения. Данные способы обеспечивают предоставление популяций клеток, содержащих высокую долю специфических клеток (по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или более), обеспечивая даже по существу гомогенную популяцию клеток в том виде, в котором ее можно оценивать любым подходящим стандартным способом, например, проточной цитометрией или любым другим подходом иммуноокрашивания. Стромальные элементы в данном потомстве H2Stem, в частности, в гепатоактивных клетках и трехмерных кластерах клеток (см. фиг. 4А и фиг. 5), считаются частью такого потомства, и их не следует рассматривать в качестве элементов, загрязняющих такие кластеры клеток, но скорее в качестве составных элементов.

Клетки H2Stem и потомство H2Stem можно использовать для закладки культур клеток для любого немедленного применения или хранить в виде криоконсервированных препаратов, каждый из которых содержит по меньшей мере 10^3 , 10^6 , 10^9 клеток или более, с целью получения или применения большего количества клеток H2Stem или потомства H2Stem после соответственно выполненного оттаивания препаратов и, при необходимости, для производства клеток H2Stem и потомства H2Stem в промышленном масштабе (например, с использованием биореакторов, мембран, микрофер, микроструйного оборудования или любого другого технического решения для улучшения биопроцессинга и размножения клеток при поддержании желательных свойств клеток). Образцы популяций клеток, соответствующих любым из

клеток H2Stem и потомству H2Stem, можно хранить замороженными в консервирующей среде, содержащей сыворотку или не содержащей сыворотку (например, в имеющихся в продаже криоконсервирующих композициях), и/или в присутствии криопротекторного агента (например, диметилсульфоксида в подходящей концентрации). Что касается микроструйного оборудования, потомство H2Stem (также в форме клеток H3Stem, которые поддерживаются в виде трехмерных структур) может быть совместимым с имеющимися в продаже системами, которые разрабатываются для приложений «орган на чипе» при тестировании безопасности, с патофизиологическими исследованиями и другими моделями печени на основе клеток для разработки лекарственного средства и токсикологии (Al  r  e N et al., 2014; Lin C et al., 2015).

В частности, препараты клеток H2Stem и потомства H2Stem, содержащие заданное число клеток (например, 50000, 100000, 500000, 1 миллион, 10 миллионов, 100 миллионов, 1 миллиард или более клеток), или трехмерные кластеры клеток, каждый из которых имеет приблизительно аналогичное число клеток (например, 1, 10, 100, 1000 или более таких же сфероидов, как сфероиды, показанные на фиг. 6), могут быть предоставлены в одном или более чем одном сосуде, который может быть затем включен в набор, содержащий такие сосуды (или другой подходящий сосуд или контейнер, такие как сосуды и контейнеры, используемые для приложений на основе микроструйных систем), который затем может быть включен в набор, содержащий такие сосуды, контейнеры, микроструйный прибор и любое другое подходящее устройство, расходные материалы (например, фильтры, шприцы), растворы (например, PBS, среда для культуры клеток, разбавитель), химические реактивы (например, субстраты ферментов, флуорохромы, препараты), биологические продукты (например, факторы роста, антитела, праймеры) и/или инструкции для применения компонентов такого набора, которые могут быть подходящим образом упакованы и, в результате, отправлены клиентам для применения клеток H2Stem и потомства H2Stem *in vivo* (например, для введения пациенту или животному) или *in vitro* (например, для тестирования токсичности или эффективности соединений в качестве лекарственных средств-кандидатов).

Поддержание, пролиферацию и/или дифференциацию клеток H2Stem и потомства H2Stem в условиях культуры клеток (или после имплантации в животную модель или в пациента) можно проводить, как требуется для желательного применения. В литературе предложено несколько протоколов для поддержания живых клеток-предшественников и/или для получения из них гепатоцитоподобных или гепатоактивных клеток. В Примерах приведены способы получения клеток H2Stem и потомства H2Stem в условиях культуры клеток и их дифференциации в клетки, демонстрирующие печеночно-специфические активности, в форме прикрепленных клеток или в виде трехмерных кластеров клеток. В этом последнем случае клетки H2Stem и потомство H2Stem могут быть предоставлены для желательного применения в виде трехмерных кластеров клеток, аналогичных сфероидам или органоидам печени, которые, согласно литературе, могут давать клетки со значительными улучшениями жизнеспособности и функциональности при введении внутрь или вне печени, используемые для тестирования гепатотоксичности соединений, поддерживаемые в виде криоконсервированных препаратов, размножаемые в биореакторах или в многоярусных стеллажах для увеличения масштаба способа производства, или используемые в устройствах, помогающих работе печени (Lu Y et al., 2012; Saito R et al., 2011; Massie I et al., 2011; Soto-Gutierrez A et al., 2010; Mitaka T and Ooe H, 2010; Meng Q, 2010; Tostoes RM et al., 2012). Помимо способов, описанных в Примерах, трехмерный рост клеток H2Stem и потомства H2Stem также можно получать путем инкапсуляции данных клеток в синтетические или биологические матрицы. В частности, в качестве каркасов для культивирования одного или более чем одного типа клеток можно использовать децеллюляризованные или внеклеточные матрицы для печени в виде двухмерного субстратного покрытия и трехмерной инъектируемой гидрогелевой платформы для получения органоидов печени (Lee J et al. 2014; Caralt M et al., 2014).

Поддержание, пролиферацию и/или дифференциацию клеток H2Stem и потомства H2Stem можно улучшать путем адаптации условий культуры клеток с использованием технических решений, хорошо известных в области стволовых клеток, клеток-предшественников или мезенхимальных клеток разного происхождения. Например, протоколы *ex-vivo* в не повреждающей клетки атмосфере с низким содержанием кислорода и другие подходы для адаптации к микроусловиям *in vitro* могут облегчать выживание, генетическую стабильность, пролиферацию, дифференциацию после приживления трансплантата, хоуминг и повторное заселение печени, секрецию паракринных факторов и общий терапевтический потенциал таких клеток (Muscar   C et al., 2013; Cigognini D et al., 2013). В иных случаях тестируют компоненты, происходящие из крови человека, такие как сыворотка крови из пуповины и лизат тромбоцитов, и разрабатывают в качестве компонентов культуры клеток, которые представляют собой нексеногенную альтернативу фетальной бычьей сыворотки и при этом не противоречат руководствам надлежащей производственной практики (GMP) для того, чтобы обеспечить получение клинически релевантных доз клеток без хорошо известных проблем, ассоциированных с сывороткой, таких как варьирование качества, риск загрязнения и нежелательные иммунизирующие эффекты (Bieback K, 2013; Griffiths S et al., 2013).

Перед введением или иным применением клетки H2Stem и потомство H2Stem можно временно или стабильно модифицировать, подвергая указанные клетки воздействию гетерологичных биологических

или химических агентов, или путем введения указанных агентов в клетки. В частности клетки H2Stem и потомство H2Stem можно модифицировать (или генетически модифицировать после их трансформации подходящими векторами) в культуре клеток (например, после и/или до их дифференциации) путем обработки клеток факторами роста и/или введения нуклеиновых кислот, которые воздействуют на общий профиль экспрессии клеток, предпочтительно в направлении специфических печеночных характеристик или характеристик, помогающих культивированию клеток (например, посредством трансдукции клеток микроРНК или лентивирусными векторами, экспрессирующими рекомбинантные белки, такие как факторы роста, или транскрипционные факторы, для которых известно, что они воздействуют на печеночную дифференциацию или дифференциацию в направлении любого другого типа клеток, и/или продукцию специфических белков, представляющих терапевтический интерес, или флуоресцентные белки).

В частности, клетки H2Stem и потомство H2Stem могут, следовательно, демонстрировать улучшенные и/или дополнительные биологические активности *in vivo* и/или *in vitro*, после и/или до их дифференциации в клетки, демонстрирующие полный диапазон активностей, специфичных для печени. Предпочтительно клетки H2Stem и потомство H2Stem генетически модифицируют до дифференциации таким образом, что любое потомство таких клеток единообразно модифицировано для того, чтобы иметь улучшенные биологические активности, независимо от любой последующей дифференциации *in vitro* или применения *in vivo* (это может подразумевать или может не подразумевать печеночный или другой тип дифференциации).

Обработка потомства H2Stem химическими агентами, средой для культуры клеток и/или векторами на основе нуклеиновых кислот, которые известны как индуцирующие дифференциацию других известных клеток-предшественников/стволовых клеток печени в другие типы непеченочных клеток (например, остециты, продуцирующие инсулин бета-клетки или клетки костного мозга), может равным образом давать такие типы непеченочных клеток. Популяции непеченочных клеток, которые получают путем данных технологий, известных в литературе, к клеткам H2Stem (или любому специфическому типу потомства H2Stem), представляют собой дополнительные типы дифференцированного потомства H2Stem, чем потомство, описанное в Примерах (полученное с использованием среды для культуры клеток для индуцирования печеночной дифференциации), которое можно использовать *in vitro* и/или *in vivo* (в частности, для терапевтических применений) согласно биологическим активностям, которые потеряло и/или приобрело потомство H2Stem вследствие такой обработки (например, дифференцированное потомство H2Stem, которое продуцирует и секретирует инсулин, можно использовать для лечения диабета).

Для введения нуклеиновых кислот в клетки H2Stem и потомство H2Stem можно использовать традиционные способы переноса генов, применимые к клеткам-предшественникам печени, включая микроинъекцию, электропорацию, соосаждение с фосфатом кальция, липосомы или вирусную трансфекцию. После их трансформации подходящими векторами, клетки H2Stem и потомство H2Stem могут экспрессировать рекомбинантные белки или содержать нуклеиновые кислоты, которые позволяют указанным клеткам осуществлять улучшенные и/или дополнительные биологические активности *in vivo* и/или *in vitro*, после и/или до их дифференциации в гепатоцитоподобные или гепатоактивные клетки (например, с целью получения моделей на основе клеток-предшественников печени для генотерапии). Когда векторы представляют собой вирусные векторы (например лентивирусный вектор), они будут характеризоваться определением их титра для того, чтобы выбрать условия оптимальной эффективности трансдукции и скорости пролиферации и для анализа профиля их экспрессии, а также их безопасности.

Печень анатомически соединена с системой кровообращения таким образом, что она обеспечивает эффективное высвобождение разных белков в кровотоки. Следовательно, гены, кодирующие белки, которые имеют системный эффект, могут быть вставлены в клетки H2Stem и потомство H2Stem (в частности, перед культивированием для получения трехмерных кластеров клеток) для дальнейшего улучшения их эффективности (в частности, при системном введении, например, посредством внутривенной, внутримышечной или внутрибрюшинной инъекции), а также для их приживления и поддержания при введении *in vivo*. Как показано в Примере 4 на релевантной мышечной модели, клетки H2Stem демонстрируют высокий уровень приживления, хоуминга и печеночной дифференциации в ткани печени, таким образом, потенциально давая эффективные средства введения экзогенных белков.

Например, в клетки печени по настоящему изобретению может быть вставлено множество генов, кодирующих гормоны или антитела, для секреции их продуктов в систему кровообращения. В частности, клетки H2Stem и потомство H2Stem могут быть модифицированы для конститутивной или временной сверхэкспрессии белка, экспрессируемого гепатоцитами в нормальных условиях (и возможно уже экспрессируемого такими клетками), но который является дефектным или отсутствует у пациента (этот дефект лежит в основе патологического состояния пациента, как в случае врожденного нарушения метаболизма в печени), и, в таком случае, помогая восстанавливать продукцию белка и посредством этого помогая лечению пациента. Примерами таких белков являются метаболические белки, такие как орнитин-транскарбамиллаза, аргининосукцинатсинтетаза, аргининосукцинатлиаза, аргиназа, карбамилфосфатсинтаза, N-ацетилглутаматсинтаза, глутаминсинтетаза, гликогенсинтетаза, глюкозо-6-фосфатаза, щелочная фосфатаза, сукцинатдегидрогеназа, глюкокиназа, пируваткиназа, ацетил-КоА-карбоксилаза, синтетаза жирных кислот, аланинаминотрансфераза, глутаматдегидрогеназа, ферритин, рецептор липопротеина

низкой плотности (LDL), ферменты на основе цитохрома P450, альдегиддегидрогеназы и/или алкогольдегидрогеназа.

В качестве альтернативы, клетки H2Stem и потомство H2Stem могут быть модифицированы путем введения ДНК, кодирующей секретиремый белок плазмы, такой как альбумин, фактор роста или гормон, инсулин, трансферрин, белки комплемента (такие как компонент C3), альфа2-макроглобулин, альфа/бета/гамма цепь фибриногена, Факторы свертывания (Фактор V, Фактор VII, Фактор VIII, Фактор XI, Фактор XIII, Фактор IX), альфа1-антитрипсин или тому подобные.

Биологические материалы, которые получают при генерации клеток H2Stem и потомства H2Stem, можно далее использовать для идентификации биологических объектов, которые могут иметь конкретные применения, в частности, различные медицинские применения. Данные биологические материалы включают не только субпопуляцию (или линии клеток) клеток H2Stem или потомства H2Stem, которые демонстрируют специфические маркеры, активности и/или морфологию (как определено в примерах 3 и 4), но также и любой другой биологический объект, который получают в виде промежуточного соединения или конечных продуктов, такой как кондиционированные среды культуры клеток и фракции данных клеток, и среды, включающие белки, метаболиты, клеточные везикулы и/или нуклеиновые кислоты, которые можно использовать в качестве биомаркеров для выявления клеток, представляющих медицинский интерес, или в качестве соединений, которые демонстрируют активности или распределение, представляющие медицинский интерес. Даже несмотря на то, что такой подход можно осуществлять непосредственно с использованием интересующих клеток, также можно определять дополнительную информацию путем измерения содержания в кондиционированных средах культуры клеток (например, в форме супернатанта культуры клеток), что может дать релевантную информацию по секретому и, в частности, по паракринным эффектам клеток H2Stem и потомства H2Stem.

Релевантные биологические характеристики клеток H2Stem или потомства H2Stem можно идентифицировать с использованием таких технологий, как проточная цитометрия, иммуноцитохимия, масс-спектрометрия, гель-электрофорез, иммуноанализ (например, иммуноблоттинг, вестерн-блоттинг, иммунопреципитация, ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ)), амплификация нуклеиновой кислоты, ферментативная активность, технологии омики (протеомика, гликомика, транскриптомика, метаболомика) и/или другие методики определения биологической активности. В частности, такие технологии, как геномика, транскриптомика, протеомика, липидомика, гликомика и т.д., могут предоставить дополнительные способы сравнения клеток H2Stem или потомства H2Stem с использованием баз данных и других наборов данных, которые опубликованы для стволовых клеток или клеток-предшественников, и в частности для клеток-предшественников печени (Yu J, et al., 2012; Santamaria E, et al., 2012; Slany A, et al., 2010; Sison-Young R et al., 2015). Таким образом белки, такие как SUSP2, могут быть идентифицированы в качестве маркеров, значительно большее присутствие которых в клетках H2Stem отличает их от клеток, имеющих аналогичное происхождение, таких как клетки ADHLSC (или, в противоположном направлении, отсутствие экспрессии CD140b отличает клетки H2Stem от клеток ADHLSC, как показано на фиг. 10). Дополнительными маркерами, которые можно использовать во время исходной стадии получения потомства H2Stem или позднее (например, для оценки пригодности для фармацевтического применения), являются CD49b, CD51 с одним или более чем одним белком группы в списке табл. 2, приведенной ниже, или без такого белка.

Данные подходы могут обеспечить способы определения новых биомаркеров, ассоциированных с клетками-предшественниками зрелой печени, или *in vivo*, или *in vitro* (например, для установления количества, качества и гомогенности популяции клеток до, во время или после ее получения и применения). В частности, биомаркеры можно определять посредством концентрации данной популяции клеток (клеток H2Stem и/или потомства H2Stem) в биологическом образце или в культуре клеток в общем или в комбинации с концентрацией клеток, которые презентуют специфический белок, липид, фермент, фосфолипид и/или гликан. Такие биомаркеры могут соответствовать пептиду, белку, фосфолипиду, липиду, нуклеиновой кислоте, гликану или любым комбинациям таких компонентов элементов. Биомаркер может быть специфичным для оценки пригодности популяции клеток, представляющей собой клетки H2Stem или потомство H2Stem, для данного применения (например, лечения конкретного заболевания печени, получения гепатоактивных типов клеток после дифференциации *in vitro* или модификации химическими агентами и/или векторами на основе нуклеиновой кислоты, оценки метаболизма конкретного соединения), в частности, при сравнении потомства H2Stem, полученного от разных доноров, и/или посредством применения разных способов изготовления. Иным образом, биомаркер обеспечивает оценку того, подходит ли данная ткань печени (или образец свежих или криоконсервированных клеток печени) для более эффективного получения клеток H2Stem (например, посредством скрининга банков тканей печени и библиотек других происходящих из печени биологических образцов, таких как белковые экстракты и библиотеки кДНК) для установления того, какие доноры и/или образцы могут быть отобраны).

Термин "биомаркер" или "маркер" относится к молекуле, параметру, характеристике или объекту, который объективно измеряют и оценивают как характеризующий клетки H2Stem и/или потомство H2Stem. Количественная оценка биомаркера, который ассоциирован с клетками H2Stem и/или с потом-

ством H2Stem в конкретном образце (таком как ткань или биологическая жидкость), может быть ассоциирована с количественной оценкой всех клеток, с эффективностью, с которой могут быть получены и выделены клетки H2Stem и/или потомство H2Stem, со специфической технологией *in vitro* или со специфическим медицинским применением или статусом пациента.

Клетки H2Stem и потомство H2Stem можно использовать в регенеративной медицине и в биологических анализах, требующих клеток, которые демонстрируют биологические характеристики (такие как метаболические или ферментативные активности, антигенный профиль или другой фенотип) настолько сходные, насколько это возможно, с характеристиками, наблюдаемыми для первичных гепатоцитов, в течение желательного периода времени, как только они дифференцируются либо *in vivo*, либо *in vitro*, либо даже до индукции полной дифференциации в направлении клеток, демонстрирующих большее число и/или более сильные печеночно-специфические активности (то есть, до гепатоактивных клеток). Клетки H2Stem и потомство H2Stem также можно использовать для применений *in vitro*, таких как фармакологические или токсикологические исследования (например, скрининг и характеристика биологических или химических агентов). Клетки H2Stem и потомство H2Stem обеспечивают получение *in vitro* животных моделей токсикологии, фармакологии и фармакогенетики (как всесторонне описано для первичных гепатоцитов и гепатоцитоподобных клеток, происходящих из клеток-предшественников или стволовых клеток разного происхождения) или идентификацию биомаркеров для идентификации *in vivo* и/или *in vitro* популяции клеток, представляющих медицинский интерес, в частности, в связи с постановкой диагноза, предупреждением и/или лечением заболеваний печени.

Термин "*in vitro*" в том виде, как он здесь используется, обозначает снаружи или во внешней среде по отношению к организму животного или человека. Термин "*in vitro*" в том виде, как он здесь используется, следует понимать как включающий "*ex vivo*". Термин "*ex vivo*" обычно относится к тканям или клеткам, удаленным из организма животного или человека и поддерживаемым или размножаемым вне организма, например, в культуральном сосуде или биореакторе.

Если клетки H2Stem и клетки H3Stem можно предпочтительно использовать для применений *in vivo*, потомство H2Stem, соответствующее клеткам H2Screen, клеткам H3Screen-1 и разным категориям клеток H3Screen-2, можно предпочтительно использовать в качестве дифференцированных гепатоцитоподобных или гепатоактивных клеток для изобретения/валидации лекарственных средств.

Клетки H2Stem и потомство H2Stem (или соответствующие биологические материалы, которые получают при их генерации) могут быть предоставлены в содержащих их композициях, и, в частности, в виде фармацевтических композиций, которые можно использовать в терапевтических способах для введения *in vivo* (у людей или в животных моделях) или в применениях *in vitro* в форме композиции, включающей такие клетки либо в виде свежих клеток, либо клеток, подходящих для длительного хранения (например, криоконсервированных клеток). Предпочтительно композиция, содержащая клетки H2Stem или потомство H2Stem, может содержать по меньшей мере 10^3 , 10^6 , 10^9 или более клеток. Такие композиции на основе клеток также могут включать другие агенты биологического (например, антитела или фактор роста) или химического происхождения (например, лекарственные средства, соединения, консервирующие или метящие клетки), которые могут давать дополнительный терапевтический, диагностический или любой другой полезный эффект. В литературе предложено несколько примеров возможных добавок, эксципиентов, наполнителей и/или носителей, которые являются совместимыми с фармацевтическими композициями на основе клеток, которые могут включать дополнительные специфические буферы, факторы роста или адъюванты, в которых определено количество каждого компонента композиции (в показателях микрограммов/миллиграммов, объема или процентного содержания), а также средства для их объединения с клетками H2Stem и потомством H2Stem.

Клетки H2Stem и потомство H2Stem можно вводить в форме композиции, которая, в зависимости от выбранного способа введения, может представлять собой суспензию клеток, губку или другую трехмерную структуру, в которой клетки могут расти и дифференцироваться *in vitro* и/или *in vivo*, включая биоискусственные печеночные устройства, природные или синтетические матрицы, или другие системы, обеспечивающие приживание и функциональность клеток. В частности, клетки H2Stem и потомство H2Stem можно вводить посредством инъекции (охватывающей также катетерное введение) или имплантации, например, локализованной инъекции, системной инъекции, внутриселезеночной инъекции, внутрисуставной инъекции, внутривнутрибрюшинной инъекции, инъекции в воротную вену, инъекции в паренхиму печени, например, под капсулу печени, парентерального введения или внутриматочной инъекции в эмбрион или плод. При системной и не местной инъекции продукт H2Stem может оказывать эффект на дальний участок либо из-за того, что такие клетки H2Stem передвигаются в кровотоке и приживаются в удаленных участках (таких как внутренние органы или суставы), либо белки, секретируемые клетками H2Stem достигают специфических типов клеток, благодаря кровотоку. Кроме того, для клеток H2Stem и потомства H2Stem могут использоваться биологические компоненты устройств детоксификации, таких как устройства перфузии печени или вспомогательные устройства для печени с жесткой, пластмассовой наружной оболочкой и полыми волокнами из полупроницаемой мембраны, в которые высевают клетки H2Stem или потомство H2Stem (подобно другим стволовым клеткам, первичным человеческим клеткам, таким как дифференцированные гепатоциты, или типам клеток, происходящих из стволовых клеток).

Через данное устройство можно осуществлять перфузию жидкости организма для детоксификации согласно хорошо известным методикам и затем возвращать пациенту.

Клетки H2Stem, потомство H2Stem или содержащую их композицию можно использовать для инженерии ткани и клеточной терапии посредством трансплантации клеток печени (LCT) во внутрипеченочные или внепеченочные участки (включая модулирование иммунологического ответа на предшествующую или последующую трансплантацию печени или других органов и тканей). Используя данный подход также можно получать животные модели заболеваний печени человека путем трансплантации клеток H2Stem человеческого происхождения, потомства H2Stem человеческого происхождения, или содержащей их композиции животным, в которых эффекты соединения на человеческие гепатоциты могут быть более эффективно оценены и отличены от эффектов в животной модели.

При введении терапевтической композиции, содержащей клетки H2Stem или специфическое потомство H2Stem, она обычно может быть приготовлена в единичной дозировке. В любом случае может быть желательным включение агентов и/или адаптация известных способов для введения клеток пациентам, которые обеспечивают жизнеспособность клеток H2Stem или потомства H2Stem, например, путем включения клеток в биополимер или синтетический полимер. Примеры подходящих биополимеров включают фибронектин, фибрин, фибриноген, тромбин, коллаген и протеогликаны ламинины, молекулы адгезии, протеогликаны, гиалуронаны, гликозаминогликановые цепи, хитозан, альгинат, природные или синтетически модифицированные пептиды, которые происходят из таких белков, и синтетические, биодegradуемые и биосовместимые полимеры. Данные композиции можно получать с включением или без включения цитокинов, факторов роста и вводить в виде суспензии или в виде трехмерного геля с клетками, погруженными в него.

В способах по изобретению рассматривается не только применение любого донора тканей печени для получения клеток H2Stem или потомства H2Stem, но и применение собственной ткани печени пациента для получения и выделения клеток H2Stem и получения потомства H2Stem или содержащей их композиции. Такие клетки были бы аутологичными по отношению к пациенту и могли бы легко вводиться пациенту. Иным образом, клетки H2Stem можно получать и выделять из ткани, которая не является собственной тканью пациента. Когда рассматривается введение таких клеток пациенту, может быть предпочтительным, чтобы ткань печени, подвергнутая способу по настоящему изобретению для получения клеток H2Stem, была выбрана таким образом, чтобы максимизировать, по меньшей мере в пределах достижимых границ, совместимость ткани между пациентом и введенными клетками, посредством этого уменьшая вероятность отторжения введенных клеток иммунной системой пациента (например, отторжение по типу "трансплантат против хозяина").

Проблемой, касающейся терапевтического применения клеток H2Stem и потомства H2Stem, является количество клеток, необходимое для достижения оптимального эффекта. Дозы для введения могут быть варьирующими, могут включать исходное введение с последующими введениями; и могут быть установлены специалистом с помощью описания настоящего изобретения. Обычно введенная доза или дозы будут обеспечивать терапевтически эффективное количество клеток, и может потребоваться оптимизация количества введенных клеток. Таким образом, количество клеток, подлежащих введению, будет варьировать для субъекта, которого лечат (например, от 10^2 до 10^{10} клеток на каждую обработку в цикле или на весь цикл лечения). Однако точное определение терапевтически эффективной дозы может быть основано на индивидуальных для каждого пациента факторах, включающих его размер, возраст, размер повреждения ткани и количество времени, прошедшего с момента повреждения.

Предпочтительно композиции, содержащие клетки H2Stem или специфическое потомство H2Stem, должны содержать по существу гомогенную популяцию клеток, как определено выше, и количество клеток в пределах каждой дозы может быть соответственно скорректировано. В частности, когда композиция содержит клетки H3Stem или любое другое потомство H2Stem, которое образует трехмерные кластеры клеток, такие композиции можно получать согласно не только общему числу клеток (или кластеров клеток), но также и по их размеру путем отбора кластеров клеток, подлежащих введению, имеющих диаметр в пределах данного интервала (например, от 50 мкм до 200 мкм или от 50 мкм до 100 мкм) или меньше/больше данного размера (например, 100 мкм, 200 мкм, 500 мкм или 1000 мкм) и/или содержащие данное число клеток (например, по меньшей мере 10000, 20000, 50000, 100000 или более).

Распределение, дифференциацию и/или пролиферацию клеток H2Stem или потомства H2Stem после их введения или имплантации можно определять (а также их активность после/до введения другого терапевтического агента) и можно тестировать у субъекта-человека или в животных моделях (предпочтительно у грызуна). Например, анализ печеней мышей с SCID (тяжелый комбинированный иммунодефицит), которым трансплантировали в селезенку клетки H2Stem или потомство H2Stem, может демонстрировать, что данные клетки способны к пересадке в печень и повторному заселению данного органа, путем выявления человеческого маркера, и к дифференциации в активные зрелые гепатоциты путем выявления человеческого альбумина или любого другого обычного специфического для печени человека маркера (или рекомбинантного гена, который ранее трансфицировали в введенные клетки H2Stem или потомство H2Stem).

Другим аспектом изобретения является способ предупреждения и/или лечения заболевания печени,

включающий введение клеток H2Stem, потомства H2Stem или содержащей их композиции субъекту, нуждающемуся в этом. Клетки H2Stem и потомство H2Stem можно использовать для лечения заболеваний печени, в частности заболеваний, требующих постоянного (или ограниченного во времени) восстановления функции печени у субъекта, которое, согласно литературе, требует трансплантации печени, трансплантации гепатоцитов или регенерации печени, восполняющих потерю массы и/или функции печени, которая наблюдается, и которые могут быть сгруппированы в разные категории.

Способ лечения заболевания печени включает введение продукта H2Stem, такого как клетки H2Stem или данное потомство H2Stem, и предпочтительно в пределах композиции, субъекту, нуждающемуся в этом. В частности, способ лечения заболевания у пациента, нуждающегося в этом, включает введение эффективного количества продукта H2Stem пациенту, причем заболевание предпочтительно представляет собой заболевание печени, такое как врожденное нарушение метаболизма в печени, наследственное нарушение свертывания крови, прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз типа 1/2/3, недостаточность альфа-1-антитрипсина, дефект транспортеров клеток печени, порфирию, жировую инфильтрацию печени или другое фиброзное заболевание печени, первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, дегенеративное заболевание печени или острую либо хроническую недостаточность печени. Первая категория заболеваний печени представлена врожденными нарушениями метаболизма в печени, которые могут быть дополнительно обособлены на нарушения метаболизма аминокислот (такие как валинолейцинурия, фенилкетонурия, тирозинемия, пропионовая ацидемия, органическая ацидурия и расстройства образования мочевины, включая аргининосукцинурию, недостаточность карбамоил-фосфатсинтазы I, цитруллинемию, гипераргининемию и недостаточность орнитинкарбамоил-трансферазы), метаболизма металлов (такие как болезнь Вильсона или гемохроматоз) и метаболизма углеводов (такие как гликогеноз типа I/II, фруктоземия или галактоземия), лизосомные расстройства (такие как болезнь Вольмана, болезнь Ниманна-Пика), пероксисомные расстройства (такие как болезнь Рефсума), семейные гиперхолестеринемии и другие нарушения метаболизма липидов, митохондриальные заболевания (такие как недостаточность пируваткарбоксилазы) и гипербилирубинемия (такую как синдром Криглера-Найяра, синдром Жильбера или синдром Дубина-Джонсона). Вторая категория представлена наследственными расстройствами свертывания крови, такими как недостаточность Фактора V, недостаточность Фактора VII, недостаточность Фактора VIII, недостаточность Фактора IX, недостаточность Фактора XI, недостаточность Фактора XIII и другие недостаточности из-за недостаточного количества других связанных со свертыванием факторов (включая другие факторы свертывания и альфа/бета/гамма-цепи фибриногена) или других белков, специфически экспрессируемых и секретируемых печенью в кровотоке (таких как альбумин). Третья категория представлена другими заболеваниями печени, непосредственно не ассоциированными с недостаточностями свертывания или метаболизма, и включает прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз типа 1/2/3, недостаточность альфа-1-антитрипсина, болезнь Кароли, дефекты транспортеров клеток печени, порфирии (такие как острая интермиттирующая порфирия), жировую инфильтрацию печени и другие фиброзные заболевания печени (NASH (неалкогольный стеатогепатит)/NAFLD (неалкогольная жировая болезнь печени), первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, дегенеративные заболевания печени или острую либо хроническую недостаточность печени (например постгепатэктомическую, скоротечную, индуцированную вирусами, острую печеночную недостаточность, развившуюся на фоне хронической)).

Как обсуждалось выше, продукт H2Stem можно вводить или использовать в комбинации с другим продуктом (таким как лекарственное средство, терапевтический агент, другой тип клетки или другой биологический материал). Это применимо к любым описанным здесь введениям и терапевтическим применениям. В частности, другой терапевтический продукт можно вводить по существу в одно и то же самое время с продуктом H2Stem (в пределах той же самой фармацевтической композиции или в отличных фармацевтических композициях) или в разное время (в отличных фармацевтических композициях и в любом порядке или с любой частотой). Независимо от того, вводят ли другой терапевтический продукт отдельно от продукта H2Stem или нет, полученные в результате эффекты могут быть синергетическими, то есть эффекты превосходят суммарные эффекты, которые ожидаются, отрицательные эффекты одного из таких компонентов смягчаются или исчезают, и/или положительные эффекты одного из таких компонентов получают введением его в меньшем количестве или менее часто.

Когда продукт H2Stem представляет собой потомство H2Stem, данные клетки можно вводить (независимо от того, сокультивировались ли они ранее в условиях *in vitro* или нет) в комбинации с другим типом клеток (например, с первичными человеческими гепатоцитами, клетками ADHLS или другим типом или популяцией человеческих клеток, являющимися первичными, стволовыми, мезенхимальными и/или клетками-предшественниками, такими как клетки, описанные в WO2006126219) и другими клетками-предшественниками или стволовыми клетками, происходящими из печени) или с соответствующими им кондиционированными средами культуры клеток в форме супернатанта культуры клеток. Комбинация клеток H2Stem с другим типом клеток может улучшать терапевтическую эффективность, приживление, хоуминг, повторное заселение, пролиферацию и/или стабильность одного и/или другого типа клеток в человеческом организме. Потомство H2Stem можно вводить в виде части композиции, также содержащей такой другой тип клеток, или можно вводить отдельно, но в комбинации с этим другим типом

клеток, например, последовательно или одновременно (в любом порядке). Два типа клеток можно вводить в виде суспензии или сокультуры клеток, или в губке или другой трехмерной структуре, в которой клетки могут расти, пролиферировать и дифференцироваться *in vitro* и/или *in vivo*, включая биоискусственные печеночные устройства и природные или синтетические матрицы, которые поддерживают сохранение данных клеток в человеческом организме. Комбинация клеток H2Stem с кондиционированными средами культуры клеток другого типа клеток может давать потомство H2Stem с улучшенной терапевтической эффективностью, приживлением, пролиферацией и/или стабильностью в человеческом организме, вместе с дополнительными полезными свойствами, относящимися к составу кондиционированных сред культуры клеток другого типа, или без них.

В качестве альтернативы, когда продукт H2Stem представляет собой кондиционированные среды культуры клеток потомства H2Stem, данный препарат можно вводить в комбинации с другим типом клеток (например, с первичными человеческими гепатоцитами, клетками ADHLSC или другим типом или популяцией человеческих клеток, являющимися первичными, стволовыми, мезенхимальными и/или клетками-предшественниками, такими как клетки, описанные в WO2006126219, и другими клетками-предшественниками или стволовыми клетками, происходящими из печени) или с соответствующими им кондиционированными средами культуры клеток. Комбинация кондиционированных сред культуры клеток потомства H2Stem с другим типом клеток может улучшать приживление, стабильность, хоуминг, пролиферацию, повторное заселение и/или стабильность данного последнего типа клеток в человеческом организме. Опять-таки продукт H2Stem можно вводить в виде части композиции, также содержащей такой другой тип клеток, или можно вводить отдельно, но в комбинации с этим другим типом клеток, например, последовательно или одновременно (в любом порядке). Кроме того, в качестве альтернативы, комбинация кондиционированных сред культуры клеток потомства H2Stem с кондиционированными средами культуры клеток другого типа клеток может давать раствор с улучшенной терапевтической эффективностью, потенциально объединяя эффекты секретируемых белков, содержащихся в них. Опять-таки кондиционированные среды культуры стволовых клеток потомства H2Stem можно вводить в виде части композиции, также содержащей такие другие кондиционированные среды культуры клеток, или можно вводить отдельно, но в комбинации с этими другими средами, как, например, последовательно или одновременно (в любом порядке).

Введение или терапевтическое применение продукта H2Stem (аналогично введению и терапевтическому применению клеток ADHLSC или кондиционированных сред культуры клеток ADHLSC, как описано в WO2015001124) также может давать неожиданные положительные эффекты. В частности, введение или терапевтическое применение потомства H2Stem или кондиционированных сред культуры клеток, полученных от потомства H2Stem, можно комбинировать с введением белка, специфически требующимся для лечения наследственного заболевания, такого как метаболический фермент (например, орнитинтранскарбамиллаза или УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1A1), или фактор свертывания (например Фактор VIII, Фактор IX или Фактор XI). Такие белки или факторы свертывания можно использовать совместно с белками и ферментами, которые предоставляются продуктом H2Stem (или клетками ADHLSC, или соответствующими кондиционированными средами культуры клеток), и которые участвуют в том же самом метаболическом пути или физиологической функции (например, в свертывании крови), возможно получая синергетические эффекты. Когда продукт H2Stem вводят или используют в комбинации с другим продуктом, как обсуждалось выше, данный другой продукт может соответственно представлять собой такой белок для лечения наследственного заболевания, такой как метаболический фермент или фактор свертывания. Кроме того, фармацевтические композиции могут быть получены путем криоконсервации продукта H2Stem в высокой концентрации (10 миллионов/мл, 50 миллионов/мл, 100 миллионов/мл или более в подходящих имеющихся в продаже растворах, таких как Cryostor), который оттаивают и вводят пациентам посредством разведения фармацевтической композиции подходящим разбавителем непосредственно в криоконсервирующих сосудах (без необходимости использования классифицированной среды и с меньшими логистическими требованиями).

Данный подход может обеспечивать фармацевтические композиции, которые дают более длительные и/или улучшенные терапевтические эффекты, чем введение выделенного рекомбинантного белка, который обычно используется для лечения недостаточности фермента или фактора свертывания. Фармацевтическая композиция может, следовательно, содержать (а) продукт H2Stem, как здесь описано, такой как потомство H2Stem или его кондиционированная культуральная среда, (б) другой продукт, как здесь описано, такой как лекарственное средство, терапевтический агент, другой тип клеток или другой биологический материал, более конкретно белок для лечения наследственного заболевания, такого как недостаточность метаболического фермента (например, орнитинтранскарбамиллазы или УДФ-глюкуронозилтрансферазы 1A1) или фактора свертывания (например, Фактора VIII, Фактора IX или Фактора XI) и в) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. С этой целью во время процесса получения можно отбирать специфические типы продуктов H2Stem и клеток ADHLSC (таких как субпопуляция, линии клеток и их фракция) с момента демонстрации наиболее подходящего уровня продукции ряда белков (в виде абсолютных значений и/или отношения среди таких белков), которые участвуют в данном метаболическом пути или физиологической функции (например, в свертывании крови). Например, спе-

цифические субпопуляции клеток H2Stem или клеток ADHLSC (и имеющий к ним отношение способ получения) можно отбирать с момента получения популяций клеток (которые могут поддерживаться в виде линии клеток, депонированных препаратов клеток или сохраняемых иным способом), которые имеют сбалансированную экспрессию многих факторов свертывания (например, двух или более чем двух внешних факторов: Фактора V, Фактора VII и Фактора X, и/или двух или более чем двух внутренних факторов: Фактора VIII, Фактора XI, Фактора XIII, Фактора XII и Фактора IX), которые подходят для одного из разных типов недостаточности факторов свертывания, такого как гемофилия (типа А, ассоциированная с недостаточностью фактора; типа В, ассоциированная с недостаточностью фактора IX; типа С, ассоциированная с недостаточностью фактора XI; см. Kabel A 2014 относительно обзора расстройств, связанных с кровотечением, и их терапевтического лечения).

Применение клеток H2Stem или потомства H2Stem, в общем, (или специфических популяций клеток, таких как клетки H3Stem) в пределах композиций и в способах лечения может давать терапевтические эффекты в отношении заболеваний печени, таких как заболевания, перечисленные выше, но также может быть ассоциировано с исследованиями *in vitro* при замене первичных гепатоцитов или линий клеток печени. В частности, поколение H2Stem можно использовать в (ранних) фармакологических и токсикологических способах для оценки эффективности (если продукт H2Stem экспрессирует потенциальную мишень лекарственного средства для специфического или неспецифического для печени заболевания), метаболизма, стабильности и/или токсичности соединений (например, биологических или химических соединений).

Такие способы и применения *in vitro* обычно должны включать следующие этапы:

(а) предоставление препарата продукта H2Stem (например, клеток H2Stem или потомства H2Stem в форме клеток, экстракта клеток или кондиционированной среды, полученной от клеток H2Stem или потомства H2Stem);

(б) воздействие на указанный продукт H2Stem одного или более чем одного экзогенного компонента, выбранного из химических соединений, белков, нуклеиновых кислот, липидов, Сахаров, металлов, солей, вирусов, бактерий или клеток; и

(в) выявление эффектов указанного одного или более чем одного экзогенного компонента на продукт H2Stem и/или выявление присутствия, локализации или изменения указанного одного или более чем одного экзогенного компонента после воздействия на продукт H2Stem.

Клетки H2Stem и потомство H2Stem на высоком уровне экспрессируют ферменты и другие печеночно-специфические белки, для которых известно, что они метаболизируют большинство химических соединений, которые являются уже зарегистрированными лекарственными средствами, лекарственными средствами-кандидатами, которые все еще разрабатываются и проходят доклиническую оценку в отношении печеночно-специфических эффектов, или любое другое химическое соединение, для которого подозревают, что оно имеет печеночно-специфические эффекты, которые могут быть нежелательными (т.е. для гепатотоксического соединения) или желательными (если клетки H2Stem и потомство H2Stem экспрессируют фермент и другой специфичный для печени белок, который сам известен в качестве мишени лекарственных средств-кандидатов для специфического или неспецифического для печени заболевания, такого как рак, и данное соединение может тогда рассматриваться в качестве лекарственного средства-кандидата для такого заболевания).

В целом, клетки H2Stem или потомство H2Stem в форме клеток, экстракта клеток или кондиционированной среды, полученной от клеток H2Stem или потомства H2Stem, можно оценивать на стадии (в), приведенной выше, для оценки метаболизма, выведения и токсикологии химических соединений, неорганических соединений, биологических соединений, бактерий, вирусов или клеток путем анализа общих характеристик, таких как морфология или жизнеспособность клеток (например, в анализах цитотоксичности). Однако могут быть включены альтернативные или дополнительные критерии, такие как повышающая или понижающая регуляция специфичных (или неспецифичных) для печени белков или любое изменение (например, деградация, агрегация, активация или ингибирование) белков в продукте H2Stem (например, в клетках H2Stem, потомстве H2Stem или экстракте клеток, или в кондиционированной среде, полученной от клеток H2Stem или потомства H2Stem).

В качестве альтернативы (или в комбинации в критериями, оцениваемыми для клеток H2Stem или потомства H2Stem и полученных биологических материалов), стадия (в) может включать анализ того, как этот один или более чем один экзогенный компонент был интернализирован и/или модифицирован или не интернализирован и/или модифицирован клетками H2Stem или потомством H2Stem и полученными биологическими материалами. Данные аналитические критерии варьируют согласно типу экзогенных компонентов, как описано в литературе, например, деградация, связывание с другими белками, сохранность в культуре клеток, агрегация, инфекционность (для вирусов) или дифференциация или жизнеспособность (для клеток).

Литература по анализам *in vitro*, включающим клетки и производные продукты (т.е. экстракты клеток, кондиционированные среды), может давать руководство по тому, как клетки H2Stem или потомство H2Stem в форме клеток, композиций и производных биологических материалов (т.е. продуктов H2Stem) могут использоваться *in vitro*, как показано на стадиях (а)-(в), например, относительно концентрации,

временных характеристик, условий культивирования и анализа, и аналитических технологий. Аналогичные анализы также можно проводить путем введения клеток H2Stem или потомства H2Stem в животных на стадии (а) и затем путем введения одного или более чем одного экзогенного компонента животным на стадии (б) для определения, на стадии (в), модифицирует ли и как модифицирует указанный один или более чем один компонент клетки H2Stem или потомство H2Stem (или родственные биологические материалы) и/или модифицируется клетками H2Stem или потомством H2Stem у данных животных.

Продукты H2Stem, в частности клетки H2Stem и потомство H2Stem, можно использовать для способов *in vivo* (т.е. для терапевтических применений таких клеток) и *in vitro* (например, для фармакотоксикологических применений), включающих химические или биологические продукты, описанные выше, в пределах набора, как описано выше. В частности, данный набор может включать, помимо таких клеток (или производных биологических материалов), дополнительные элементы, которые позволяют использовать и/или выявлять их и их активности, когда они подвергаются воздействию набора соединений (образующихся в результате по меньшей мере одного изменения в структуре, метаболите и/или концентрации соединения, подлежащего тестированию), а также контрольные соединения, растворы и/или другие клетки, которые помогли бы сравнивать и оценивать эффекты, которые наблюдаются в анализах, включающих применение клеток H2Stem и потомства H2Stem.

Характеристика химических соединений в качестве лекарственных средств-кандидатов во время доклинической оценки требует (помимо оценки эффективности, безопасности или фармакокинетики) оценки метаболизма лекарственного средства для идентификации релевантных метаболических путей, а также потенциальных взаимодействий лекарственное средство-лекарственное средство (с зависимой от цитохрома P450 индукцией и ингибированием). Данная информация является существенной для фармацевтической промышленности при решении по переводу лидирующего соединения в клиническую фазу разработки. Срочно нужны инновационные, надежные, прогностические анализы на основе клеток *in vitro* для ранней доклинической разработки, так как до сих пор большая доля лекарственных средств-кандидатов дает неудовлетворительные результаты во время клинической разработки из-за неадекватной токсикологической оценки, в частности, в отношении гепатотоксичности.

На сегодняшний день такие модели на основе клеток основаны либо на человеческих первичных гепатоцитах, либо на линиях клеток, происходящих из гепатомы грызуна или человека (таких как клетки HepaRG или HepG2). Ни одна из доступных моделей не является полностью удовлетворительной для регулярного фармакологического и токсикологического тестирования. Применение человеческих гепатоцитов ограничено и по количественным, и по качественным причинам из-за их ограниченной доступности и технических сложностей в установлении надежных источников и долговременном поддержании их печеночной функциональности в культуре.

В качестве альтернативы, модели на основе гепатоцитов, которые основаны на клетках, происходящих от грызунов, не обеспечивают оптимальное отображение метаболизма в человеческой печени. Таким образом, при нахождении в культуре, данные клетки могут быстро дедифференцироваться (постепенно теряя их ключевые характеристики, такие как ферменты, метаболизирующие лекарственные средства) и имеют короткую продолжительность жизни (не размножаются *in vitro*). Линии клеток, происходящие из человеческой гепатомы, можно легко размножить *in vitro*, но у них отсутствует полностью дифференцированный фенотип, который может быть важен в определении метаболизма и токсичности. Надежная высокопроизводительная оценка субхронической и хронической токсичности, следовательно, не может быть проведена с использованием доступных моделей на основе человеческих гепатоцитов. Скрининг острой и подострой токсичности, с другой стороны, затруднен ограниченной доступностью человеческих гепатоцитов и их неспособностью к размножению.

Следовательно, клетки H2Stem и потомство H2Stem (в частности, при образовании трехмерных кластеров клеток) могут обеспечить более хорошие модели *in vitro*, включающие непрерывно образующиеся и легко доступные клетки с ограниченной изменчивостью в гепатоцитоподобном паттерне ферментов, стабильном с течением времени в культуре и от партии к партии, в частности, в качестве альтернативы клеткам первичных гепатоцитов в анализах "ADMET" (введение, распределение, метаболизм, выделение и токсикология) или цитотоксичности (т.е. по жизнеспособности гепатоцитов и/или функциональной эффективности).

Клетки H2Stem и потомство H2Stem (в частности, при образовании трехмерных кластеров клеток) можно использовать в способах тестирования агентов для лечения инфекций печени или для обеспечения эффективной репликации вируса, который инфицирует печень и, в частности, гепатоциты. Клетки H2Stem и потомство H2Stem могут быть дифференцированными и/или генетически модифицированными до или после воздействия вируса (например, вируса гепатита). Затем инфицированную популяцию клеток, используемую для очистки вирусных частиц, можно подвергать воздействию заданного количества соединения-кандидата для лечения инфекции для наблюдения любого полезного влияния (например, на репликацию вируса) или использовать для оценки любого потенциального эффекта вирусной инфекции *in vivo*, как показано для других клеток-предшественников печени в связи с инфекцией гепатитом С, фиброзом печени или карциногенезом (Wu X et al., 2012; Wang C et al., 2012; Torres DM and Harrison SA, 2012).

Информация по всем ссылкам, на которые здесь дается конкретная ссылка, является включенной посредством ссылки. Изобретение теперь будет проиллюстрировано посредством следующих примеров, которые не ограничивают объем изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1. Получение и характеристика клеток H2Stem и потомства клеток H2Stem из первичных тканей печени.

Материалы и методы

Среды и другие материалы для культуры клеток.

Использовали следующие материалы: среда Вильямса E (кат. № 22551022, Invitrogen), DMEM с высокой концентрацией глюкозы (4,5 г/л) и L-глутамином (DMEM с высокой концентрацией глюкозы, кат. № 41965047, Invitrogen), IMDM (кат. № 21980032, Invitrogen), IMDM без фенолового красного (кат. № 21056023, Invitrogen), культуральная среда для гепатоцитов (HCM; кат. № CC-3198, Lonza), фетальная бычья сыворотка (FBS, кат. № F7524, Sigma), рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста (EGF; кат. № AF-100-15, Peprotech), рекомбинантный человеческий фактор роста гепатоцитов (HGF; кат. № 100-39, Peprotech), рекомбинантный человеческий онкостатин M (OSM; кат. № 300-10, Peprotech), рекомбинантный человеческий инсулин (INS; кат. № HI0219, Lilly), добавка инсулина-трансферрина-селена G (ITS; кат. № 41400045, Invitrogen), человеческий альбумин (50 г/л, кат. № 1501466 Baxter), гепарин натрия (Heparin LEO®), дексаметазон (Dex; кат. № D4902, Sigma), жидкий пенициллин/стрептомицин (P/S; кат. № 15070063, Invitrogen), колбы T-75, покрытые коллагеном I хвоста крысы (Bioscoat, кат. № 356485, BD Biosciences), 75 см² прямоугольная колба для культуры клеток с искривленным горлом с вентилируемой крышкой Corning® CellBIND® (кат. № 3290, Corning).

Получение первичных клеток печени человека.

Методика получения клеток печени человека основана на предыдущих публикациях (Najimi M et al., 2007) с небольшими модификациями. После удаления печень сперва промывали ледяным раствором ViaSpan (Bristol-Myers Squibb Pharmaceuticals) через катетеры, присоединенные к системе портальной вены и затем переносили в холодных и стерильных условиях в чистую комнату для выделения клеток печени. Все микробиологическое загрязнение строго контролировалось до, во время и после процесса выделения. Выделение клеток печени человека проводили с использованием методики двухэтапной перфузии с коллагеназой под стерильным ламинарным током в чистых комнатах. Первая перфузия состояла из предварительно нагретого до 37°C раствора EBSS без кальция и без магния (кат. № 14155-063, Life Tech), дополненного 0,5 мМ этиленгликоль-бис(2-аминоэтилэфир)-N,N,N',N'-тетрауксусной кислотой (EGTA; Sigma), 2 мг/л гентамицина, 100000 UI (международная единица)/л пенициллина G. Эта первая перфузия обеспечивает устранение внеклеточного ионного кальция и ослабление межклеточных соединений паренхимы. Вторая стадия включала ферментативное расщепление 0,8 мг/мл коллагеназой (кат. № 11213857001, Roche Applied Sciences), разведенной в растворе EBSS с кальцием и с магнием (кат. № 24010-043, Life Tech.), дополненным 5 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислотой (HEPES; кат. № 11344-041, Life Tech.), 0,03 мг/мл ингибитора трипсина (кат. № 10109878001, Roche Applied Sciences), 2 мг/л гентамицина и 100000 UI/л пенициллина G. Состав данных буферов можно адаптировать к актуальным требованиям надлежащих производственных процессов путем применения дополнительных или альтернативных реактивов класса GMP (например, специфичных ферментов или N-ацетилцистеина).

Каждая стадия перфузии занимала приблизительно 10 минут до полного расщепления печени и затем механического разрушения. Остаточную коллагеназную активность останавливали промывкой расщепленной паренхимы холодным раствором M199 (Lonza), содержащим 27,5 мкг/мл ингибитора трипсина, 0,05% человеческого альбумина, 2,4 мг/л гентамицина, 100000 UI/л пенициллина G. Суспензию клеток расщепленной печени фильтровали через сетку из нержавеющей стали с размером пор от 4,75 до 0,25 мм, затем промывали 3 раза раствором M199 и центрифугировали при низкой скорости (например, 1200 об./мин) в течение 3 минут при 4°C для удаления обломков клеток и большинства непаренхиматических клеток. Клетки суспендируют в криоконсервирующей среде, которую получают добавлением 750 мл раствора ViaSpan, 16 мг дексаметазона, 40 UI инсулина, 0,5% HEPES, 1 г/л глюкозы, 15%, 20% человеческого альбумина, 10% DMSO, и затем поддерживают в жидком азоте, используя подходящие сосуды, мешки или другие системы для длительного хранения и консервации человеческих клеток. Также на данной стадии состав этих буферов может быть адаптирован к реальным требованиям надлежащих производственных процессов посредством применения дополнительных или альтернативных реактивов уровня качества GMP.

Образующиеся препараты клеток печени преимущественно состоят из гепатоцитов из паренхиматической фракции, причем каждая содержит 10⁶-10⁹ клеток (в зависимости от объема препаратов и/или конкретной человеческой печени). Суспензии криоконсервированных клеток печени используют, быстро оттаивая их при 37°C, и промывая их дважды в 10× объеме 5%-го человеческого альбумина, дополненного 2,5 г/л глюкозы, 0,084 г/л бикарбоната и 5000 IE/UI/мл гепарина LEO®. После центрифугирования при 224 г в течение 10 минут при 4°C клеточный осадок суспендируют в требующейся среде для культуры

клеток.

Получение клеток ADHLSC.

Клетки ADHLSC получают применением описанного ранее способа (Najimi M et al., 2007; Khuu DN et al., 2011) с небольшими модификациями или без них. Кратко, препараты клеток печени ресуспендируют в среде Вильямса Е, дополненной 10% FBS, 25 нг/мл EGF (EGF может отсутствовать в среде для культуры клеток, если получение проводят на CellBind), 10 мкг/мл INS, 1 мкМ DEX и 1% P/S. Клетки культивируют либо в колбах, покрытых коллагеном I из хвоста крысы, либо в колбах Corning® Cell-BIND®, и культивируют при 37°C в полностью увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Через 24 часа среду заменяют для удаления неприкрепившихся клеток и затем обновляют дважды в неделю при ежедневном микроскопическом отслеживании культуры. Производят переключение культуральной среды через 12-16 суток на DMEM с высоким содержанием глюкозы, дополненную 9% FBS и 0,9% P/S для того, чтобы ускорить устранение гепатоцитов и стимулировать размножение клеток ADHLSC. Появляется и пролиферирует тип клеток с мезенхимоподобной морфологией. При достижении конfluenceности 70-95% клетки трипсинизируют рекомбинантным трипсином (trypLE; LifeTech) и 1 мМ EDTA и повторно высаживают при плотности 1-10 × 10³ клеток/см².

Получение клеток H2Stem.

Суспензии криоконсервированных клеток печени используют для получения культур клеток на колбах T-75, покрытых коллагеном I хвоста крысы, при плотностях клеток от 5000 до 20000 клеток/см² и инкубируют при 37°C в полностью увлажненной атмосфере 5% CO₂. В качестве альтернативы, в инкубаторе применяют условия гипоксии (например, 5% O₂), или они были получены добавлением в среду для культуры клеток антиоксидантных агентов (таких как N-ацетилцистеин в концентрации 1 мМ или менее). Замену среды и анализ морфологии осуществляют дважды в неделю, используя в качестве культуральных сред среду Вильямса Е, дополненную 9% FBS, 0,9% P/S, 1 мкМ Dex; 10 мкг/мл INS и 12,5-25 нг/мл EGF, на протяжении фазы появления. Как только клетки H2Stem появлялись в виде кластеров прикрепленных клеток, которые преобладают в культуре клеток, осуществляется дальнейшее размножение в среде Вильямса Е, дополненной 9% FBS, 0,9% P/S, 1 мкМ Dex; 10 мкг/мл INS, 12,5-25 нг/мл EGF в отсутствие или в присутствии (12,5-50 нг/мл) HGF.

Клетки H2Stem, имеющие кубовидную мезо-эпителиальную морфологию, появляются в виде маленьких кластеров и начинают размножаться в пределах следующих 7-12 суток. Кластеры, образованные такими клетками, затем трипсинизируют в пределах следующих 2-3 суток (то есть, в пределах 10-15 суток после посева первичных клеток печени) и затем культивируют при плотности 5000-8000 клеток/см² в среде на основе среды Вильямса Е в течение нескольких пассажей в одинаковой среде. Трипсинизацию можно осуществлять с пассажа 1 и далее при конfluenceности 80-90% на чашках, покрытых коллагеном.

Дифференциация клеток в виде прикрепленных гепатоцитоподобных клеток.

Клетки культивируют на 6-луночных планшетах, покрытых коллагеном типа I - BD BioCoat Cellware (кат. № 356400, BD Biosciences) при плотности 5000-20000 клеток/см² в такой же среде для размножения. Печеночная дифференциация начинается при конfluenceности 95-100% посредством замены сред на IMDM, содержащую 20 нг/мл HGF, 20 нг/мл OSM, 1 мкМ Dex, 1% ITS с (для клеток ADHLSC) или без (для клеток H2Stem) 25 нг/мл EGF. Эта среда для культуры клеток для печеночной дифференциации (среда HepDif) заменяется дважды в неделю на протяжении по меньшей мере следующих 2 (для клеток H2Stem) или 4 (для клеток ADHLSC) недель.

Морфологическая характеристика клеток в условиях культуры клеток.

Изображения получают с помощью световой микроскопии (метод фазового контраста; микроскоп Olympus UC30) с использованием камеры Olympus IX50 и программы для цифровой визуализации CellSens или с использованием оборудования для прижизненной визуализации Cell-IQ (CM technologies), где световой микроскоп получает повторно сфокусированное изображение того же самого участка с регулярными интервалами времени. Cell-IQ PC (фазовый контраст) представляет собой полностью интегрированную платформу для непрерывной прижизненной визуализации клеток и анализа, включающую возможность визуализации в режиме фазового контраста и светлого поля со встроенным программным пакетом Analyser (Machine Vision Technology) для автоматической идентификации, анализа и количественной оценки визуальных данных.

Характеристика генов, экспрессируемых популяциями клеток, с использованием кПЦР-ОТ.

Общую РНК экстрагируют из клеток с использованием набора для млекопитающих GenElute (кат. № RTN70, Sigma) после обработки ДНКазой из набора DNA-free™ (кат. № AM1906, Ambion). Первая нить кДНК синтезируется с использованием набора для синтеза первой нити кДНК Transcriptor (кат. № 04379012001, Roche) согласно инструкциям изготовителя и затем разводится водой, не содержащей нуклеазы (кат. № AM9938, Invitrogen), до концентрации кДНК 10 нг/мкл. Амплификационные смеси (20 мкл) ПЦР-ОТ содержат 0,2 мкг матрицы кДНК, 10 мкл мастер-микса 2×Taqman (кат. № 4369514, Applied Biosystem) и 1 мкл 20× смеси для анализа кПЦР PrimeTime (IDT).

Образцы прогоняли в двойной повторности на системе ПЦР в реальном времени ViiA™ от Applied Biosystems или на любом другом циклере для ПЦР в реальном времени от Applied Biosystems. Условия

циклирования являются следующими: 10 мин активации полимеразы при 95°C, 40 циклов при 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 45 с. Специфичные для транскрипта гена пары последовательностей праймеров были получены от Applied Biosystems, как обобщено в табл. 1, приведенной ниже.

Человеческий ген	Последовательности праймеров (регистрационный номер ABI)	Длина ампликона
CYP3A4	Hs00604506_m1	119
CYP2C9	Hs00426397_m1	148
CYP1A2	Hs00167927_m1	67
CYP2C19	Hs00426380_m1	106
CYP2D6	Hs02576167_m1	85
CYP2B6	Hs03044633_m1	136
ОТС	Hs00166892_m1	95
UGT1A1	Hs00153559_m1	65
Альбумин	Hs00910225_m1	137
Виментин	Hs00185584_m1	73
HNF-4	Hs00230853_m1	49
HNF-3b	Hs00232764_m1	66
PPIA	Hs99999904_m1	98
GAPDH	Hs99999905_m1	122

Относительное количественное измерение экспрессии генов устанавливали путем нормирования интенсивности сигнала относительно транскриптов эндогенного контроля GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) или PPIA (циклофилин А). После нормирования данные откладывали на графике и сравнивали среди популяций клеток.

Характеристика клеток посредством проточной цитометрии.

Клетки отбирают, суспендируют при концентрации 500-1000/мкл в буфере PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) (кат. № SH30028.03, Thermo Fisher) и инкубируют в течение 30 мин при 4°C со следующими антителами, меченными флуорохромом, специфичными в отношении указанных антигенов, которые используются в концентрации, указанной производителями: CD45-PE Cy7 (кат. № 557748, BD Biosciences), CD90-FITC (кат. № 555595, BD Biosciences), CD73-PE (кат. № 550257, BD Biosciences), CD29-APC (кат. № 559883, BD Biosciences), CD44-FITC (кат. № 555478, BD Biosciences), CD133-PE (кат. № 130080901, Miltenyi Biotec), альбумин-FITC (кат. № CLFAG2140, Sanbio), моноклональное мышинное антитело против человеческого цитокератина 19 (СК-19) (Клон RCK108; M0888, Dako), антитело против мышинного IgG - DyLight 488 (кат. № 715-485-150, Jackson ImmunoResearch), CD117-APC (кат. № 333233, BD Biosciences), CD31-FITC (кат. № 555445, BD Biosciences), CD31-PE (кат. № 340297, BD Biosciences), CD326 (кат. № 347200, BD Biosciences). Соответствующие контрольные изотипические антитела используются для оценки неспецифичного связывания моноклональных антител. Клетки затем промывают и суспендируют в PBS/BSA для считывания проточным цитометром FACSCanto II от BD Biosciences.

Характеристика клеток посредством иммунофлуоресценции или посредством иммуноцитохимии.

Клетки фиксируют 4% параформальдегидом (кат. № 43368, Alfa Aesar) при комнатной температуре в течение 10-15 мин и промывают PBS три раза. При необходимости устраняется эндогенная пероксидаза посредством 10-минутной инкубации с 3%-ным пероксидом водорода (кат. № 31642, Sigma). Затем клетки пермеабилзируют в течение 10-15 минут с использованием 1% Triton X-100 (кат. № T8787, Sigma) в буфере PBS. Неспецифичное иммуноокрашивание предотвращается 1-часовой инкубацией в буфере PBS, содержащем 5% нормальной сыворотки осла (кат. № 017-000-121, Jackson ImmunoResearch), для иммуноцитохимии или 1-часовой инкубацией при 37°C в буфере PBS, содержащем 5% бычьего сывороточного альбумина (BSA) (кат. № A2153, Sigma) для иммунофлуоресценции. Инкубацию с первичным антителом проводят в течение 1 ч при комнатной температуре (или в течение ночи при 4°C). Образцы затем промывали три раза в течение 15 мин и инкубировали со вторичным антителом в течение 30 минут (для иммуноцитохимии) или в течение 1 ч (для иммунофлуоресценции) при комнатной температуре.

Для иммуноцитохимии или иммунофлуоресценции использовали следующие антитела в качестве первичного антитела согласно инструкциям изготовителя: моноклональное мышинное антитело против человеческого сывороточного альбумина (кат. № A6684, Sigma), моноклональное мышинное антитело против человеческого виментина (кат. № 10515, Progen), моноклональное мышинное антитело против человеческого альфа-актина гладких мышц (ASMA, кат. № M0851, Dako), моноклональное мышинное антитело против человеческого цитокератина 19 (СК-19) (клон RCK108; M0888, Dako), моноклональное мышинное антитело против человеческого антитела TDO2 (кат. № SAB1406519, Sigma), моноклональное мышинное антитело против человеческого антитела СК-18 (кат. № SAB3300015, Sigma), моноклональное антитело против человеческого антитела UGT (кат. № ab129729, Abcam), моноклональное антитело против человеческого MRP-2 (кат. № ab3373, Abcam), антитело против человеческого гепатоцитарного ядерного фактора 4 (HNF-4; кат. № sc-8987, Santa Cruz) и поликлональное мышинное антитело против человеческого CYP3A4 (кат. № SAB1400064, Sigma).

Следующие меченые антитела использовали в качестве вторичных антител для иммунофлуоресценции согласно инструкциям изготовителя: антитело осла против мышинного IgG, конъюгированное с Alexa Fluor®488 (кат. № 715-545-151, Jackson ImmunoResearch), антитело осла против кроличьего IgG, конъюгированное с Cy3 (кат. № 711-165-152, Jackson ImmunoResearch). Для иммуноцитохимии выявление осуществляется с использованием Envision™ против мышинного антитела (Dakocytomation, кат. № K4001, Dako) при комнатной температуре в течение 30 мин. Выявление осуществляется после инкубации в течение 5 мин с использованием полимера, меченного пероксидазой, и субстрата-хромогена (DAB, кат. № D416, Dako), с последующей промывкой PBS три раза. Ядра контрастно окрашивали с использованием 4,6-диамидино-2-фенилиндола (Vectashield®+DAPI, кат. № H-1200, ABCYS) для иммунофлуоресценции или гематоксилином Мейера (кат. № MHS16, Sigma) для иммунохимии. Клетки заключали в среду для иммуноцитохимии и затем проверяли при 10, 20 и 40x увеличении с использованием инвертированного микроскопа Olympus IX50, соединенного с камерой UC30. Цифровые изображения получали с использованием программы Cellsens. Человеческие первичные гепатоциты (полученные, как указано выше) окрашивали параллельно в качестве позитивного контроля в отношении печеночных маркеров и негативного контроля в отношении мезенхимальных маркеров. Изображения получали с помощью флуоресцентного микроскопа (Olympus AX70), оснащенного камерой Olympus XC30, и с использованием программы Cellsens.

Характеристика клеток по биологическим активностям Для люминисцентного анализа активности CYP3A4 дифференцированные гепатоцитоподобные клетки, полученные из клеток ADHLSL или клеток H2Stem, трипсинизировали, переносили в 96-луночные микропланшеты (кат. № 734-1662, Costar) в концентрации 100000 клеток/луночку, и измеряли активность с использованием анализа CYP3A4 P450-G10™ с люциферин-IPA (кат. № V9002, Promega). Люминисценция измеряется с использованием люминометра Victor IV (Perkin-Elmer Life Sciences). Необработанные клетки измеряются параллельно для вычитания фонового шума. Результаты нормируются к стандартным микросомам CYP3A4, которые предоставлены ферментативной системой человеческого CYP3A4 (кат. № V4820, Promega) и рассчитываются как пико-моли/клетку.

Для анализа секреции мочевины клетки трипсинизируют и инкубируют в IMDM без фенолового красного (кат. № 21056023, Invitrogen) в покрытых коллагеном 48-луночных микропланшетах (кат. № 356505, BD Biosciences). В качестве субстрата для усиления секреции мочевины в культуральную среду добавляют 1 mM орнитин (кат. № 02375, Sigma) и 5 mM NH₄Cl (кат. № A0171, Sigma). Через 2-24 ч секрецию мочевины измеряют с использованием колориметрического набора для анализа мочевины QuantiChrome (кат. № DIUR-500, BioAssay Systems). Интенсивность окрашивания (пропорциональную концентрации мочевины в образце) считывают при 520 нм после 5-20 мин инкубации, и она является прямо пропорциональной концентрации мочевины в образце. Общее содержание мочевины (мг/дл) в супернатанте культуры рассчитывается с использованием стандартной кривой мочевины, полученной в IMDM без фенолового красного, как рекомендовано инструкциями изготовителя, перед установлением количества секретируемой мочевины в виде пг/клетку/2-24 ч. Для оценки любого мешающего влияния при выявлении реального сигнала, оценка секреции мочевины проводится на средах, включающих орнитин/хлорид аммония и клеточные контроли, инкубированные без орнитина/хлорида аммония. Данные образцы служат в качестве негативного контроля для определения специфичности и предотвращения ложной позитивности.

Для анализа конъюгирования билирубина клетки инкубируют с 20-50 мкМ неконъюгированного билирубина (кат. № B4126, Sigma). Конъюгирование билирубина и общее содержание билирубина измеряется через 2-24 часа с использованием колориметрического прямого анализа билирубина (кат. № DZ151A-K, Diazyme) и анализа общего билирубина (кат. № DZ150A-K, Diazyme). В данном анализе (не)конъюгированный билирубин смешивают с готовым к применению реактивом от Diazyme, содержащим детергент и ванадат или только ванадат (pH 3), после чего общий или конъюгированный билирубин в образце окисляется до биливердина соответственно. Последнее окисление приводит к уменьшению поглощения, специфичному для билирубина. Концентрацию общего/конъюгированного билирубина в образце можно определять измерением поглощения до и после окисления ванадата. Концентрацию конъюгированного/общего билирубина (мг/дл/клетку/2-24 ч) в супернатанте культуры затем рассчитывают относительно стандартной кривой калибратора - билирубина, полученной в IMDM без фенолового красного, как рекомендовано инструкциями изготовителя. Для оценки любого мешающего воздействия проводится оценка конъюгирования билирубина на средах, включающих 20-50 мкМ билирубина и клеточные контроли, инкубируемые без билирубина. Данные образцы служат в качестве негативного контроля для определения специфичности и предотвращения ложной позитивности.

Результаты

Клетки ADHLSL и клетки H2Stem представляют собой популяции клеток, которые обе могут происходить из препаратов криоконсервированных первичных человеческих клеток печени, которые получают с использованием нормальной зрелой человеческой печени. Однако отличаются протокол их получения из препарата первичных клеток человеческой печени и последующая методика размножения в

культуре клеток, в частности, при применении коллагена (или другого подходящего субстрата) для адгезии и роста в условиях культуры клеток (более подробно см. Материалы и методы). В пределах 7-12 суток после посева спонтанно появляются кластеры клеток, имеющих кубовидную мезо-эпителиальную морфологию, демонстрирующих большую и прозрачную цитоплазму без выпячиваний, развивающих межклеточные контакты и демонстрирующих контактное ингибирование роста. Клетки H2Stem, имеющие кубовидную мезо-эпителиальную морфологию, пролиферируют в кластерах или колониях и примерно через 2-3 суток после появления могут быть трипсинизированы и пассированы при плотности 5000-20000 клеток/см². Данные характеристики отличают клетки H2Stem от больших, появляющихся позднее удлинённых клеток ADHLSC, описанных в Najimi et al. 2007 (фиг. 2А).

По сравнению с клетками ADHLSC, которые культивируются либо на CellBind, либо на подложках, покрытых коллагеном (например, на чашках, в колбах), клетки H2Stem растут с большей скоростью пролиферации и могут быть предпочтительно идентифицированы в культуре клеток и размножены. Время удвоения популяции (PDT) для клеток ADHLSC составляет примерно 72-96 ч, тогда как клетки H2Stem демонстрируют PDT, равное 48-72 ч, и быстро размножаются в течение по меньшей мере 4-5 пассажей.

В соответствии с другими человеческими клетками-предшественниками печени, такими как клетки ADHLSC, клетки H2Stem являются позитивными в отношении ряда мезенхимальных маркеров на поверхности клетки (включая CD90, CD73, CD29, CD44) или внутриклеточных (таких как виментин, AS-MA), а также в отношении печеночных маркеров (включая HNF-3В, альбумин и цитокератин 18), при оценке проточной цитометрией (где позитивность в отношении маркера определяется, когда по меньшей мере 60% клеток демонстрируют данную характеристику), иммуноцитохимией и/или анализом ПЦР-ОТ. Как клетки ADHLSC, так и клетки H2Stem экспрессируют очень низкий уровень (т.е. меньше, чем 15% протестированных клеток и, главным образом, меньше, чем 10% демонстрируют специфичное окрашивание) маркеров поверхности клетки для других клеточных линий (гематопозитических, эпителиальных и/или эндотелиальных), таких как CD45, CD117, CD31, CD133 и CD326.

Однако клетки H2Stem также можно отличать от клеток ADHLSC путем сравнения присутствия внутриклеточных маркеров. Например, цитоскелетный компонент, такой как цитокератин 19 (СК-19; маркер эпителия холангиоцитов) практически не выявляется в клетках ADHLSC и гепатоцитах (Najimi M et al., 2007). В клетках H2Stem (даже на исходной стадии при появлении в культуре клеток) обнаруживается экспрессия СК-19 в процентной доле клеток H2Stem, составляющей от 20 до 40% при оценке проточной цитометрией, причем данное различие не может быть определено как негативность, и которое согласованно воспроизводится среди препаратов клеток H2Stem. На самом деле, при оценке экспрессии СК-19 посредством иммуноцитохимии (обычно более чувствительная методика выявления внутриклеточных белков, чем проточная цитометрия) очевидно, что СК-19 экспрессируется значительным большинством H2Stem даже на ранних стадиях (фиг. 2Б), таким образом, обеспечивая дополнительный маркер, который может быть использован для различения и отслеживания популяций клеток H2Stem и потомства H2Stem на протяжении всего процесса их получения в культуре клеток.

Выявление СК-19 может быть ассоциировано с выявлением других внутриклеточных белков, таких как транскрипционные факторы, и, в частности, тех белков, которые ассоциированы с функциями печени, прямо (посредством ПЦР-ОТ или способов на основе антител) или опосредованно (на основе координированной экспрессии генов, специфичных для печени). Этим способом клетки H2Stem были охарактеризованы как более сильно экспрессирующие транскрипционные факторы, подобные HNF-3b и HNF-4, по сравнению с клетками ADHLSC. На внутриклеточном уровне данные транскрипционные факторы находятся среди самых важных для получения морфологического, фенотипического и функционального созревания гепатоцитов, например, путем активации экспрессии и печеночных сывороточных белков (таких как альбумин и альфа-1-антитрипсин), и ферментов для (не)метаболических функций (Snykers S et al., 2009), которые могут быть выявлены в клеточных экстрактах или непосредственно в супернатантах культуры клеток для оценки присутствия клеток H2Stem.

Также может отслеживаться появление клеток H2Stem во время исходной стадии процесса получения клеток H2Stem с идентификацией того, какие первичные клетки печени человека могут давать кластеры прикрепленных пролиферирующих клеток H2Stem, имеющих отличную морфологию, и которые могут быть проанализированы посредством анализа иммунофлуоресценции или иммуногистохимией (Фиг. 3).

Дополнительные характеристики, отличающие клетки ADHLSC и клетки H2Stem, могут быть установлены во время или после дифференциации данных популяций клеток *in vitro*, в частности, в направлении прикрепленных гепатоцитоподобных клеток. При сравнении процесса дифференциации клеток H2Stem с процессом дифференциации клеток ADHLSC для последних клеток требуется больше времени (один месяц по сравнению с 1-2 неделями для клеток H2Stem), а также EGF в среде для культуры клеток. Кроме того, морфология гепатоцитоподобных клеток, которые генерируются с использованием двух типов клеток, отличается, где клетки, полученные из клеток H2Stem (потомство H2Stem, также именуемое клетки H2Screen; см. фиг. 1), демонстрируют характеристики, более сходные с характеристиками метаболически активных первичных гепатоцитов. Клетки H2Screen принимают кубовидную гепатоцитоподобную морфологию с одно- и двухядерными клетками, имеющими внутриклеточную гранулярность,

указывающую на повышенные ферментативные активности (фиг. 4А).

Печеночно-специфические метаболические активности клеток H2Stem можно сравнивать с активностями других клеток-предшественников зрелой печени (таких как клетки ADHLSC) путем измерения деградации соединений, которые накапливаются в печени, и которые могут быть гепатотоксическими и ассоциированы с заболеваниями печени при неэффективном метаболизме гепатоцитами. Данный анализ представляет интерес не только для оценки применения клеток для клинических приложений, но также и для обнаружения и разработки лекарственных средств в фармацевтической промышленности, поскольку индуцированная лекарственным средством гепатотоксичность является одной из самых важных причин для выбывания лекарственных средств-кандидатов на последних стадиях разработки лекарственного средства. Эффект воздействия разных индукторов CYP450 на ответы экспрессии генов и CYP450-специфичные ферментативные активности часто измеряют в разных моделях на основе клеток печеночного происхождения для различения между потенциально гепатотоксическими и негепатотоксическими соединениями перед введением таких соединений *in vivo*, но ни одна из исследуемых моделей не удовлетворяет всем критериям для раннего, надежного и точного выявления гепатотоксических соединений (Gerets NN et al., 2012).

В частности, печеночный CYP3A4 способствует метаболизму почти 50% используемых в настоящее время лекарственных средств, а также эндогенных и экзогенных кортикостероидов. Фермент CYP3A4 сильно экспрессируется в гепатоцитах в зрелой печени, и приобретение функциональности CYP3A4 считается важным критерием гепатогенной дифференциации и созревания. Иммуноцитохимия и ПЦР-ОТ уже показывают, что экспрессия CYP3A4 значительно сильнее в клетках H2Stem, чем в клетках ADHLSC (то есть, уже до любой специфичной для печени дифференциации), причем данное открытие также было подтверждено на уровне активности. Клетки H2Stem демонстрируют такую специфичную активность в интервале 10^{-8} пмоль/клетку/4 ч (уже намного больше границы выявления, составляющей 10^{-9} пмоль/клетку), но возрастающую в интервале 10^{-7} пмоль/клетку/4 ч после дифференциации *in vitro* в клетки H2Screen, где клетки ADHLSC демонстрируют активность, превышающую 10^{-8} пмоль/клетку/4 ч только после дифференциации (фиг. 4Б).

Это сравнение специфичных для печени метаболических активностей между клетками H2Stem и клетками ADHLSC с дальнейшей специфичной для печени дифференциацией *in vitro* или без нее можно проводить с использованием других индикаторов метаболической активности, которую можно оценивать с использованием имеющихся в продаже наборов или с помощью методик, которые описаны в литературе (как в случае с CYP1A2-, CYP2C19-, CYP2C9-, CYP2E1- или CYP2D6-специфичной экспрессией мРНК и/или ферментативной активностью). В частности, для клеток H2Stem наблюдали сильную повышающую регуляцию экспрессии CYP1A2, CYP2C9 и CYP2E1. Данные сведения были подтверждены при сравнении клеток H2Screen с дифференцированными клетками ADHLSC и также распространялись на экспрессию генов других ферментативных активностей, специфичных для печени (таких как орнитин-транскарбамиллаза, CYP2D6 или CYP2C19).

В случае секретиции мочевины (другая важная метаболическая активность, специфичная для печени), клетки H2Screen оказываются способными синтезировать мочевины в присутствии субстратов (хлорида аммония и орнитина) с существенно более высокими метаболическими свойствами по сравнению с дифференцированными клетками ADHLSC. Клетки H2Screen показывают улучшение данной активности, соответствующее более чем 1 log, и демонстрируя присутствие очень специфичной и интегрированной печеночной функциональности в данных клетках (Фиг. 4В).

Иммуногистохимия также подтверждает, что по сравнению с клетками H2Stem, сильная внутриклеточная экспрессия СК-19, СК-18 и некоторых печеночных маркеров (таких как альбумин, TDO2 и УДФ-глюкуронозилтрансфераза), поддерживается, или даже дополнительно возрастает, в клетках H2Screen, которые также демонстрируют экспрессию главного выводящего белка-транспортера, такого как белок MRP-2, на поверхности контакта клетка-клетка, причем данная характеристика имеет главное значение для оценки токсичности, индуцированной лекарственным средством, связанной с полиморфизмом транспортера (фиг. 4Г).

Качественно сходные доказательства были получены при сравнении способности дифференцированных клеток ADHLSC и клеток H2Screen к конъюгации билирубина, другой специфичной для печени биологической активности, обусловленной экспрессией гена UGT1A1. Клетки H2Screen демонстрируют значительно более высокую активность, возможно из-за более сильной экспрессии и/или повышенной ядерной локализации транскрипционных факторов, таких как HNF-3b и HNF-4. В дифференцированных клетках ADHLSC активность билирубина, связанная с UGT1A1, измеряется на уровне 0,05 мг/дл-0,3 мг/дл (0,5 мг/дл в качестве исключения), соответствуя конъюгации 5-35% (50% в качестве исключения) после 24-часовой экспозиции. В клетках H2Screen активность билирубина, связанная с UGT1A1, измеряется на уровне 0,2 мг/дл-0,6 мг/дл после 24-часовой экспозиции или как конъюгация 23-70%. Кроме того, при сравнении экспрессии UGT1A1 с человеческими гепатоцитами посредством ПЦР-ОТ она достигает 10% от уровня, наблюдаемого в первичных гепатоцитах, особенно высокого уровня по сравнению с клетками, которые получают путем дифференциации *in vitro* других типов клеток, происходящих от клеток-предшественников печени.

Таким образом, клетки H2Stem являются новыми клетками-предшественниками зрелой печени, которые по сравнению с другими клетками того же типа (в частности, с клетками, полученными более длительным, более сложным способом, такими как клетки ADHLSC) демонстрируют некоторые важные неожиданные преимущества в отношении разных характеристик (например, пролиферация, экспрессия специфических для типа клеток маркеров или печеночно-специфические ферментативные активности), которые делают их интересными и для клинических применений, и для фармако-токсикологических исследований.

Пример 2. Получение отдельных типов потомства H2Stem в виде трехмерных кластеров клеток.

Материалы и методы

Получение клеток H3Stem из клеток H2Stem.

Клетки H3Stem получают в колбах для культуры клеток, обеспечивающих ультранизкое связывание (Ultra-Low Attachment), путем суспендирования примерно $1-10 \times 10^6$ клеток H2Stem в 15 мл среды до их посева в колбы для культуры клеток, обеспечивающие ультранизкое связывание (75 см²; кат. № 3814; Corning).

Клетки H3Stem получают в 96-луночных микропланшетах, обеспечивающих ультранизкое связывание, путем суспендирования 5000-20000 клеток H2Stem в 0,1-0,2 мл среды и посева в лунку на 96-луночных культуральных микропланшетах, обеспечивающих ультранизкое связывание, с U-образными/круглыми лунками (кат. № 7007; Corning). В качестве альтернативы, 75000-100000 клеток H2Stem суспендируют в 2,0-3,0 мл среды и высевают в лунку 6-луночных культуральных планшетов, обеспечивающих ультранизкое связывание (кат. № 3471; Corning).

Культуральная среда предпочтительно представляет собой среду Вильямса E, дополненную 9% FBS, 0,9% P/S, 1 мкМ Dex; 10 мкг/мл INS и 12-25 нг/мл EGF в отсутствие или в присутствии (12,5-50 нг/мл) HGF. Альтернативными, имеющимися в продаже средами для культуры клеток, которые можно использовать вместо среды Вильямса E, являются IMDM или DMEM, которые дополнены, как указано выше для среды Вильямса E. Свежую среду для культуры клеток добавляют или заменяют дважды в неделю для форматов колбы и многолуночного планшета/микропланшета соответственно. После образования трехмерного потомства H2Stem следует фазоконтрастная микроскопия. Индивидуальные клетки начинают формировать данные кластеры через 24 ч, и их отбирают для измерения активности CYP3A4, для проведения иммуногистохимии или для получения клеток H3Screen-2 в пределах следующих 10-25 суток, когда они достигают размера, превышающего 200 мкм (могут быть получены кластеры клеток H3Stem, имеющие диаметр вплоть до 600 мкм).

Получение клеток H3Screen-1 из клеток H2Screen.

Клетки H2Screen, которые получают, как описано в примере 1, трипсинизируют для получения трехмерного потомства H2Stem путем поддержания данной суспензии клеток в той же самой среде, которую использовали для дифференциации клеток H2Stem в клетки H2Screen и в подходящей системе для культуры клеток. При использовании культуральной системы на основе "висячей капли", такой как 96-луночный планшет Gravity^{plus}Plate (Insphero), половину среды заменяли 2-3 раза в неделю путем отсасывания 20 мкл и добавления 20 мкл свежей среды в каждую лунку планшета. В качестве альтернативы, $1-10 \times 10^6$ клеток H2Screen высевали в колбы для культуры клеток, обеспечивающие ультранизкое связывание, добавляя 5 мл свежей среды для культуры клеток с такой же частотой. Иным образом, для получения клеток H3Stem, как описано выше, использовали 96-луночные культуральные микропланшеты, обеспечивающие ультранизкое связывание, с U-образными/круглыми лунками.

Образование клеток H3Screen-1 в данных системах культуры клеток отслеживали, получали и оценивали аналогично клеткам H3Stem.

Получение клеток H3Screen-2 из клеток H3Stem.

Клетки H3Stem, полученные при размножении, как описано выше, центрифугируют в течение 5 минут при 224 g для того, чтобы удалить среду для размножения. Затем начинается дифференциация в таких же колбах для культуры клеток, обеспечивающих ультранизкое связывание, с использованием среды для культуры клеток HepDif (см. Пример 1), добавляя 5 мл свежей среды для культуры клеток дважды в неделю. Иным образом, использовали 96-луночные культуральные микропланшеты, обеспечивающие ультранизкое связывание, с U-образными/круглыми лунками, используя такую же среду для культуры клеток для дифференциации. Печеночная дифференциация и активность CYP3A4 оцениваются в трехмерных кластерах клеток в пределах следующих 10-20 суток.

Получение клеток H3Screen-2a и клеток H3Screen-2b из клеток H3Screen-2.

Клетки H3Screen-2a соответствуют клеткам H3Screen-2, которые поддерживают в суспензии с использованием колб для культуры клеток, обеспечивающих ультранизкое связывание, 96-луночных культуральных микропланшетов с U-образными/круглыми лунками или культуральной системы на основе "висячей капли" в среде HepDif (см. пример 1).

Клетки H3Screen-2b соответствуют клеткам H3Screen-2, которые переносят в разные многолуночные форматы планшетов, покрытых коллагеном типа I, от BD BioCoat Cellware (с 6, 24 или 48 лунками). При данных условиях полигональные и гранулярные гепатоциты наблюдают в пределах 3-4 суток с мо-

мента посева и далее в среде HepDif (см. пример 1).

Получение клеток H3Screen-2 из клеток H2Stem.

Клетки H3Screen могут быть получены непосредственно из клеток H2Stem без промежуточной стадии размножения в виде клеток H3Stem. В данном случае 5000-20000 клеток H2Stem суспендируют в 0,1-0,2 мл среды HepDif (см. Пример 1) и высевают на 96-луночные культуральные планшеты, обеспечивающие ультранизкое связывание. В качестве альтернативы, 75000-100000 клеток H2Stem суспендируют в 2,0-3,0 мл среды и высевают в лунку 6-луночных культуральных планшетов, обеспечивающих ультранизкое связывание. Осуществляют дальнейшие стадии культивирования клеток, такие же, как и для получения клеток H3Stem из клеток H2Stem, поддерживая клетки в среде HepDif и наблюдая кластеры клеток H3Screen-2 аналогичного размера и через сравнимый период времени, как показано для кластеров клеток H3Stem.

Получение клеток H3Screen-2с из клеток H3Stem.

Клетки H3Screen-2с соответствуют клеткам H3Stem, которые переносят в разные многолуночные форматы планшетов, покрытых коллагеном типа I, от BD BioCoat Cellware (с 6, 24 или 48 лунками) и культивируют в среде HepDif (см. пример 1).

Иммуноцитохимия (ИНС), иммунофлуоресценция (IF) и морфологическая характеристика трехмерного потомства H2Stem.

Размер трехмерных кластеров клеток и изображения получают с помощью световой микроскопии (фазовый контраст; микроскоп Olympus UC30) с использованием камеры Olympus IX50 и программы Cellsens.

Разные типы трехмерного потомства H2Stem отбирают и затем фиксируют в течение ночи в 4% параформальдегиде (кат. № 43368, Alfa Aesar) при 4°C, затем заливают в 2%-ную агарозу (кат. № 16500, Invitrogen) при 65°C и затем в парафин. Срезы толщиной 5 мкм депарафинизируют и регидратируют в ряду растворов со ступенчато изменяющейся концентрацией спирта.

Перед осуществлением иммуногистохимии срезы инкубируют в растворе моногидрата лимонной кислоты (pH 6,0) при 97°C в течение 90 минут. Эндогенную пероксидазную активность блокируют инкубированием предметных стекол в метанольном растворе 3%-го пероксида водорода в течение 15 минут. Неспецифическое иммуноокрашивание предотвращают путем инкубирования срезов при комнатной температуре в буфере PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA, кат. № A2153-50G, Sigma) в течение 1 ч.

Срезы затем инкубируют в течение ночи при 4°C с одним из следующих первичных антител, разведенных в 0,1% BSA, и согласно инструкциям изготовителя: моноклональное мышинное антитело против человеческого сывороточного альбумина (кат. № A6684, Sigma; для ИНС), моноклональное мышинное антитело против человеческого СУР3А4 (кат. № SAB1400064, Sigma; для ИНС), поликлональное кроличье антитело против человеческой орнитинкарбамоилтрансферазы (кат. № HPA000570, Sigma; для ИНС), поликлональное кроличье антитело против человеческой УДФ-глюкуронозилтрансферазы 1А1 (кат. № sc-27415, Santa Cruz; для ИНС), MRP-2 (кат. № ab3373, Abcam; для ИНС), моноклональное мышинное антитело против человеческого цитокератина 19 (СК-19) (клон RCK108; M0888, Dako; для ИНС), моноклональное антитело против СК19 (кат. № SAB3300018, SIGMA, для IF), моноклональное антитело против СК18 (кат. № SAB3300015, SIGMA, для IF), моноклональное мышинное антитело против человеческого виментина (кат. № 10515, Progen; для ИНС), моноклональное антитело против виментина (кат. № V6630, SIGMA; для IF), антитело против человеческого гепатоцитарного ядерного фактора 4 (HNF-4) (кат. № sc-8987, Santa Cruz; для ИНС), моноклональное антитело против HNF-4 (кат. № SAB4501409, SIGMA; для IF), моноклональное антитело против HNF3B (кат. № SAB2500409, SIGMA; для IF). Следующие меченые антитела использовали в качестве вторичных антител для иммунофлуоресценции (IF) согласно инструкциям изготовителя: антитело осла против мышинного IgG, конъюгированное с Alexa Fluor®488 (кат. № 715-545-151, Jackson ImmunoResearch), антитело осла против кроличьего IgG, конъюгированное с Cy3 (кат. № 711-165-152, Jackson ImmunoResearch). Для иммуногистохимии для выявления первичных антител используется окрашивание на основе пероксидазы хрена (HRP) с использованием Envision против мышинного антитела (кат. № K4001, Dakocytomation), против кроличьего антитела (кат. № K4003, Dakocytomation) или против IgG-HRP козы (кат. № sc-2020, Santa Cruz) и таблетки 3,3'-диаминобензидина SIGMAFAST™ (кат. № D4168, Sigma) в качестве хромогенного субстрата. Ядра контрастно окрашивают с использованием 4,6-диамидино-2-фенилиндола (Vectashield®+DAPI, кат. № H-1200, ABCYS) для иммунофлуоресценции или с использованием гематоксилина Майера (кат. № MHS16, Sigma) для иммуногистохимии. Анализ осуществляется с использованием инвертированного микроскопа Olympus IX50, соединенного с камерой UC30. Цифровые изображения получали с использованием программы Cellsens.

Характеристика трехмерного потомства H2Stem посредством анализа вестерн-блоттингом.

Клетки (в концентрации 5×10^6 клеток на мл) лизируют в буфере, содержащем 10 mM HEPES, pH 7,4, 80 mM KCl, 2 mM EDTA, 15 mM бета-меркаптоэтанол, 0,1% Triton X-100 и 1% PIC (смесь ингибиторов протеаз). Белковые экстракты инкубируют при встряхивании при 4°C в течение 30 минут и затем гомогенизируют с использованием Potter Dounce (10 A.R.) на льду. Клеточные лизаты затем центрифуги-

руют при 4000g в течение 10 мин для осаждения обломков клеток. Концентрацию белка в образующемся супернатанте затем определяют, следуя классическому методу Бредфорда, используя имеющийся в продаже набор (Bio-Rad). Белковые экстракты разделяют электрофорезом с использованием SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и затем осуществляют электроперенос на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания). Мембрану затем инкубируют при комнатной температуре в течение 2 ч в буфере TBS-t (физиологический раствор, буферизованный Tris, - Tween: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween® 20), содержащем обезжиренное молоко (5% мас./об.; Merck). Мембрану затем инкубируют при 4°C со встряхиванием в течение ночи в таком же TBS-t/5% молоке, но содержащем первичное антитело, согласно инструкциям изготовителя. После промывки три раза в течение 15 минут буфером TBS-t мембрану инкубируют при комнатной температуре в течение 2 ч со вторичным антителом, меченным пероксидазой, в буфере на основе TBS-t/5% молока. После промывки три раза в течение 15 мин буфером TBS-t сигнал белка выявляют по хемилюминисценции (набор ECL, Amersham Pharmacia Biotech.).

В качестве первичного антитела использовали следующие антитела согласно инструкциям изготовителя: поликлональное кроличье антитело против человеческого CYP3A4 (кат. № AB1254, Chemicon), поликлональное кроличье антитело против UGT1A1 (кат. № 4371, Cell Signaling Technology) и антитело против SULT1 (кат. № sc-32928, Santa Cruz).

Характеристика генов, экспрессируемых трехмерным потомством H2Stem, с использованием кПЦР-ОТ.

Трехмерное потомство H2Stem из лунки 6-луночного планшета (или из 1-10 лунок из 96-луночного микропланшета) собирают в 1,5 мл пробирку и промывают 1 мл PBS, ожидая оседания кластеров клеток на дно пробирки посредством гравитации до удаления PBS. Кластеры клеток лизируют с использованием 350 мкл буфера RLT Plus, встряхивая пробирку на вихревой мешалке в течение 30 с и разрушая сфероиды посредством механического воздействия с использованием системы с электроприводом для вращения поршней (кат. W14044, Fisher Scientific) с использованием поршней, не содержащих РНКазы (кат. W5290W, Fisher Scientific).

Общую РНК экстрагируют из клеток с использованием набора RNeasy® Plus Mini (кат. № 74134 QIAGEN), с последующей обработкой ДНКазой с использованием набора DNA-free™ (кат. № AM1906, Ambion). Первую нить кДНК синтезируют с использованием набора для синтеза первой нити кДНК Transcriptor (кат. № 04379012001, Roche) согласно инструкциям изготовителя и затем разбавляют водой, не содержащей нуклеазы (кат. № AM9938, Invitrogen) до концентрации кДНК 10 нг/мкл. Смеси для ПЦР-ОТ амплификации (20 мкл) содержат 0,2 мкг матричной кДНК, 10 мкл 2× мастер-микса Taqman (кат. № 4369514, Applied Biosystem) и 1 мкл 20× среды для анализа кПЦР (количественная ПЦР) PrimeTime (IDT). Образцы прогоняют в двойной повторности на системе ПЦР в реальном времени ViiA™ от Applied Biosystems или на любом другом циклере для ПЦР в реальном времени от Applied Biosystems. Условия циклирования являются следующими: 10 мин активации полимеразы при 95°C, 40 циклов при 95°C в течение 15 с и при 60°C в течение 45 с. Специфичные в отношении транскрипта гена пары последовательностей праймеров были получены от Applied Biosystems, как описано в примере 1.

Характеристика трехмерного потомства H2Stem по биологическим активностям.

Активность CYP3A4 трехмерного потомства H2Stem можно измерять с использованием анализа люминисценции с использованием методики, аналогичной методике, осуществляемой для прикрепленных клеток (см. пример 1). Вплоть до пяти трехмерных кластеров клеток, каждый из которых содержит приблизительно 20000 клеток, промывают буфером PBS для удаления остаточной среды и затем переносят в 48-луночные планшеты, покрытые коллагеном, BD BioCoat™ (кат. № 356505, BD Biosciences). После 4-часовой инкубации с 200 мкл IMDM (кат. № 21980032, Invitrogen), содержащей 0,2 мкл люциферин-IPA (кат. № V9002, Promega), суспензию клеток (100 мкл среды) переносят в 96-луночные планшеты (кат. № 734-1662, Costar) и анализируют, как описано в примере 1. Среда для культуры клеток, в которой не инкубировали трехмерные кластеры клеток, используется в качестве контроля фонового шума.

Анализ секрета мочевины и конъюгирования билирубина для тестирования метаболической активности, специфичной для печени, проводили с использованием трехмерных кластеров клеток, каждый из которых содержал приблизительно 100000 клеток (эквивалент 5 сферам клеток H3Stem или клеток H3Screen-2a), которые инкубируют с соответствующими реактивами, как описано выше в примере 1.

Активность SULT тестировали в комбинации с UGT1A (т.е., включая UGT1A1 и другие изоформы UGT1A), используя парацетамол в качестве субстрата для реакции. Продукты глюкуронидации и конъюгирования сульфата с парацетамолом количественно измеряются ВЭЖХ, как описано Lau G и Crichley J, 1994. Вкратце, клетки инкубируют в течение 24 ч с 5 mM парацетамолом (кат. № A7302, Sigma). После инкубации супернатанты сред центрифугируют, фильтруют и анализируют посредством ВЭЖХ-УФ при 254 нм. 2-Ацетаминофенол добавляют в качестве внутреннего стандарта. Специфическими стандартами для количественного измерения являются парацетамол-сульфат (кат. № UC448, Sigma) и Р-ацетаминофенил-β-D-глюкуронид (кат. № A4438, Sigma). В качестве неподвижной фазы применяют колонку Nova-Pak C18 Radial-Pak, 60 Å, 4 мкм, 8,0×100 мм (Waters). Подвижная фаза состоит из 0,1 M

K_2HPO_4 , 0,1% уксусной кислоты и 0,75% пропан-2-ола при pH 3,8 (расход - 1,5 мл/мин). Результаты выражаются в виде продукции пмоль глюко- или сульфометаболитов в минуту и на мг белка. Концентрация белка оценивается согласно классическому способу Бредфорда с использованием набора от Bio-Rad.

СУР-зависимые ферментативные активности определяли посредством ЖХ/МС/МС (жидкостная хроматография/масс-спектрометрия/масс-спектрометрия) после инкубирования клеток со смесью субстратов (10 мМ фенацетин, 100 мМ бупропион, 10 мМ диклофенак и 3 мМ мидазолам). Для оценки функциональности транспортера клетки инкубировали при 37°C (или при 4°C для некоторых экспериментов) в 500 мкл HBSS, содержащем [^{14}C] маркерный субстрат транспортера в концентрации 10 мкМ (0,5 мкКи/мл). Использовали следующие субстраты: таурохолат (ТС), эстрон-3-сульфат (Е3S) и 1-метил-4-фенилпиридиний (МРР). В конце инкубации супернатанты удаляли, и монослои промывали 3 раза ледяным PBS. Затем в каждую лунку добавляли 300 мкл 0,1 н. NaOH для лизирования клеток. Отбирали аликвоту (100 мкл) и смешивали с 2 мл сцинтиллятора Ultima Gold для оценки концентрации маркерного субстрата внутри клеток с использованием счетчика Tri Carb. Индуцибельность СУР-зависимой активности фазы I доказывали после совместной обработки рифампицином (10 мкМ) (СУР3А4, СУР2С9, СУР2В6) и бета-нафтофлавоном (25 мкМ) (СУР1А2) в течение трех суток.

Ферментативную активность карбоксиэстеразы-1 (CES-1) измеряли с использованием набора для ELISA (кат. № ab109717, Abeam), используя белок, отобранный из культур клеток из H2Stem, H3Stem, ADHLS, используя первичные человеческие гепатоциты и HepG2 в качестве позитивных контролей. Протокол использовали согласно инструкциям изготовителя. Секретируемый альфа-1-антитрипсин количественно измеряли в кондиционированных культуральных средах от клеток H2Stem и клеток ADHLS с использованием набора для ELISA (кат. № ab108799, Abeam) согласно инструкциям изготовителя.

Результаты

В качестве дополнительной характеристики, отличающей клетки H2Stem и клетки H2Screen от недифференцированных и дифференцированных клеток ADHLS (или других человеческих клеток-предшественников печени), данные новые популяции клеток, которые описаны в Примере 1, обеспечивают суспензии различных типов из трехмерных кластеров клеток (т.е. трехмерное потомство H2Stem), которые содержат клетки-предшественники печени или гепатоцитоподобные клетки, в зависимости от условий культуры клеток.

При поддержании клеток H2Stem или клеток H2Screen либо в системах культуры на основе висячей капли, либо на чашках, обеспечивающих слабое прикрепление, быстро формируются трехмерные кластеры клеток, имеющие диаметр 50-100 мкм, в пределах первых 2-4 суток, достигающие размера больше, чем 300 мкм и даже вплоть до 600 мкм через 15-25 суток (фиг. 5 и 6). Данные кластеры клеток, демонстрирующие некоторую поддерживающую строму между клетками, можно поддерживать в культуре клеток по меньшей мере до 1-2 месяцев. В отличие от этого, клетки ADHLS (либо недифференцированные, либо дифференцированные, культивируемые в тех же самых условиях) обеспечивают не больше чем 20 мкм по размеру по существу двухмерные агрегаты, которые не демонстрируют сильных специфичных для печени метаболических активностей, которые наблюдаются для потомства H2Stem, которое образует трехмерные кластеры клеток. Трехмерное потомство H2Stem, которое содержит либо недифференцированные (клетки H3Stem), либо дифференцированные (клетки H3Screen) клетки, можно получать в системах культуры на основе висячей капли, в колбах, чашках или микропланшетах с U-образными/круглыми лунками для культуры клеток, обеспечивающих ультранизкое связывание. Данные контейнеры были разработаны для культивирования эмбрионных теллец или других клеток, таких как сфероиды, в суспензии. Поверхность, экспонированную клеточной культуре, покрывают ковалентно связанным слоем гидрогеля, который является гидрофильным, нейтрально заряженным и ингибирует иммобилизацию клеток (Saleh F. et al. 2012).

В зависимости от дальнейшего использования, содержимое единичной лунки, чашки или колбы (или результат объединения содержимого лунок в микропланшете для того, чтобы получить 5, 10 или более сфер трехмерного потомства H2Stem), или каждого сфероподобного кластера можно использовать или тестировать по отдельности, в той же самой лунке или иным способом, обеспечивая высокопроизводительную оценку эффектов соединений или условий культуры клеток, параллельно с другими критериями (такими как ферментативная активность или экспрессия гена / белка), на данном трехмерном потомстве H2Stem.

Клетки H3Stem представляют собой трехмерное потомство H2Stem, которое главным образом составлено клетками-предшественниками печени, и оно может быть получено культивированием клеток H2Stem. Трехмерное потомство H2Stem, после инкубации в подходящей среде (как в случае клеток H3Screen-1 и клеток H3Screen-2), содержит гепатоактивные клетки. В частности, клетки H3Screen можно поддерживать в виде трехмерного потомства H2Stem, которое является либо прикрепленным (в случае клеток H3Screen-2b и клеток H3Screen-2c), либо находится в суспензии (в случае клеток H3Screen-2a и клеток H3Screen-1), в зависимости от условий культуры клеток, то есть, если условия для получения этих разных типов трехмерного потомства H2Stem применяются в конкретной последовательности или одновременно. На морфологическом и фенотипическом уровне трехмерное потомство H2Stem имеет сходство

с микропеченочным каркасом, состоящим из поддерживающего стромального каркаса и внутренней массы печеночных клеток (фиг. 5). Применение 96-луночных микропланшетов с U-образными/круглыми лунками приводит к более стандартизированному трехмерному потомству H2Stem, имеющему более однородный размер и более контролируемое образование кластеров клеток в каждой лунке. На самом деле, потомство H2Stem, которое переносится в такие системы для культуры клеток, быстро агрегирует в один сфероподобный кластер клеток, который может содержать больше, чем 100000 клеток (фиг. 5Г и 6).

У трехмерного потомства H2Stem все еще экспрессируются маркеры, которые идентифицированы в клетках H2Stem, такие как мезенхимальный маркер, подобный виментину, и печеночный маркер, такой как альбумин. Кроме того, трехмерное потомство H2Stem обычно демонстрирует более высокие уровни экспрессии главных печеночно-специфических метаболических активностей прямо (подобно CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2E1, орнитинтранскарбамилазе и UGT1A1) или опосредованно (в том, что касается транскрипционных факторов, таких как HNF-3b и HNF-4) по сравнению не только с клетками ADHLSC, но также и с клетками H2Stem и клетками H2Screen. Данные наблюдения свидетельствуют о том, что трехмерное потомство H2Stem способно значительно лучше воспроизводить не только структурную трехмерную организацию, но также и функциональности, которые демонстрируют гепатоциты *in vivo*. При анализе посредством иммуногистохимии клетки H3Screen-1 демонстрируют сильную экспрессию альбумина, CYP3A4, орнитинтранскарбамилазы (ОТС; фермент цикла мочевины) и УДФ-глюкуронозилтрансферазы 1A1 (UGT1A1; фермент для конъюгирования билирубина), наряду с сильной экспрессией СК-19 и СК-18.

На уровне ферментативной активности измеряли активность CYP3A4 в трехмерном потомстве H2Stem, содержащем гепатоцитоподобные клетки, по сравнению с первичными гепатоцитами и клетками H2Stem и клетками H2Screen. При сравнении абсолютных значений (фиг. 7А) уже значительно более высокая активность CYP3A4 клеток H2Stem по сравнению с клетками ADHLSC до или после дифференциации (см. пример 1 и фиг. 4Б) уже достигается клетками H3Stem и дополнительно увеличивается в клетках H3Screen, таких как клетки H3Screen-2a. Данные значения, при определении на основе числа клеток, показывают активность CYP3A4 в интервале 10^2 - 10^3 пмоль/кластер клеток H3Screen-2a, соответствуя интервалу 10^5 - 10^6 пмоль/клетку (в зависимости от общего числа и плотности клеток), таким образом, давая по меньшей мере один дополнительный log улучшения по сравнению с клетками H2Screen. Такое значение значительно выше уровней активности CYP3A4, которая измеряется в дифференцированных клетках ADHLSC, и достигает уровня, который измеряется в первичных гепатоцитах.

Можно осуществлять дополнительное подтверждение специфичных для печени метаболических активностей разных типов клеток H3Screen, аналогичное тому, которое было описано в примере 1 для клеток H2Stem и клеток H2Screen, таких как секреция мочевины (см. фиг. 4). В качестве альтернативы, можно оценивать другие индикаторы метаболической активности с использованием имеющихся в продаже наборов или путем применения методик, которые описаны в литературе, для определения уровня экспрессии мРНК и/или белка в отношении релевантных маркеров и/или ферментативной активности (например, в связи с CYP1A2-, CYP2C19-, CYP2C9- или CYP2D6-специфичной метаболизацией соединений).

Кроме того, в клетках H3Screen (и в частности в клетках H3Screen-2a и -2b) измеряли значительно более высокую ферментативную активность по сравнению с клетками H2Stem или клетками H2Screen после индукции рифампицином и бета-нафтофлавоном (анализ для оценки поддающихся измерению эффектов взаимодействий лекарственное средство-лекарственное средство), приводя к кратности индукции 36,22× для активности CYP1A2, 93,71× для активности CYP2B6, 2,13× для активности CYP2C9 и 31,23× для активности CYP3A4.

Клетки H3Stem и клетки H3Screen также демонстрируют значительную экспрессию и активность белка UGT1A и SULT (Фиг. 7Б и В), в данном случае также достигающую уровней, которые измеряются в первичных гепатоцитах, то есть, от 10% вплоть до почти 100%. Эта значительная способность к глюкуронидированию имеет не только большое значение для разработки моделей для токсикологического скрининга, но также демонстрирует потенциал клинического применения данных новых клеток против, например, синдрома Криглера-Найяра. Клетки H3Screen, кроме того, способны к синтезу мочевины в присутствии субстратов (хлорида аммония и орнитина) со значительно повышенной или накопившейся продукцией мочевины во времени, подтверждая их значительную метаболическую активность.

Функциональность поглощающих транспортеров: котранспортирующего полипептида натрия таурохолатата (NTCP), полипептидов, транспортирующих органические анионы (OATP, таких как OATP1B1 и OATP1B3), и транспортеров органических катионов (OCT (OCT1 и 2)) оценивали путем измерения поглощения таурохолатата, эстрон-3-сульфата или MPP. И клетки H3Stem, и клетки H3Screen-2a демонстрировали повышенное поглощение таких соединений за 15-60 мин (фиг. 7Г). Кроме того, и клетки H3Stem, и клетки H2Stem демонстрируют печеночно-специфические активности, подобные CES1 (карбоксилаза печени), которые не только превышают активности клеток ADHLSC или обычно используемой линии клеток, подобной HepG2, но также достигают активностей, выявляемых *in vitro* для первичных человеческих гепатоцитов (фиг. 8А). Аналогичным образом секреция альфа-1-антитрипсина клетками H2Stem

значительно превышает секрецию, наблюдаемую для клеток ADHLSC (фиг. 8Б), что является дополнительной характеристикой, которую можно оценивать далее в клетках H3Stem и в клетках H3Screen. Данные доказательства подтверждают присутствие активного поглощения и метаболизма конкретных соединений в клетках H3Stem и H3Screen, которые можно использовать для тестирования лекарственных средств-кандидатов.

Таким образом, клетки H2Stem можно использовать для получения потомства H2Stem, которое можно поддерживать в виде трехмерных кластеров клеток (трехмерное потомство H2Stem), которые содержат клетки-предшественники печени или гепатоактивные клетки, эффективно растут в условиях культуры клеток и являются полезным для предоставления метаболически активных и/или пролиферирующих клеток. Характеристики, связанные с метаболизмом и пролиферацией, можно объединять с другими характеристиками (такими как присутствие/отсутствие маркеров поверхности, специфичных для типа клеток или активности, диаметр, тип стромальной структуры или другие биологические активности) для определения того, какой тип трехмерного потомства H2Stem, как идентифицировано выше (или дополнительный подтип, который может быть определен функционально или морфологически), имеет более подходящий функциональный, морфологический или антигенный профиль для данного применения.

Например, конкретный интервал диаметров (соответствующих среднему числу клеток и количеству белка/ДНК), способ, объединяющий или не объединяющий дифференциацию *in vitro* (см. фиг. 1 и 6), трансформацию с использованием векторов для экспрессии рекомбинантных белков и/или специфический антигенный профиль, могут быть предпочтительными, когда трехмерное потомство H2Stem предназначено для введения *in vivo* (например, посредством инъекции в портальную вену или внутри/внепеченочной имплантации с любой предварительной обработкой трипсином или без нее, в пределах устройства или биосовместимого матрикса или вне его).

В качестве альтернативы, большее трехмерное потомство H2Stem, которое генерируется в суспензии либо из клеток H2Screen (клетки H3Screen-1), либо из клеток H3Stem (клетки H3Screen-2a или клетки H3Screen-2b), может быть более подходящим для применений *in vitro*, которые включают воздействие вирусов, нацеленных на печень, трансформацию векторами для экспрессии рекомбинантных белков и/или воздействие набора соединений. Данные эксперименты могут давать релевантную информацию по тому, как такая модель позволила бы эффективно экспрессировать вирусные или человеческие белки, или оценивать терапевтическую эффективность, метаболизм, стабильность и/или токсичность соединения в отношении метаболизма печени, в частности, для фармакологического или токсикологического доклинического скрининга и тестирования.

Пример 3. Молекулярные свойства, характеризующие клетки H2Stem.

Материалы и методы

Протеомный анализ клеток ADHLSC и клеток H2Stem.

Протеомный анализ проводили в двухмерных (2D) гелях с использованием системы Ettan™ DIGE (2D-DIGE; GE Healthcare Life Sciences), как описано ранее (Vanheel A et al., 2012) с некоторыми небольшими адаптациями. Вкратце, клеточные осадки получали путем отбора клеток в культурах при 95%-ной конфлюентности, подсчета и центрифугирования при 300g в течение 5 мин при 4°C. Клетки промывали 10 мл (на 5×10^6 клеток) ледяного промывочного буфера, который получали с использованием 45 мл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), 5 мл раствора EDTA (50 mM; кат. № 17-1324-01, GE Healthcare) и 1 таблетки смеси ингибиторов протеаз (complete; кат. № 11873580001, Roche Applied Sciences). При гомогенизации клетки дважды промывали и центрифугировали в 1 мл ледяного промывочного буфера на 5×10^6 клеток. Наконец, супернатант удаляли и клеточные осадки быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

После определения концентрации белка в клеточных экстрактах проводили минимальное мечение красителями на основе N-гидроксисукцинимидилового эфира Cy2, Cy3 и Cy5 (GE Healthcare Life Sciences), как описано изготовителем. 2D-DIGE гели, меченные красителем CyDye, сканировали на Ettan DIGE Imager (GE Healthcare Life Sciences). Изображения гелей, полученные со всеми тремя красителями Cy, загружали в программу DeCyder 7.0 (GE Healthcare Life Sciences) и анализировали.

Анализ методом главных компонент (МГК).

Статистическую значимость изменчивости количества в пределах группы относительно величины изменения между группами рассчитывали с использованием t-критерия Стьюдента и дисперсионного анализа (ANOVA). Пятна, присутствующие на 70% изображений гелей и со статистически значимым результатом ANOVA (p меньше или равен 0,05), рассматривали для дальнейшего анализа. Анализ методом главных компонент (МГК) проводили с использованием модуля расширенного анализа данных (EDA) DeCyder (GE Healthcare). Интенсивность флуоресценции каждого пятна нормировали к данному внутреннему стандарту, делая возможным сравнение между гелями. Данный способ осуществляли посредством программы DeCyder (GE Healthcare).

Выявление клеток на основе белков.

Проводили проточную цитометрию или анализ вестерн-блоттингом на наборе потенциальных био-

маркеров поверхности, которые были идентифицированы протеомным анализом. Использовали цитометр FACSCANTO и программу FACSDiva (BD biosciences). Клетки инкубировали после фиксации перед анализом с первичными антителами PE мыши против человеческого CD140b (BD Pharmingen; кат. № 558821) и PE против человеческого SUSD2 (антигены W5C5 и W3D5, кат. № 327406 и 327506, BioLegend). Жизнеспособность измеряли с использованием 7AAD (кат. № 559925, BD Pharmingen). Для анализа вестерн-блоттингом в качестве контроля использовали имеющееся в продаже антитело против бета-актина согласно инструкциям изготовителя. Другие антитела, которые использовали в проточной цитометрии, включают CD49b-PE (BD Biosciences; клон 12F1; кат. № 555669;), CD51-PE (Biolegend, клон NK1-M9, кат. № 327909) и CD271-PE (Miltenyi, клон ME20.4-1.H4; кат. № 130-098-111) согласно инструкциям изготовителя. Для проточной цитометрии процентные доли позитивных клеток нормировали с использованием 3%-ной позитивности подходящего контрольного изотипа.

Результаты

Примеры 1 и 2 представляют экспериментальные данные о первой серии молекулярных или ферментативных характеристик, которые позволяют отличать клетки H2Stem и потомство H2Stem от других типов клеток посредством применения имеющихся в продаже продуктов (антител, праймеров для ПЦР и/или наборов). Однако может быть проведена более общая качественная и количественная характеристика клеток H2Stem и потомства H2Stem посредством разных технологий для широкого анализа транскриптома, липидома, метаболома и/или протеома данных клеток. Затем путем сравнения набора результатов друг с другом или с аналогичными данными, полученными из отличных популяций клеток (например, разные препараты клеток H2Stem, потомства H2Stem, первичных человеческих гепатоцитов или клеток ADHLSC), может быть установлен более точный биологический профиль клеток H2Stem и потомства H2Stem путем идентификации биомаркера(-ов), которые могут помочь различению между разными популяциями клеток.

В качестве первого подхода сравнивали протеом клеток ADHLSC и клеток H2Stem путем экстрагирования всего белкового содержимого из пролиферирующих культур данных клеток и подвергания его анализу на двухмерном геле для идентификации изменений экспрессии, обмена и/или модификации белков. Отбирали дифференциальные пятна посредством анализа дифференциальной экспрессии и количественно оценивали посредством однофакторного ANOVA для того, чтобы провести анализ методом главных компонентов (МГК), неконтролируемым методом мультивариантной статистики, используемым для анализа изменчивости между экспериментальными группами. МГК проводили с использованием всех пятен, релевантных согласно уровню значимости ANOVA 0,05, что приводило к получению двух отличных кластеров пятен, которые (помимо функциональных характеристик) свидетельствовали бы об отличном профиле биомаркеров между отличными препаратами двух популяций клеток (фиг. 9).

Более углубленный анализ данных дифференциальных пятен может быть проведен посредством секвенирования белка с использованием масс-спектрометрии для реальной идентификации релевантных белков и последующего подтверждения этих доказательств с использованием других технологий и имеющихся в продаже продуктов (например, посредством применения антител в вестерн-блоттинге или проточной цитометрии, праймеров для ПЦР-ОТ). В качестве альтернативы, технологии на основе чипов и другие подходы, предоставляющие большие наборы геноспецифичных выявляющих агентов (представляющих собой праймеры, меченые антитела или лектины), могут обеспечивать сравнение большого количества специфических белков (сгруппированных по активности, локализации или другим критериям) в отличных образцах и затем ограничение числа белков, которые заслуживают более подробного анализа в разных популяциях клеток и/или условиях культуры клеток.

При объединении данных из иммунологического, транскриптомного и/или гликомного анализа дополнительная информация по клеткам H2Stem или потомству H2Stem может свидетельствовать о характеристиках данных клеток, которые могут представлять потенциальный интерес для дальнейшего подтверждения (включая медицинские применения, паракринные эффекты и взаимодействия с другими клетками, внеклеточным матриксом или другими биологическими эффекторами). Такой подход может включать сравнение с другими популяциями клеток (например, с первичными человеческими гепатоцитами, разными препаратами клеток H2Stem или разным потомством H2Stem, поддерживаемыми в виде прикрепленных клеток или трехмерных кластеров клеток), а также с биологическими материалами, полученными из таких популяций клеток (такими как кондиционированная среда или конкретные клеточные или белковые фракции).

Разные технологии обеспечивают получение предварительных данных по повышенной или пониженной представленности конкретных белков в таких биологических материалах из клеток H2Stem и отличающихся типов потомства H2Stem и сравнение не только с клетками ADHLSC, но также и с популяциями клеток-предшественников зрелой печени или даже с первичными человеческими гепатоцитами. Данные доказательства по повышенной или пониженной представленности конкретных белков в отличных популяциях клеток можно использовать для разных применений *in vivo* и/или *in vitro*, для которых требуется установление качества и/или количества популяций клеток-предшественников зрелой печени в общем и клеток H2Stem (или одного или более чем одного типа потомства H2Stem) в частности, путем применения подходящим образом подтвержденных биомаркеров на исходном этапе способа их получе-

ния и в более поздних пассированиях (как определено в подробном описании, приведенном выше).

Предпочтительными подходами для определения таких биомаркеров являются подходы, которые можно подтверждать без ограничения из-за низкой производительности или большого числа клеток, подлежащих тестированию и разрушению. Таким образом, дальнейшие исследования могут быть сосредоточены на биомаркерах, которые можно оценивать в супернатанте среды культуры клеток и/или посредством проточной цитометрии. С этой целью количество белков можно исходно оценивать в клетках H2Stem и клетках ADHSC с использованием методик двухмерного (2D) гель-электрофореза. Белки, которые находятся на поверхности клетки и/или обнаруживаются секретированными в супернатанте культуры клеток, ранее окрашивали на две популяции клеток с использованием отличных флуоресцентных зондов или выделяли в специфично обогащенных белковых препаратах с использованием биотинилирования и аффинной хроматографии (например, посредством применения набора для выделения белков поверхности клеток от Pierce, Thermo scientific). Параллельно для каждой популяции клеток также получают экстракты общего белка и другие внутренние контроли/стандарты. Данные образцы затем наносят на гели для разделения белков посредством 2D гель-электрофореза. Затем используют биоинформатику и методики визуализации для сравнения количества белков поверхности клетки и/или секретлируемых белков в гелях, и интересующие пятна (для которых выявляется статистически значимое различие в количестве между популяциями клеток) затем отбирают из геля и расщепляют с использованием трипсина с целью установления идентичности белка в таком пятне посредством масс-спектрометрии.

Среди белков, которые были идентифицированы как дифференциально экспрессируемые между клетками H2Stem и клетками ADHSC с использованием таких способов, обнаружили, что белок 2, содержащий домен Sushi (SUSD2), и бета-цепь фибриногена (FGB) или другие секретлируемые белки, связанные со свертыванием, сильно экспрессируются в клетках H2Stem по сравнению с клетками ADHSC и, таким образом, могут представлять интерес в качестве биомаркеров (по отдельности или в комбинации) для клеток H2Stem и потомства H2Stem.

Даже если биологическая функция SUSD2 до сих пор не была полностью установлена, в литературе приведена некоторая релевантная информация по этому белку поверхности клетки, имеющему большой внеклеточный домен. Данный белок был идентифицирован во многих исследованиях, сравнивающих экспрессию генов и/или белков, и например его сверхэкспрессию обнаружили немедленно после частичной гепатэктомии (White P et al., 2005). SUSD2 и соответствующий мышинный белок (SVS-1), по-видимому, влияют на активности раковых клеток *in vitro* или животных моделей путем изменения их взаимодействия с внеклеточным матриксом, по меньшей мере при тестировании с использованием природных (таких как фибронектин или галектин-1) или синтетических (таких как матригель) молекул (Sugahara T et al., 2007; Watson A et al., 2013). Наконец, SUSD2 был идентифицирован как содержащий эпитопы поверхности клетки (W5C5, W3D5), которые определяют как характеризующие мезенхимальные стволовые клетки из человеческого костного мозга, эндометрия, хряща и других тканей (Sivasubramanian K et al., 2013; Benz K et al., 2013; Masuda H et al., 2012; Pilz G et al., 2011; Buhning HJ et al., 2007).

Исходные сведения по значительно более сильной экспрессии SUSD2 в клетках H2Stem, полученные с использованием 2D гель-электрофореза, были подтверждены с использованием имеющегося в продаже антитела (очищенное антитело против человеческого SUSD2; кат. № 327401, Biolegend) против человеческого SUSD2 в вестерн-блоттинге (Фиг. 10А) и в иммунофлуоресценции с использованием конфокального микроскопа. Внеклеточный домен SUSD2 также может присутствовать в среде культуры клеток в виде растворимого белка и идентифицироваться вместе с секретлируемыми белками (такими как FGB, CES1 или альфа-1-антитрипсин и соответствующей им активностью), которые можно использовать в качестве секретлируемых биомаркеров для характеристики клеток H2Stem и специфического потомства H2Stem во время их появления и продукции или для идентификации характеристик, которые свидетельствовали бы о конкретных применениях *in vitro* и/или *in vivo*.

Интересно то, что несколько других поверхностных белков были охарактеризованы как более экспрессируемые клетками ADHSC, чем клетками H2Stem, что предполагало об альтернативном подходе для характеристики клеток H2Stem и специфического потомства H2Stem во время их появления и продукции. Например, CD140b, часто упоминаемый среди маркеров, характеризующих мезенхимальные стволовые клетки, проявляется как имеющий профиль экспрессии, противоположный профилю SUSD2, который может быть определен проточной цитометрией. На самом деле, такой подход может быть дополняющим и объединенным с анализом вестерн-блоттингом для демонстрации того, как сильно SUSD2 экспрессируется в большинстве клеток H2Stem, и насколько ниже экспрессия SUSD2 в значительно меньшей процентной доле клеток ADHSC (Фиг. 10Б и В). Эта комбинация позитивности/негативности биомаркеров, наряду с функциональными характеристиками, обеспечивает дополнительное различение клеток H2Stem от клеток ADHSC, а также мезенхимальных стволовых клеток, описанных ранее (Benz K et al., 2013), которые не демонстрируют печеночные маркеры или печеночно-специфические активности.

Дополнительно, сильную позитивность в отношении антител против CD140b можно использовать для оценки качества, чистоты и/или идентичности клеток ADHSC во время их продукции и/или до их применения. Наряду с другими критериями, которые перечислены в литературе (Najimi M et al., 2007), и (при ее доступности) клинической информацией по человеческому субъекту, который предоставил ис-

ходный препарат первичных клеток печени, выявление CD140b может обеспечить дополнительную оптимизацию получения клеток ADHLS и выбора наиболее подходящего терапевтического применения и/или человеческого субъекта, которому вводят клетки.

Данный исходный анализ относительно поверхностных маркеров и ферментативных активностей был расширен посредством применения дополнительных протеомных и транскриптомных технологий, которые применяли не только на клетках H2Stem и клетках ADHLS, но также и среди разных препаратов первичных клеток печени человека, которые получали от разных доноров, и которые использовали для получения клеток H2Stem (как описано выше), клеток ADHLS (как описано в литературе) и клеток ADHLS, которые получали в большем масштабе для проведения клинических исследований по генетическим метаболическим заболеваниям печени, таким как синдром Криглера-Найяра и расстройства цикла мочевины.

Для этих последних клеток (названных HNALPC) требуются специфические критерии изготовления и качества, такие как соответствие условиям GMP, улучшенные скорость роста и уровень удвоения популяции, и соответствие стандартам качества до криоконсервации и клинического применения (т.е. клетки должны оставаться жизнеспособными и недифференцированными, демонстрировать данную комбинацию позитивных/негативных маркеров при поддержании способности к дифференциации в направлении функциональных гепатоцитов). Данный способ в увеличенном масштабе, который требовал оптимизации некоторых параметров культуры клеток, исходно осуществлялся в многоярусном стеллаже (например, Corning CellStack), и затем они переносились в биореактор для многих планшетов (например, PALL Xpansion 10), подтверждая то, что клетки-предшественники печени, такие как клетки ADHLS и, в ближайшем будущем, клетки H2Stem, могут быть предоставлены в промышленном масштабе, имея гомогенное качество и количество (Egloff M et al., 2013).

Однако в перспективе применения клеток HNALPC или H2Stem при дополнительных клинических показаниях и для дальнейшей оптимизации процесса изготовления исходно требующиеся критерии могут быть улучшены путем идентификации дополнительных маркеров (являющихся белками поверхности клетки, секретруемыми белками или имеющими отношение к ферментативным активностям), которые обеспечивают характеристику качества клеток и оптимизацию каждой стадии такого процесса (т.е. отбора первичных клеток печени, условий культуры клеток, приготовления в виде препарата, хранения и/или отбора пациента). Некоторые из таких дополнительных маркеров перечислены и протестированы выше, но построение на данном наборе данных дополнительного сравнения на основе протеомики/транскриптомики между образцами HNALPC, клеток H2Stem и первичных человеческих гепатоцитов свидетельствует о дополнительных релевантных маркерах, которые можно тестировать при использовании проточной цитометрии, ELISA или других имеющихся в продаже наборов либо на уровне анализа одного маркера, либо множественного параллельного анализа (например, посредством применения антител против маркеров поверхности клетки, которые содержатся в наборе eBD Lyoplate™).

Посредством применения маркеров, идентифицированных выше, в качестве контрольных критериев (а также других критериев, известных в литературе как характеризующие печеночные или мезенхимальные клетки, см. Yu J, et al., 2012; Santamaria E, et al., 2012; SlanyA, et al., 2010; Sison-Young R et al., 2015), идентифицировали ряд кандидатов для дальнейшего подтверждения клеток HNALPC и/или H2Stem на уровне как идентичности/качества клеток, так и биологической активности/медицинского применения. Таким образом, данные кандидаты могут быть полезными для разработки нового способа изготовления/приготовления в виде препарата, а также для применения клеток HNALPC и/или H2Stem при специфических показаниях и/или в специфических популяциях пациентов.

Первыми примерами таких кандидатов являются CD49b (также известный как интегрин альфа-2, ITGA2 или рецептор коллагена) и CD51 (также известный как интегрин альфа-V, ITGAV или субъединица альфа рецептора витронектина), которые сильно экспрессируются, как было показано в разных протеомных и транскриптомных наборах данных, которые были получены с использованием клеток HNALPC и H2Stem. Их позитивность подтверждали посредством проточной цитометрии в препаратах клеток HNALPC и H2Stem, имеющих разное происхождение или производственные характеристики, но также и в клетках HNALPC и H2Stem, происходящих из того же самого исходного препарата человеческих первичных клеток печени, которые были исходно негативными в отношении таких маркеров (Фиг. 11А). Данный подход также был подтвержден для маркера поверхности клетки (CD271, также известный как член 16 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, TNFRSF16, низкоаффинный рецептор фактора роста нервов), который, даже несмотря на то, что о его присутствии было известно в некоторых статьях по типу клеток, происходящих из печени, был показан как слабо экспрессируемый в разных наборах протеомных и транскриптомных данных, которые были получены с использованием клеток HNALPC и H2Stem (Фиг. 11Б). Таким образом, данные маркеры могут быть включены в перечисленные выше критерии как дополнительные позитивные (что касается CD49b и CD51) или негативные (что касается CD271) маркеры для идентификации клеток HNALPC и H2Stem.

Данные результаты свидетельствуют о том, что омынные данные по позитивным/негативным маркерам, которые были получены с клетками HNALPC и H2Stem, могут быть использованы для определения других белков с аналогичным профилем экспрессии среди таких популяций клеток как являющихся до-

полнительными маркерами-кандидатами (для обоих типов клеток или для различения между ними) или дополнительными ферментативными активностями, причем последние представляют собой особый интерес также и для применений *in vivo* и/или *in vitro*.

Первая категория дополнительных маркеров-кандидатов включает белки поверхности клетки, которые имеют аналогичные профили сильной экспрессии и в клетках HNALPC, и в клетках H2Stem (как в отношении CD29, CD44, CD49b, CD51, CD73 или CD90), подлежащие подтверждению проточной цитометрией или другими иммунологическими анализами (см. табл. 2 ниже).

Код Uniprot	Название гена	Альтернативные названия белков (релевантные биологические характеристики)
P23634	ATP2B4	кальций-транспортирующая АТФаза 4 плазматической мембраны, PMCA4
P26006	ITGA3	CD49c, интегрин альфа-3, субъединица альфа VLA-3
P02786	TFRC	CD71, белок 1 рецептора трансферрина, TfR, TfR1
P08195	SLC3A2	CD98, тяжелая цепь антигена поверхности клетки 4F2, 4F2hc, член 2 семейства 3 переносчиков растворенных веществ (транспортер аминокислот)
P13987	CD59	антиген 1F5, MAC-ингибирующий белок
P18084	ITGB5	интегрин бета-5
P48509	CD151	антиген-3 тетраспан эндотелия тромбоцитов, тетраспанин-24, Tspan-24
P05362	ICAM1	CD54, молекула 1 межклеточной адгезии
P15144	ANPEP	CD13, аланиламинопептидаза, аминопептидаза M/N
P15529	CD46	TLX, общий антиген трофобластов и лейкоцитов
P60033	CD81	тетраспанин 28, TSPAN28 (известный рецептор вируса гепатита С и требующийся на гепатоцитах для инфекции спороzoитами нескольких видов <i>Plasmodium</i> ; Yalaoui S et al., 2008)

Вторая категория дополнительных маркеров-кандидатов включает белки поверхности клетки, которые имеют аналогичные профили низкой экспрессии и в клетках HNALPC, и в клетках H2Stem (как в отношении CD45, CD117, CD31, CD34, CD133, CD271 и CD326), подлежащие подтверждению проточной цитометрией или другими иммунологическими анализами (см. табл. 3 ниже).

Код Uniprot	Название гена	Названия белков
P11215	ITGAM	CD11b, интегрин альфа-M, рецептор адгезии нейтрофилов
P20702	ITGAX	CD11c, интегрин альфа -X, Leu M5
P27930	IL1R2	CD121b, рецептор типа 2 интерлейкина-1, IL-1R-2, CDw121b, рецептор типа II IL-1, рецептор бета интерлейкина-1
P33151	CDH5	CD144, кадгерин-5, антиген 7B4, кадгерин сосудистого эндотелия, VE-кадгерин
P13591	NCAM1	CD56, молекула 1 адгезии нервных клеток, N-CAM-1, NCAM-1

Третья категория дополнительных маркеров-кандидатов включает маркеры поверхности клетки (или секретируемые белки), которые имеют аналогичные профили повышенной экспрессии в клетках H2Stem по сравнению с HNALPC (как в отношении SUSD2 или AAT), подлежащие подтверждению проточной цитометрией или другими иммунологическими (или функциональными) анализами (см. табл. 4 ниже).

Код Uniprot	Название гена	Названия белков (релевантные биологические характеристики)
P00738	HP	гаптоглобин, зонулин (секретируемый в кровь; ангаптоглобинемия вызывается мутациями, поражающими данный ген)
P00450	CP	церулоплазмин, ферроксидоза (секретируемый в кровь; ацерулоплазминемия, расстройство метаболизма железа, приводящее к накоплению железа, вызвана мутациями, поражающими данный ген)
P02753	RBP4	ретинол-связывающий белок 4, ретинол-связывающий белок плазмы (секретируемый)
P04114	APOB	аполипопротеин В-100 (секретируемый в кровь)
P18428	LBP	липополисахарид-связывающий белок (секретируемый)
P02763	ORM1	гликопротеин 1 альфа-1-кислоты, AGP 1, орозомукоид-1 (секретируемый в кровь)
P25063	CD24	
P14384	CPM	карбоксипептидаза М
P02654	APOC1	аполипопротеин С-I, Apo-C-I, ApoC-I (секретируемый в кровь)

Четвертая категория дополнительных маркеров-кандидатов включает маркеры поверхности клетки (или секретируемые белки), которые имеют аналогичные профили повышенной экспрессии в клетках

ННАЛРС по сравнению с клетками H2Stem (как в отношении CD140b), подлежащие подтверждению проточной цитометрией или другими иммунологическими (или функциональными) анализами (см. табл. 5 ниже).

Код Uniprot	Название гена	Названия белков (релевантные биологические характеристики)
P03956	MMP1	интерстициальная коллагеназа, коллагеназа фибробластов, металлопротеиназа-1 матрикса (секретируемая)
Q9UKX5	ITGA11	интегрин альфа-11
Q06828	FMOD	фибромодулин, FM, 59 кДа коллагенсвязывающий белок (секретируемый)
Q9NZV8	KCND2	член 2 подсемейства D потенциалзависимых калиевых каналов, субъединица Kv4.2 потенциалзависимого калиевого канала
P51671	CCL11	зоатаксин, малый индуцибельный цитокин A11 (секретируемый)
Q9BXN1	ASPN	аспорин (секретируемый)
O95069	KCNK2	член 2 подсемейства K калиевых каналов, TREK-1
Q96RW7	HMCN1	гемицентин-1, фибулин-6 (секретируемый)

Пятая категория дополнительных маркеров-кандидатов включает ферменты, которые относятся к биологическим активностям печени и имеют аналогичные профили повышенной экспрессии в клетках H2Stem и ННАЛРС, подлежащие подтверждению с использованием релевантных субстратов и ферментативных анализов (см. табл. 6 ниже).

Код Uniprot	Название гена	Названия белков (релевантные биологические характеристики)
P16930	FAH	фумарилацетоацетатаза, фумарилацетоацетатгидролаза (мутирующая при тирозинемии, врожденном нарушении метаболизма)
P05121	SERPINE1	ингибитор 1 активатора плазминогена (ассоциированный с недостаточностью ингибитора 1 активатора плазминогена)
P50454	SERPINH1	коллагин (ассоциированный с несовершенным костеобразованием 10)
P05155	SERPING1	ингибитор протеазы С1 плазмы, ингибитор эстеразы С1) (С1-ингибирующий фактор (ассоциированный с наследственным ангионевротическим отеком)
P00338	LDHA	L-лактатдегидрогеназа А (ассоциированная с гликогенозом 12)
P04075	ALDOA	фруктозобисфосфатаальдолаза А (ассоциированная с гликогенозом 12)
P46976	GYG1	гликогенин-1 (ассоциированный с гликогенозом 15)
Q04446	GBE1	1,4-альфа-глюкан-разветвляющий фермент (ассоциированный с гликогенозом 4)
P06132	UROD	уропорфириногендекарбоксилаза (ассоциированная с семейным гемохроматозом)
P36871	PGM1	фосфоглюкомутаза-1 (ассоциированная с врожденным расстройством гликозилирования 1Т)
P12694	BCKDHA	субъединица альфа 2-оксоизовалерат дегидрогеназы, митохондриальной (ассоциированная с валинолейцинурией 1А)
P21953	BCKDNB	субъединица бета 2-оксоизовалерат дегидрогеназы, митохондриальной (ассоциированная с валинолейцинурией 1В)
O14832	PHYH	фитаноил-КоА-диоксигеназа, пероксисомная (ассоциированная с болезнью Рефсума)
P22033	MUT	метилмалонил-КоА-мутаза, митохондриальная (ассоциированная с метилмалоновой ацидурией типа mut)
P09601	HMOX1	гемоксигеназа 1 (недостаточность гемоксигеназы 1)

Шестая категория дополнительных маркеров включает ферменты, которые относятся к биологическим активностям печени и имеют профили более высокой экспрессии в клетках H2Stem по сравнению с ННАЛРС (как в отношении CES1), подлежащие подтверждению с использованием релевантных субстратов и ферментативных анализов (см. табл. 7 ниже).

Код Uniprot	Название гена	Названия белков (релевантные биологические характеристики)
P01011	SERPINA3	альфа-1-антихимотрипсин
P36955	SERPINF1	фактор, происходящий из пигментного эпителия (ассоциированный с несовершенным костеобразованием 6)
Q16719	KYNU	кинурениназа (ассоциированная с гидроксикинурурием)
P32754	HPD	4-гидроксифенилпируватдиоксигеназа (ассоциированная с тирозинемией 3)
P08263	GSTA1	глутатион-S-трансфераза A1
P37059	HSD17B2	эстрадиол-17-бета-дегидрогеназа 2

Таким образом, данные, показанные в таблицах, приведенных выше, обеспечивают руководство для идентификации дополнительных маркеров и биологических активностей, которые могут быть ассоциированы с препаратами клеток HNALPC и/или H2Stem, и затем улучшения их качества на всем протяжении изготовления, а также их применений *in vitro* и *in vivo* для их эффективного фармацевтического применения.

Пример 4. Характеристика клеток H2Stem, которые инъецируют в мышиную модель.

Материалы и методы

Иммуногистохимический анализ.

Срезы печени толщиной 5 мкм депарафинизировали и регидратировали в ряду растворов со ступенчато изменяющейся концентрацией спирта. Эндogenous активность пероксидазы блокировали инкубацией в течение 30 мин в 3%-ном метанольном растворе пероксида водорода. Демаскировку антигена проводили посредством инкубирования срезов в растворе моногидрата лимонной кислоты (pH 6,0) при 98°C в течение 35 мин. Неспецифичное иммуоокрашивание предотвращали 1-часовой инкубацией при комнатной температуре согласно использованному набору. Срезы инкубировали со следующими первичными антителами против человеческих антигенов согласно инструкциям изготовителя: антитело против CK19 (Dako, кат. № M0888; разведение 1/100), антитело против CYP3A4 (Enzo, кат. № BML-CR3340-0025; разведение 1/750), антитело против альфа1 антитрипсина (Abcam, кат. № ab9399; разведение 1/1000) и антитело против MRP2 (Enzo, кат. № Alx-801-016; разведение 1/100). Выявление окрашивания визуализировали посредством набора против антител кролика Envision Dako (для антитела против CYP3A4) или наборов MOM (для антитела против MRP2, антитела против CK19 и антитела против альфа-1-антитрипсина), и с использованием диаминобензидина (Sigma, Бельгия) в качестве хромогенного субстрата. Ядра контрастно окрашивали с использованием гематоксилина Майера в течение 10 минут и монтировали с использованием Neo-Entellan® (Merck) для микроскопического анализа.

Результаты

Для клинического применения клеток H2Stem требуется исходное доклиническое подтверждение в животной модели, которое демонстрирует, имеет ли место прививка и пролиферация таких клеток в тканях, в частности, в печени, и каким образом, и представляет характеристики, ассоциированные с печеночной дифференциацией без канцерогенной трансформации. С этой целью клетки H2Stem вводили животным моделям, оценивая ряд стандартных параметров, а также некоторые параметры, относящиеся к потенциальному клиническому применению.

После тестирования в культуре клеток того, что клетки H2Stem не демонстрируют общих у раковых клеток характеристик, таких как измененный кариотип или высокая экспрессия человеческой обратной транскриптазы теломеразы (hTET), потенциальные канцерогенные эффекты клеток H2Stem тестировали параллельно с HNALPC в мышинной модели NSG (иммунодефицитные животные NOD Scid Gamma - мыши, у которых избегается отторжение клеток, вызванное ксенотрансплантацией; NOD.Cg-Prkdc^{SCID} H2rg^{tm1Wjl}/SZJ от Jackson Laboratories, кат. № 005557), где клетки вводят внутривнутрипеченочно. Клетки HeLa (канцерогенные клетки, происходящие из человеческой аденокарциномы шейки матки) и носитель для инъекции (криостор 5) используются в качестве позитивного и негативного контроля соответственно.

Через 6 месяцев после одной внутривнутрипеченочной инъекции клеток (1 миллион для каждого типа клеток, эквивалентно 20 миллионам/кг; введение согласно стандартным методикам) мышей умерщвляли и отбирали органы, подтверждая то, что ни клетки H2Stem, ни HNALPC не образуют значимо отличного числа опухолей при внутривнутрипеченочном введении от числа, полученного в негативном контроле. С использованием данного внутривнутрипеченочного пути ни одно из животных не умирало во время инъекции, и во время аутопсий не наблюдали узелков человеческого происхождения (позитивных в отношении антигена Ki80). Кроме того, отдельную группу животных умерщвляли через одну неделю после либо внутривнутрипеченочной, либо внутриселезеночной инъекции клеток H2Stem - в их печени наблюдаются агрегаты человеческих Ki80-позитивных клеток, демонстрируя то, что клетки H2Stem могут быстро приживаться. Таким образом, лечение на основе клеточной терапии HNALPC и H2Stem, которые вводятся внутривнутрипеченочной инъекцией, является безопасным и безопасным от опухолеобразования.

В более функциональном анализе клетки H2Stem, которые также экспрессируют ген FAH (согласно

ПЦР-ОТ и транскриптомным данным), инъецировали в мышиную модель FRG внутрипеченочно или внутриселезеночно. Данное исследование обеспечивает оценку приживления, повторного заселения и дифференциации клеток H2Stem в печени, не имеющей печеночной функции (у мышей FAN отсутствует функциональный ген FAN, что аналогично тирозинемии у человека), с использованием эквивалентного числа первичных человеческих гепатоцитов в качестве позитивного контроля. Было установлено, что подтверждая данные *in vitro*, клетки H2Stem секретируют человеческий альбумин в мышиную сыворотку крови, где он накапливается на протяжении нескольких недель (фиг. 12А). При морфологическом анализе печени животных, которым внутрипеченочно инъецировали клетки H2Stem или гепатоциты, и анализе на ряд человеческих маркеров посредством иммуноцитохимии клетки, позитивные в отношении Ки80, образуют аналогичные большие агрегаты пролиферирующих и печеночно дифференцированных клеток (Фиг. 12Б), свидетельствуя о том, что клетки H2Stem обеспечивают повторное заселение печени требующимися гепатоактивными клетками. Данные агрегаты клеток являются сильно позитивными в отношении ферментов печени, таких как человеческая аргиназа или ОТС (фиг. 12В). В то же самое время, если другие ферменты, такие как альфа-1-антитрипсин и СYP3A4, также выявляются в данных *in vivo* дифференцированных клетках H2Stem, позитивность в отношении СК-19 исчезает (фиг. 12Г). Эти данные свидетельствуют о том, что при поддержании (или даже увеличении) печеночной активности, которую демонстрируют клетки H2Stem *in vitro*, клетки H2Stem теряют некоторые непеченочные маркеры и приобретают более гепатоподобный профиль (гепатоциты слабо экспрессируют СК-19) после их приживления и пролиферации в печени.

Данные модели *in vivo* подтверждают пригодность клеток H2Stem для медицинских применений, требующих повторного заселения человеческой печени гепатоактивными клетками (как, например, при определенных врожденных метаболических расстройствах печени или острых/травматических больших повреждениях печени, или, в качестве альтернативы, для трансплантации печени), а также возможность применения таких клеток для системной доставки ферментов, факторов роста и других белков, которые экспрессируются в природе функциональными гепатоцитами (таких как белки, имеющие отношение к свертыванию, циррозу или фиброзу в случае пациентов, пораженных расстройствами, имеющими к ним отношение), или непеченочных белков, которые подходящим образом экспрессируются генетически модифицированными клетками H2Stem (таких как антитела или гормоны, которые могут быть полезными в лечении большого разнообразия показаний, таких как рак, диабет или воспалительные расстройства). Обзор дополнительных доклинических моделей и подходов для подтверждения введения гепатоцитов или клеток-предшественников печени (таких как клетки H2Stem) в отношении повторного заселения и регенерации печени был приведен в литературе (см. книгу "Liver Regeneration Basic Mechanisms, Relevant Models and Clinical Applications", Edit.:Udayan M. Apte, Elsevier 2015).

Ссылки

- Alépée N et al., 2014. ALTEX. 31:441-77.
 Allameh A and Kazemnejad S, Clin Biochem (2012). 45: 385-96.
 Azuma H et al., Hepatology (2003). 37: 1385-94.
 Baudoin R et al., Xenobiotica (2013). 43:140-52.
 Bale S et al., 2014. Exp Biol Med. 239:1180-91.
 Benz K et al., J Transl Med (2013). 11: 27
 Bühring HJ et al., Ann N Y Acad Sci (2007). 1106:262-71.
 Busser H et al., 2015. Stem Cells Dev. 2015 Jul 28 Epub ahead of print]

- Caralt M et al., *Organogen* (2014). 10: 250-9.
- Castilho-Fernandes A, et al. 2011. *Exp Mol Pathol*. 91: 664-72.
- Dan YY, *Methods Mol Biol* (2012). 826: 11-23.
- Darwiche H and Petersen BE, *Prog Mol Biol Transl Sci* (2010). 97: 229-49.
- Egloff M et al., 2013. *BMC Proceedings*. 7(Suppl 6):P6.
- Gerets HH et al., *Cell Biol Toxicol* (2012). 28: 69-87.
- Gomez-Lechon MJ et al., *Methods Mol Biol* (2012). 806: 87-97.
- Halladay JS et al., *J Pharmacol Toxicol Methods* (2012). 66: 270-5.
- Herrera MB et al., *Stem Cells* (2006). 24: 2840-50.
- Hoffmann SA et al., *Biotechnol Bioeng* (2012). 109: 3172-81.
- Hook LA, *Drug Discov Today* (2012). 17: 336-42.
- Kabel A, *Int J Hematol Dis* (2014). 1: 22-26.
- Khuu DN et al., *Cell Transplant* (2011). 20: 287-302.
- Lau G and Crichley J, *J Pharm Biomed Anal* (1994). 12: 1563-72.
- Lee J et al., *Biomacromol* (2014). 15: 206-18.
- Lin C et al., 2015. *Expert Opin Drug Discov*. 10:519-40
- Lu Y et al., *Biotechnol Bioeng* (2012). 109: 595-604.
- Lubberstedt M et al., *J Pharmacol Toxicol Methods* (2011). 63: 59-68.
- Massie I et al., *Tissue Eng Part C Methods* (2011). 17: 765-74.
- Masuda H et al., *Cell Transplant* (2012). 21: 2201-14.
- Meng Q, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* (2010). 6: 733-46.
- Mitaka T and Ooe H, *Drug Metab Rev* (2010). 42: 472-81.
- Miyazaki M et al., *Stem Cells* (2007). 25: 2855-63.
- Najimi M et al., *Cell Transplant* (2007). 16: 717-28.
- Najar M et al., 2012. *Stem Cell Rev*. 8: 1188-98.
- Najar M et al., 2013. *Int Immunopharmacol*. 15: 693-702.
- Parveen N et al., *Curr Pharm Biotechnol* (2011). 12: 226-30.
- Pilz G et al., *Stem Cells Dev* (2011). 20: 635-46.
- Raicevic G et al., 2015. *Cytotherapy*. 17: 174-85.
- Russo FP and Parola M, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* (2012). 26: 35-45.
- Sahin MB et al., *Liver Transpl* (2008). 14: 333-45.
- Saito R et al., *Artif Organs* (2011). 35: 80-3.
- Saleh F. et al. in "Progenitor Cells" in *Meth. Mol. Biol.* (2012). 916: 31-45.
- Santamaria E et al., *Methods Mol Biol* (2012). 909: 165-80.

- Scheers I et al. 2012. *Cell Transplant*. 21: 2241-55.
- Schmelzer E et al., *J Exp Med* (2007). 204: 1973-87.
- Shiojiri N and Nitou M, *Methods Mol Biol* (2012). 826: 3-10.
- Sison-Young R et al., 2015. *Toxicol Sci*. Jul 8. pii: kfv136. [Epub ahead of print]
- Sivasubramaniyan K et al., *Stem Cells Dev* (2013). 2: 1944-54.
- Slany A et al., *J Proteome Res* (2010). 9: 6-21.
- Smith CM et al., *J Pharm Sci* (2012). 101: 3989-4002.
- Snykers S et al., *Stem Cells* (2009). 27:577-605.
- Sokal EM, *Cell Prolif* (2011). 44 Suppl 1: 39-43.
- Soto-Gutierrez A et al., *Cell Transplant* (2010). 19: 815-22.
- Sugahara T et al., *Cancer Sci* (2007). 98: 900-8.
- Tanaka M and Miyajima A, *Methods Mol Biol* (2012). 826: 25-32.
- Torres DM and Harrison SA, *Hepatology* (2012). 56: 2013-5.
- Tostoes RM et al., *Hepatology* (2012). 55: 1227-36.
- Vanheel A et al., *PLoS One* (2012). 7: e35544.
- Wang C et al., *Hepatology* (2012). 55: 108-20.
- Watson A et al., *Mol Cancer Res* (2013) 11: 74-85.
- White P et al., *J Biol Chem* (2005). 280: 3715-22.
- Wu X et al., *PLoS Pathog* (2012). 8: e1002617.
- Yalaoui S et al., 2008. *PLoS Pathog*. 4: e1000010.
- Yu J et al., *PLoS One* (2012). 7: e35230.
- Zhu C et al., *J Tissue Eng Regen Med* (2013). 7: 757-66.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка-предшественник, выделенная из зрелой печени и подходящая для применения в постановке диагноза, предупреждении и/или лечении заболеваний печени, отличающаяся тем, что указанная клетка определена как

- (а) позитивная в отношении α -актина гладких мышц (ASMA), альбумина (ALB) и CD140b;
- (б) негативная в отношении белка 2, содержащего домен Sushi (SUSD2), и цитокератина-19 (СК-19);
- (в) позитивная в отношении по меньшей мере одного печеночного маркера, выбранного из альбумина, HNF-3B, HNF-4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 и CYP3A4;
- (г) позитивная в отношении по меньшей мере одного мезенхимального маркера, выбранного из виментина, CD90, CD73, CD44 и CD29;
- (д) позитивная в отношении по меньшей мере одной печеночно-специфической активности, выбранной из секреции мочевины, конъюгирования билирубина, секреции альфа-1-антитрипсина и активности CYP3A4;
- (е) позитивная в отношении по меньшей мере одного маркера, выбранного из ATP2B4, ITGA3, TFRC, SLC3A2, CD59, ITGB5, CD151, ICAM1, ANPEP, CD46 и CD81; и
- (ж) позитивная в отношении по меньшей мере одного маркера, выбранного из MMP1, ITGA11, FMOD, KCND2, CCL11, ASPN, KCNK2 и HMCN1;
- (з) негативная в отношении CD271;
- (и) негативная в отношении по меньшей мере одного маркера, выбранного из ITGAM, ITGAX, IL1R2, CDH5 и NCAM1; и
- (к) негативная в отношении по меньшей мере одного маркера, выбранного из HP, CP, RBP4, APOB, LBP, ORM1, CD24, CPM и APOC1.

2. Клетка по п.1, которая дополнительно определена как позитивная в отношении по меньшей мере одной печеночно-специфической активности, выбранной из сульфотрансферазной активности, триптофан-2,3-диоксигеназной активности, активности карбоксилазы печени, метаболизма аммиака и накопления гликогена.

3. Выделенная популяция клеток для применения в постановке диагноза, предупреждении и/или лечении заболеваний печени, содержащая по меньшей мере 60%, или от 60 до 99%, или от 70 до 90% клеток по п.1 или 2.

4. Популяция клеток по п.3, клетки которой дифференцируются в клетки, демонстрирующие печеночно-специфические активности.

5. Клетка или популяция по любому из пп.1-4, которые модифицированы путем обработки клеток факторами роста и/или трансдукции клеток микроРНК или лентивирусными векторами, экспрессирующими транскрипционные факторы, для которых известно, что они воздействуют на продукцию специфических белков, представляющих терапевтический интерес.

6. Биологический материал для лечения заболевания печени, полученный при генерации клетки или популяции по любому из пп.1-5, представляющий собой кондиционированную среду культуры клеток, белковый экстракт или мембранную везикулу.

7. Композиция для применения в постановке диагноза, предупреждении и/или лечении заболеваний печени, содержащая терапевтически эффективное количество клетки или популяции по любому из пп. 1-5 или биологический материал по п.6.

8. Популяция по п.7, представляющая собой суспензию выделенных клеток для внутripеченочного, внутриселезеночного или внутривенного введения.

9. Применение клетки по п.1 или 2 для лечения заболевания печени.

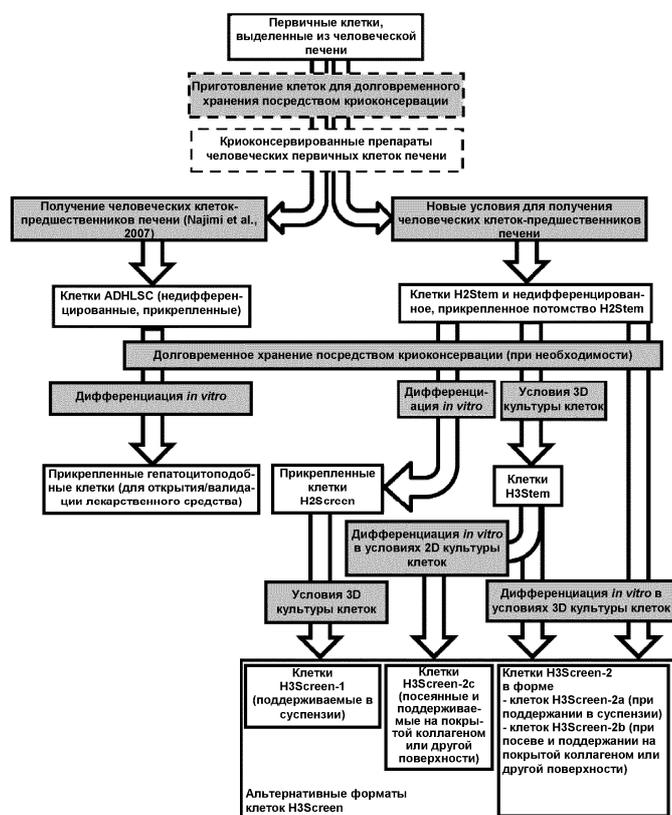
10. Применение популяции клеток по любому из пп.3-5 для лечения заболевания печени.

11. Применение композиции по п.7 для лечения заболевания печени.

12. Применение биологического материала по п.6 для лечения заболевания печени.

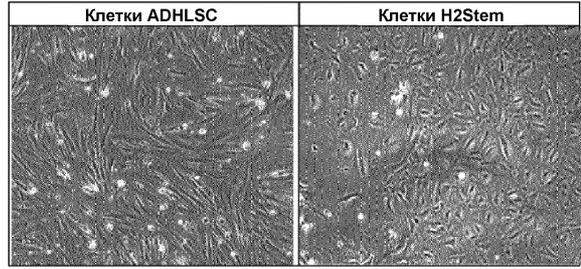
13. Применение по любому из пп.9-12, где заболевание печени представляет собой врожденное нарушение метаболизма в печени, наследственное нарушение свертывания крови, прогрессирующий семейный внутripеченочный холестаз типа 1/2/3, недостаточность альфа-1-антитрипсина, дефект транспортеров клеток печени, порфирию, жировую инфильтрацию печени или другое фиброзное заболевание печени, первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, дегенеративное заболевание печени или острую либо хроническую печеночную недостаточность.

14. Набор для применения в постановке диагноза, предупреждении и/или лечении заболеваний печени, содержащий клетку, популяцию клеток по любому из пп.1-5, композицию по п.7 или биологический материал по п.6, где указанный набор дополнительно включает один или более чем один флакон, содержащий указанную популяцию клеток, указанную композицию или указанный биологический материал и один или более чем один из следующих элементов: устройства, расходные материалы, растворы, химические продукты, биологические продукты и/или инструкции для применения элементов указанного набора.

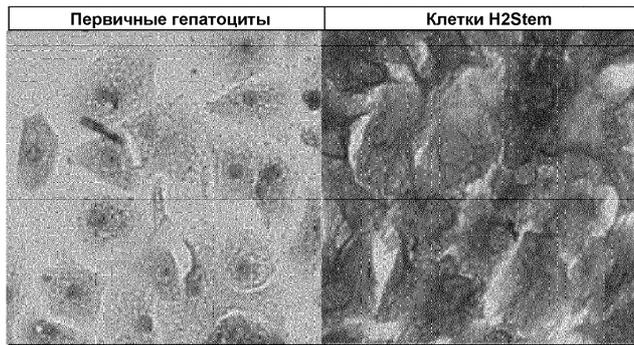


Фиг. 1

А)



Б)

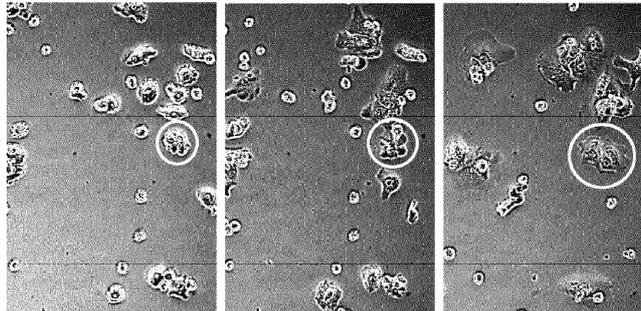


Фиг. 2

А) Через 24 часа

Б) Через 59 часов

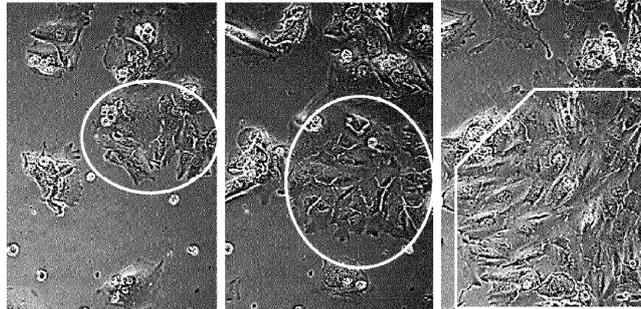
В) Через 85 часов



Г) Через 119 часов

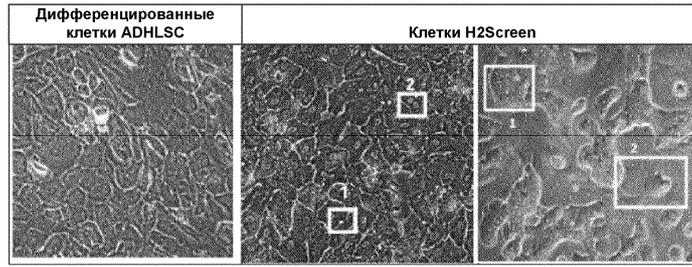
Д) Через 153 часа

Е) Через 186 часов



Фиг. 3

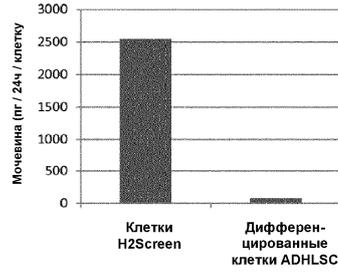
А)



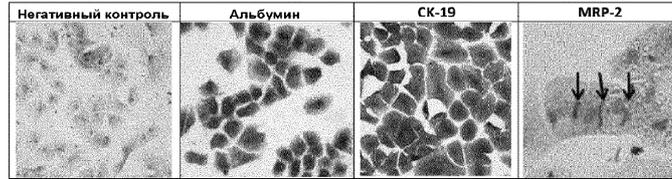
Б)



В)

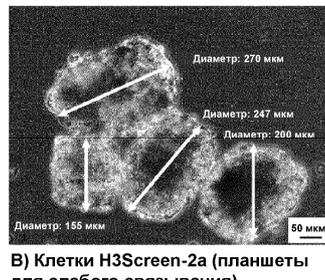


Г)

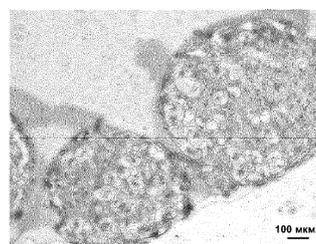


Фиг. 4

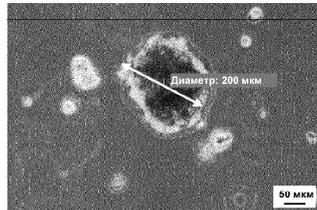
А) Клетки H3Stem



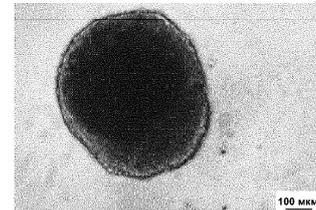
Б) Клетки H3Screen-1



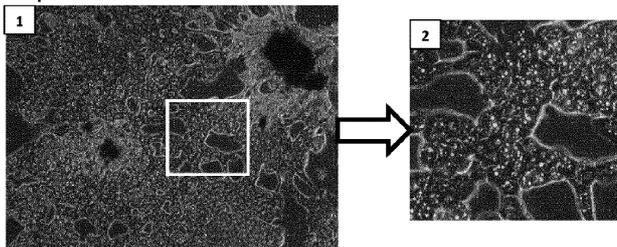
В) Клетки H3Screen-2a (планшеты для слабого связывания)



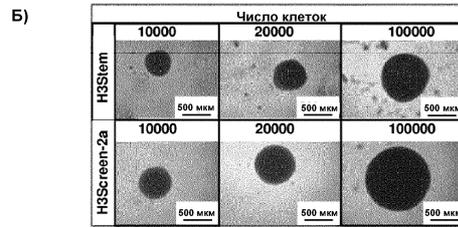
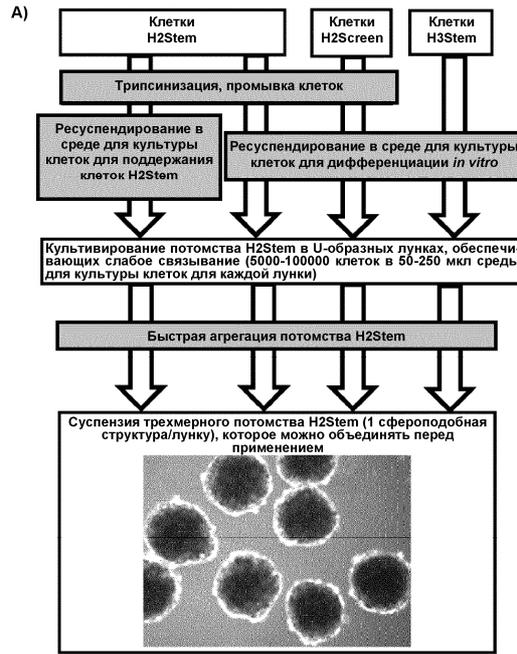
Г) Клетки H3Screen-2a (в U-образных лунках)



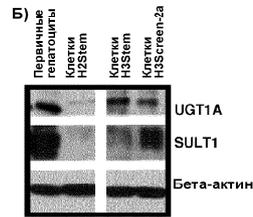
Д) Клетки H3Screen-2b на планшетах, покрытых коллагеном



Фиг. 5

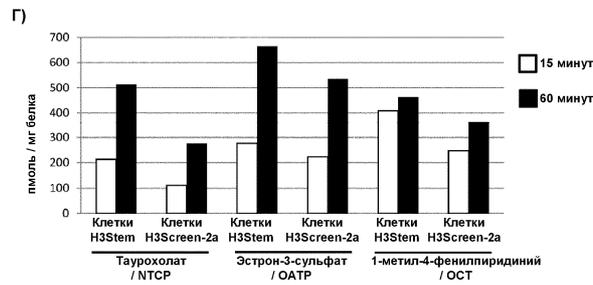


Фиг. 6



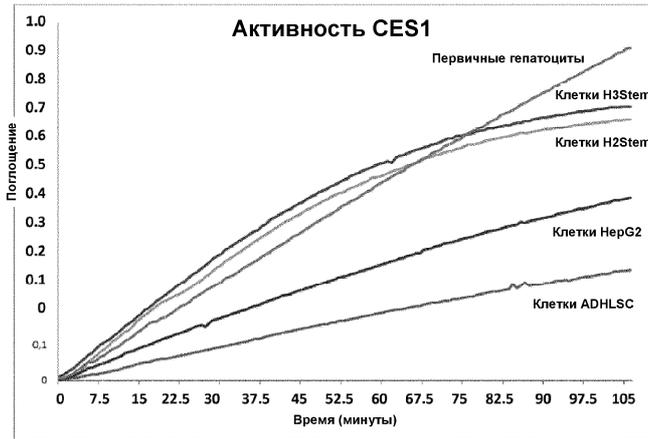
B)

	Первичные гепатоциты	Клетки H2Stem	Клетки H3Stem	Клетки H3Screen-2a
Активность UGT1A	+++	-	++	++
Активность SULT	+++	+	+	++

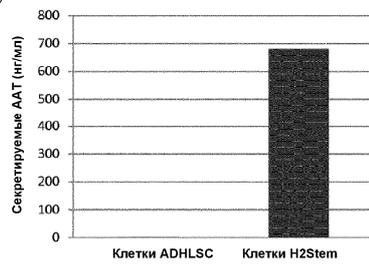


Фиг. 7

А)

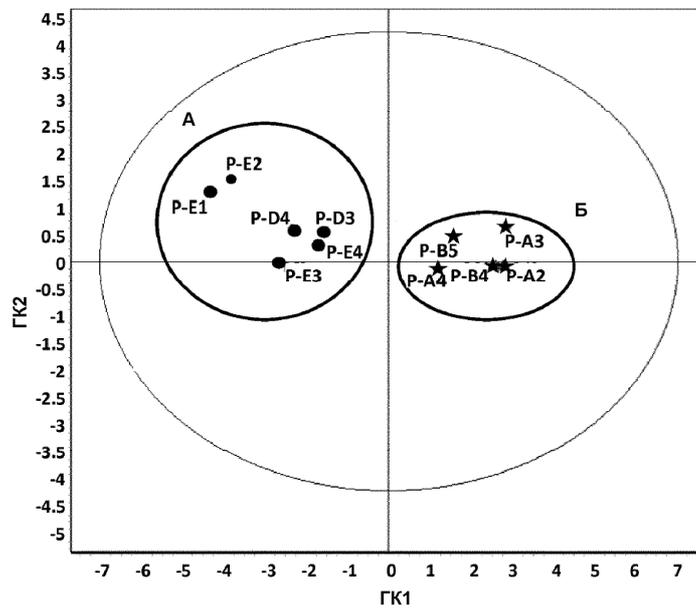


Б)

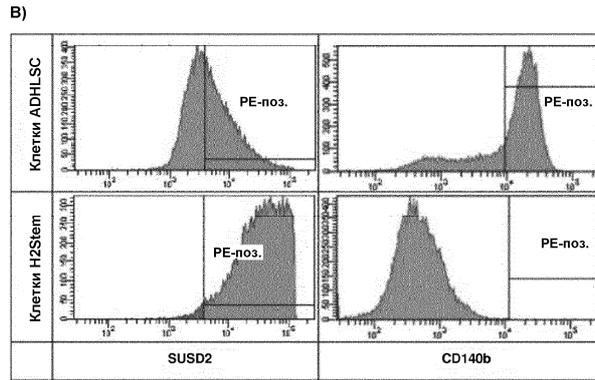
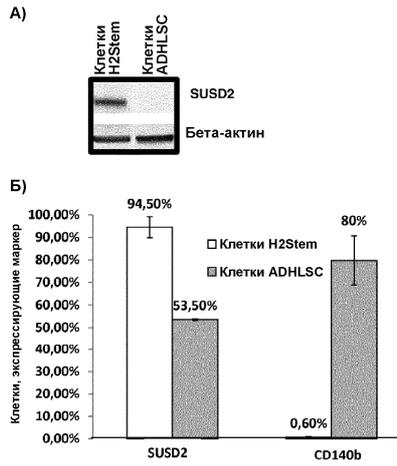


Фиг. 8

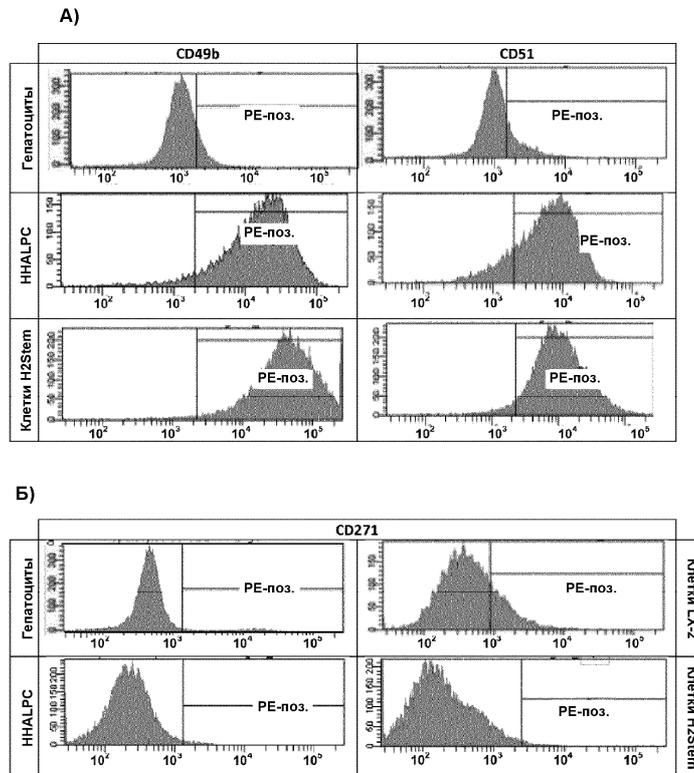
Карты пятен (график счетов для 2 групп)



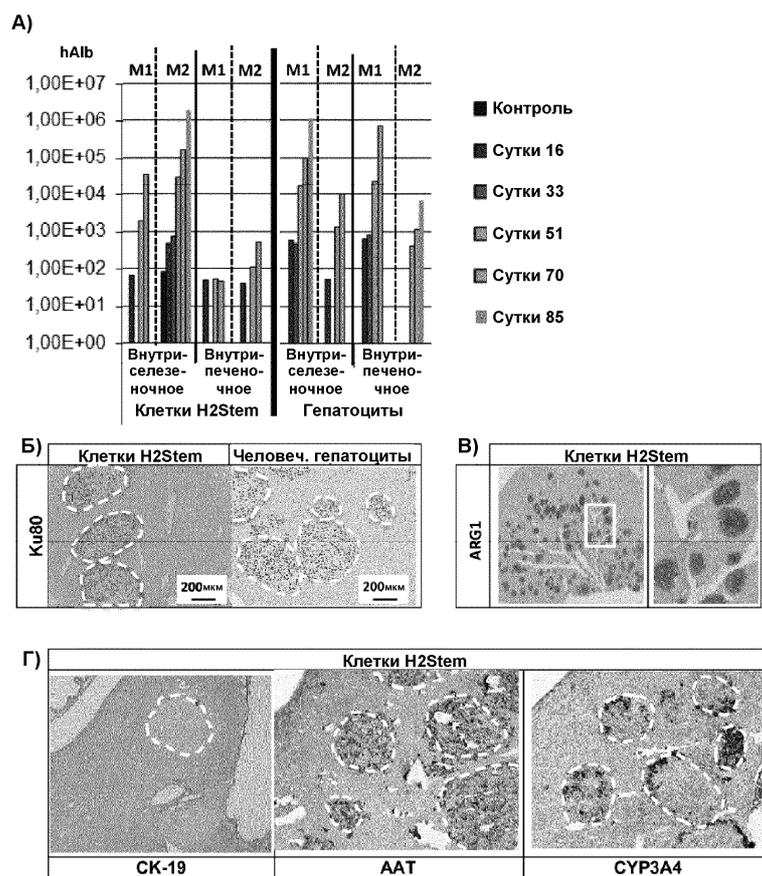
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2