

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900232** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.10.30

(51) Int. Cl. *C12N 5/0735* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.15

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК,
ПРОДУЦИРУЕМЫХ ПЕРЕНОСОМ ЯДЕР СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК**

(31) 2019/0324.2

(32) 2019.04.09

(33) KZ

(96) KZ2019/023 (KZ) 2019.04.15

(71) Заявитель:
**ТОВАРИЩЕСТВО
С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"СентраКор" (KZ)**

(72) Изобретатель:
**Ахметжанов Алау Калиолланович
(KZ)**

(74) Представитель:
Уткелбаев С.Р. (KZ)

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генной инженерии, и может быть применено для получения плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемых переносом ядер соматических клеток. Техническим результатом является получение плюрипотентных стволовых клеток человека, наделенных улучшенным эпигенетическим перепрограммированием. Это достигается тем, что в способе получения плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемых переносом ядер соматических клеток, согласно изобретению проводят энуклеизацию донорского ооцита путем удаления веретена метафазы II без снижения уровня фактора созревания и с образованием цитопласта; осуществляют взаимодействие донорского ядра с экстрактом HVJ-E с последующим взаимодействием цитопласта с донорским ядром с образованием эмбриона SCNT; обрабатывают ингибитором протеинфосфатазы, включающим кофеин, ооцит и/или цитопласт, и/или донорское ядро, и/или эмбрион SCNT; осуществляют воздействие по меньшей мере одного импульса электропорации на эмбрион SCNT с получением активированного эмбриона SCNT; культивируют активированный эмбрион SCNT в первой среде, далее во второй среде, далее в третьей среде с образованием бластоциста; культивируют бластоцисты на фидерном слое с последующим выбором клетки с эмбриональной стволовой клеточной морфологией.

A1

201900232

201900232

A1

Способ получения плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемых переносом ядер соматических клеток

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к генной инженерии, и может быть применено для получения плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемых переносом ядер соматических клеток.

Цитоплазматические факторы, присутствующие в ооцитах зрелой подавленной метафазы II (MII), обладают уникальной активностью по возвращению идентичности трансплантированных ядер соматических клеток в эмбриональное состояние. С момента первоначального открытия у амфибий успех SCNT у ряда различных видов млекопитающих показал, что эта перепрограммирующая активность в энуклеированных ооцитах (цитопластах) является универсальной.

Однако, несмотря на многочисленные применения SCNT в биотехнологии, характер перепрограммирования факторов ооцитов и механизм их действия остаются в значительной степени неизвестными.

У людей SCNT был задуман как метод получения персонализированных эмбриональных стволовых клеток из соматических клеток пациента, которые можно использовать для изучения механизмов заболевания и, в конечном итоге, использования в клеточной терапии.

Известен способ получения плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемые переносом ядер соматических клеток, выбранный в качестве наиболее близкого аналога, у нечеловекообразных приматов, который включает процессы энуклеизации донорского ооцита, ядерного переноса соматических клеток и культивирование эмбриона. Известный способ включает этап энуклеизации клетки ооцитов хозяина примата-реципиента из первого примата с использованием системы визуализации поляризованного света с использованием веретена, не основанной на УФ-излучении, в режиме реального времени в отсутствие окрашивания и способом, который не снижает уровни фактора, способствующего созреванию (MPF) сформировать энуклеированный ооцит. Также включает этап введения ядра соматической клетки донора приматов от второго примата в энуклеированный ооцит в среде, свободной от Ca^{2+} , в условиях, которые уменьшают или устраняют колебания кальция, при этом первый примат и второй примат происходят от одного и того же вида приматов, чтобы произвести восстановленный эмбрион приматов. Также имеются этапы активация восстановленного эмбриона, культивирование восстановленного эмбриона до стадии

бластоцисты, выделение клеток внутренней клеточной массы из бластоцисты, культивирование клеток внутренней клеточной массы на фидерном слое фибробластов, чтобы клетки делились, тем самым продуцируя стволовую клетку примата, которая является плюрипотентной, причем плюрипотентная стволовая клетка (i) способна к четырем или более клеточным делениям; (ii) поддерживает нормальный кариотип в культуре; (iii) способен дифференцироваться в слои эктодермы, мезодермы и энтодермы; и (iv) содержит митохондриальную ДНК, полученную из ооцита первого реципиента примата и ядерный генетический материал из соматической клетки донора примата второго примата /US 7972849 B2, опубл. 05.07.2011 г./.

Недостатком данного аналога является то, что не достигнуто извлечение ESC (NT-ESC) путем переноса ядерных частиц человека.

Задачей изобретения является разработка способа получения плюрипотентных стволовых клеток человека, продуцируемых переносом ядер соматических клеток.

Техническим результатом является получение плюрипотентных стволовых клеток человека, наделенные улучшенным эпигенетическим перепрограммированием (по сравнению с клетками, полученными при перепрограммировании на основе фактора транскрипции, т.е. индуцированные плюрипотентные стволовые клетки) и генетически идентичных субъекту, предоставляющему донорское ядро, более сходных с плюрипотентными стволовыми клетками человека, продуцируемыми экстракорпоральным оплодотворением, чем клеткам, полученным путем перепрограммирования на основе фактора транскрипции.

Это достигается тем, что способ получения плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемых переносом ядер соматических клеток, включающий процессы энуклеизации донорского ооцита, ядерного переноса соматических клеток и культивирование эмбриона, согласно изобретению,

проводят энуклеизацию донорского ооцита путем удаления веретена метафазы II без снижения уровня фактора созревания, и с образованием цитопласта;

осуществляют взаимодействие донорского ядра с экстрактом гемагглютинирующего вируса Японии (HJV-E) с последующим взаимодействием цитопласта с донорским ядром с образованием эмбриона ядерного переноса соматических клеток (далее – SCNT);

обрабатывают ингибитором протеинфосфатазы, включающим кофеин, ооцит и/или цитопласт, и/или донорское ядро и/или эмбрион SCNT,

осуществляют воздействие, по меньшей мере, одного импульса электропорации на эмбрион SCNT с получением активированного эмбриона SCNT;

культивируют активированный эмбрион SCNT в первой среде, далее во второй среде, далее в третьей среде с образованием бластоциста;

культивируют бластоцисты на фидерном слое с последующим выбором клетки с эмбриональной стволовой клеточной морфологией.

В заявленном способе осуществляют воздействие первым импульсом электропорации – импульсом постоянного тока длительностью 50 мкс при $2,7 \text{ кВ см}^{-1}$, и при необходимости повторяют вторым импульсом электропорации, идентичным по параметрам первому импульсу.

В заявленном способе культивируют активированный эмбрион SCNT в первой среде, содержащей, по меньшей мере, 2 мМ 6-диметиламинопурина в течение, по меньшей мере, 4 часов, далее культивируют активированный эмбрион SCNT во второй среде, содержащей, по меньшей мере, 10 мМ трихостатин А в течение, по меньшей мере, 12 часов, далее культивируют активированный эмбрион SCNT в третьей среде, содержащей, по меньшей мере, BSA и β -меркаптоэтанол.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в заявленном изобретении, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в той области, к которой относится настоящее изобретение.

Термин «ядерный генетический материал» относится к структурам и/или молекулам, обнаруженным в ядре, которые содержат полинуклеотиды (например, ДНК), кодирующие информацию о субъекте. Ядерный генетический материал включает, но не ограничиваясь, хромосомы и хроматин. Сюда также относится ядерный генетический материал, продуцируемый клеточным делением, таким как деление родительской клетки на дочерние. Таким образом, клетка включает ядерный генетический материал, полученный из донорной соматической клетки, если она была произведена во время митоза или мейоза из исходной клетки или если ядерный генетический материал был перенесен в энуклеированный цитопласт посредством переноса ядра соматической клетки.

Термин «митохондриальная ДНК» или «мтДНК» относится к ДНК митохондрии, структуре, расположенной в цитоплазме клетки, а не в ядре (где расположены все другие хромосомы). Вся мтДНК наследуется *in vivo* от матери. В каждой митохондрии содержится от 2 до 10 копий генома мтДНК. Митохондриальная ДНК представляет собой двухцепочечную кольцевую молекулу. Она очень мала по сравнению с хромосомами в ядре и включает

только ограниченное количество генов, таких как те, которые кодируют ряд субъединиц в митохондриальном комплексе дыхательной цепи, и гены для некоторых рибосомальных РНК и переносящих РНК. Клетка включает в себя мтДНК, полученную в результате продолжающейся репликации митохондрий на основе цитоплазмы, которые в случае SCNT базируются в цитопласте реципиента.

Термин «метилирование ДНК» относится к постсинтетическому присоединению метильных групп к специфическим участкам на молекулах ДНК; реакция катализируется ферментами, называемыми ДНК-метилтрансферазами, которые специфичны для нуклеотида и положения метилирования. У эукариот метилирование участвует в экспрессии генов и играет роль в разнообразных эпигенетических механизмах, включая развитие, инактивацию X-хромосомы, импринтинг генома, изменчивость ДНК и неконтролируемый рост клеток при раке.

Термин «инактивация X-хромосомы» относится к инактивации одной из каждой пары X-хромосом с образованием тела Барра в соматических клетках особей млекопитающих женского пола. Таким образом, ткани, чья исходная зигота несла гетерозиготные гены, переносимые X, должны иметь индивидуальные клетки, экспрессирующие одну или другую, но не обе из кодируемых X частей гена. Считается, что инактивация происходит на ранних стадиях развития и приводит к мозаичной экспрессии таких генов в организме.

Термин «компенсация дозировки» относится к механизму, который определяет дозировку гена и, соответственно, регулирует экспрессию. У млекопитающих наблюдается моноаллельная экспрессия X-связанных генов, которые различаются по дозе у самок (XX) и самцов (XY). «XIST» относится к гену, кодирующему большую некодируемую РНК, которая, как было показано, необходима для развития X-хромосомы с подавленной экспрессией у самок. РНК XIST составляет около 18 п.о. и не транслируется, она сплайсирована и полиаденилирована. Она также организована в блоки повторяющейся последовательности. Установлено, что РНК XIST стабильно связана *in vivo* с X-хромосомой с подавленной экспрессией. Экспрессия РНК XIST всегда цис-ограничена и связана с X-хромосомой с подавленной экспрессией у самок.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству агента или клетки, которое является достаточным для предотвращения, лечения, уменьшения и/или ослабления симптомов и/или основных причин любого расстройства или заболевания, или количества агента, достаточного для оказания желаемого эффекта на

клетку. В одном варианте исполнения «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество клетки или агента, достаточное для уменьшения или устранения симптома заболевания. В другом варианте исполнения терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для преодоления самого заболевания.

Используемый в заявленном изобретении термин «препарат», «очищенный препарат», «выделенный препарат», «выделенная популяция» или «очищенная популяция» плюрипотентных стволовых клеток человека относится к препарату одной или нескольких клеток, с которыми провели манипуляции для подготовки клеток, которые практически не содержат дополнительных компонентов. В некоторых вариантах исполнения клеточный препарат, как минимум, приблизительно на 60% по массе или количеству свободен от других компонентов, которые присутствуют при производстве клетки, таких как клетки других типов. В различных вариантах исполнения клетка имеет чистоту, как минимум, около 75%, или, как минимум, около 85%, или, как минимум, около 90%, или, по меньшей мере, около 95%, или, по меньшей мере, около 99% по массе или количеству. Очищенный препарат клеток может быть получен, например, путем очистки (например, экстракции) из природного источника, сортировки клеток, активируемой флуоресценцией, или других методов, известных специалисту в данной области. Чистоту можно оценивать любым подходящим методом, таким как сортировка клеток, активируемая флуоресценцией (FACS), или визуальным осмотром.

Клетки, описанные в заявленном изобретении, проходят через серию делений в бластоцисту *in vitro*. Бластоциста содержит внутреннюю клеточную массу (ICM) и трофобласт. Клетки, обнаруженные в ICM, дают начало плюрипотентным стволовым клеткам, которые обладают способностью пролиферировать неограниченно или, если создать должные условия, дифференцироваться во все типы клеток, развивающих организм.

Используемый здесь термин «плюрипотентный» относится к способности клетки дифференцироваться в клетки трех зародышевых слоев: энтодермы (например, внутренней оболочки желудка, желудочно-кишечного тракта, легких), мезодермы (например, мышц, костей, крови, мочеполовой системы) или эктодермы (например, эпидермальной ткани и нервной системы). Плюрипотентные стволовые клетки могут давать начало любому типу эмбриональных или взрослых клеток, включая половые клетки. Однако сами по себе плюрипотентные стволовые клетки не могут развиваться в эмбрион или взрослое животное при трансплантации внутриутробно, потому

что у них нет потенциала развиваться во внезародышевую ткань (например, плаценту *in vivo* или трофобласт *in vitro*).

Плюрипотентные стволовые клетки являются источником мультипотентных стволовых клеток (МПСК), которые возникают в результате спонтанной дифференцировки или в результате воздействия условий индукции дифференцировки *in vitro*. Термин «мультипотентный» относится к способности клетки дифференцироваться и приводить к ограниченному числу различных связанных типов клеток. Эти клетки характеризуются своим мультилинейным потенциалом и способностью к самообновлению. *In vivo* пул МПСК пополняет популяцию зрелых функционально активных клеток в организме. Среди типичных типов МПСК имеются гематопоетические, мезенхимальные или нейрональные стволовые клетки.

Трансплантируемые клетки включают МПСК и более специализированные типы клеток, такие как потомство коммитированных клеток, а также клетки, которые находятся на пути дифференцирования и/или созревания, частично или полностью находящиеся в процессе созревания или дифференцирования. «Потомство коммитированных клеток» дает начало полностью дифференцированной клетке определенной клеточной линии. Типичные трансплантируемые клетки включают клетки поджелудочной железы, эпителиальные клетки, сердечные клетки, эндотелиальные клетки, клетки печени, эндокринные клетки и т.п.

«Фидерный слой» относится к непролиферирующим клеткам (таким как облученные клетки), которые можно использовать для поддержки пролиферации плюрипотентных стволовых клеток. Протоколы для производства фидерных слоев известны в данной области техники и доступны в Интернете, например, на веб-сайте Национального ресурса стволовых клеток, который поддерживается Американской коллекцией типовых культур (ATCC).

Используемый термин «эмбрион» относится, как правило, к клеточной массе, получаемой одним или несколькими делениями зиготы или активированного ооцита с искусственно перепрограммированным ядром. «Морула» - это предимплантационный эмбрион через 3–4 дня после оплодотворения, когда он представляет собой твердую массу, обычно состоящую из 12–32 клеток (бластомеров). «Бластоциста» относится к предимплантационному эмбриону у плацентарных млекопитающих (примерно через 3 дня после оплодотворения у мыши, примерно через 5 дней после оплодотворения у человека) из примерно 30-150 клеток. Стадия бластоцисты следует за морулой, и ее можно отличить по уникальной

морфологии. Бластоциста, как правило, представляет собой сферу, состоящую из слоя клеток (трофэктодермы), заполненной жидкостью полости (полости бластоцелла или полости бластоцисты) и скопления клеток внутри (ICM).

«Геномный импринтинг» относится к эпигенетическому феномену млекопитающего, посредством которого родительское происхождение гена определяет, будет ли он экспрессироваться. Было идентифицировано более 75 импринтированных генов, многие из которых представляют собой некодируемые РНК, которые, как предполагается, контролируют экспрессию связанных генов, кодирующих белки, которые также импринтированы. Как правило, аллеспецифическое метилирование CpG-динуклеотидов представляет собой механизм, который регулирует экспрессию генов импринтированных генов. «Экспрессируемый по материнской линии» относится к гену, который происходит от копии, унаследованной от матери. Импринтированные гены включают, но не ограничиваясь, экспрессируемые матерью импринтированные гены H19, CDKN1C, PHLDA2, DLX5, ATP10A, SLC22A18 или TP73. Экспрессируемые по отцовской линии гены включают, но не ограничиваясь, IGF2, NDN, SNRPN, MEST, MAGEL2 и PEG3. Примерную информацию о последовательности этих генов, включая последовательности нуклеиновых кислот человека, можно найти на веб-сайте, посвященном импринту гена, который доступен в Интернете.

Ламин относится к основному неколлагеновому компоненту базальной пластинки. Это гликопротеин, который имеет одну «А» цепь и две «В» цепи. Ламины – это волокнистые белки, обеспечивающие структурную функцию и регуляцию транскрипции в ядре клетки. Ламины типа А выражены только после гаструляции. Ламины А и С являются наиболее распространенными ламинами типа А и представляют собой сплайс-варианты гена LMNA.

«Фактор, способствующий созреванию» (MPF) относится к гетеродимерному белку, содержащему циклин В и циклин-зависимую киназу 1 (p34cdc2), который стимулирует митотические и мейотические клеточные циклы. MPF способствует входу в митоз из фазы G2 путем фосфорилирования множества белков, необходимых во время митоза. MPF активируется в конце G2 фосфатазой, которая удаляет ингибиторную фосфатную группу, добавленную ранее. Мишени для MPF включают конденсацию, которая обеспечивает конденсацию хроматина; различные микротрубочковые белки, участвующие в формировании митотического веретена; ламины, взаимодействие которых способствует деградации ядерной оболочки, а также гистонов H1 и H3; и матрице Гольджи для фрагментации.

«Ядерное перепрограммирование» приводит к немедленному ингибированию транскрипции в перенесенном ядре соматической клетки и последующему установлению пространственно-временных паттернов экспрессии эмбриональных генов, связанных с нормальным развитием. В настоящее время неопознанные факторы перепрограммирования, присутствующие в ооцитах, способны инициировать каскад событий, которые могут вернуть эпигенетическую программу специализированных соматических клеток обратно в недифференцированное состояние.

«Ядерное ремоделирование» относится к морфологическим и биохимическим изменениям в ядерном материале, происходящим вскоре после введения ядра соматической клетки в энуклеированный, неактивированный, зрелый ооцит. Ядерное ремоделирование включает, но не ограничиваясь, разрушение ядерной оболочки (NEBD), сопровождаемое преждевременной конденсацией хромосом (PCC) и образованием веретена.

«Перенос ядра» относится к вставке донорского ядра в энуклеированную реципиентную клетку-хозяина.

«Теломеры» относится к последовательностям и концам эукариотической хромосомы, состоящей из множества повторов короткой последовательности ДНК в определенной ориентации. Функции теломер включают защиту концов хромосомы, так что хромосомы не соединяются вместе и позволяют репликацию крайних концов хромосом (посредством теломеразы). Число повторов теломерной ДНК на конце хромосомы уменьшается с возрастом, а теломеры играют роль в старении и раке.

«Теломераза» относится к ДНК-полимеразе, участвующей в образовании теломер и поддержании последовательностей теломер во время репликации хромосом.

«Экстракт HVJ-E» относится к инактивированной вирусной оболочке от вируса гемагглютинирования в Японии. HVJ также называют вирусом Сендай.

«6-DMAP» обозначает 6-диметиламинопурин.

«TSA» относится к трихостатину А.

Изобретение работает следующим образом.

Настоящее изобретение описывает производство эмбриональных стволовых клеток человека, полученных в результате переноса ядер соматических клеток. Заявленный способ получения клеток включает: энуклеизацию ооцита человека путем удаления веретена метафазы II любым способом, который не снижает уровни фактора, способствующего созреванию, что продуцирует цитопласт. В ходе данного этапа возможно

использование поляризованного микроскопа. Способ также включает взаимодействие донорского ядра человека с экстрактом HVJ-E, а также взаимодействие цитопласта с донорским ядром человека, в результате чего образуется эмбрион SCNT. Донорское ядро может быть предоставлено в контексте донорской клетки, такой как фибробласт. В некоторых случаях при заявленном способе донорскую клетку можно обработать протеазой, такой как трипсин, в результате чего производится дезагрегированная донорская клетка.

Кроме того, заявленный способ включает обработку человеческого ооцита и/или цитопласта и/или эмбриона SCNT ингибитором протеинфосфатазы. Протеинфосфатазой может быть любой ингибитор протеинфосфатазы, включая кофеин. В некоторых случаях при данном методе ингибитор протеинфосфатазы присутствует как во время энуклеизации ооцита человека, так и при взаимодействии эмбриона SCNT с донорским ядром. В других случаях кофеин присутствует в концентрации, как минимум, 1,25 мМ. В остальных случаях кофеин присутствует в концентрации от 1,25 до 2,5 мМ.

Заявленный способ также включает применение, как минимум, одного импульса электропорации к эмбриону SCNT, тем самым активируя эмбрион SCNT. Активированный эмбрион SCNT культивируют в первой среде, куда входит 6-DMAP. Активированный эмбрион SCNT культивируют во второй среде, которая включает TSA. Активированный эмбрион SCNT затем клонируется в третьей среде, в результате чего образуется бластоциста. Бластоциста культивируется на фидерном слое, а затем отбираются клетки с эмбриональными стволовыми клетками, такими как морфология. Далее клетки с морфологией, подобной эмбриональным стволовым клеткам, дополнительно характеризуются как имеющие ядерную ДНК донорного ядра и донорскую митохондриальную ДНК донора ооцитов.

В некоторых случаях выбираются определенные ооциты, включая ооциты из цикла донорства из 15 или менее ооцитов, из цикла донорства из 10 или менее ооцитов или из цикла доноров ооцитов, обработанных ингибитором GnRH, таким как ганирелекс. Далее этот метод включает сбор ооцитов человека от донора ооцитов.

Плюрипотентные и мультипотентные стволовые клетки человека.

Состав ПСК человека представлен в данном документе. ПСК способны к длительному размножению *in vitro*, не теряя своей способности дифференцироваться в эктодерму, мезодерму и энтодерму. ПСК могут быть сгенерированы и сохранены в ходе их использования и/или распространения,

например, путем замораживания. Эти ПСК могут быть выделены и, следовательно, могут размножаться *in vitro*.

В некоторых примерах человеческие ПСК способны пролиферировать, как минимум, для 4 или более клеточных делений *in vitro*, где ПСК сохраняет свою плюрипотентность. В других вариантах исполнения ПСК способны пролиферировать, по меньшей мере, на 5, 6, 7, 8 или более клеточных делений, где они сохраняют свою плюрипотентность. В других примерах ПСК способны пролиферировать *in vitro* в течение, как минимум, примерно 1 месяца или более, сохраняя плюрипотентность. В дополнительных примерах человеческие ПСК способны пролиферировать *in vitro* в течение, как минимум, примерно 2, 3 или 4 месяцев или более, при этом клетка сохраняет свою плюрипотентность. В других вариантах исполнения ПСК способны пролиферировать *in vitro* в течение, как минимум, приблизительно 5, 6 или 7 месяцев или более, причем сохраняя свою плюрипотентность. В другом варианте исполнения ПСК способны пролиферировать *in vitro* в течение, как минимум, приблизительно 8 месяцев или более, где они сохраняют свою плюрипотентность. В дополнительном варианте исполнения ПСК способны пролиферировать *in vitro* в течение, как минимум, приблизительно 9 месяцев или более, причем сохраняя свою плюрипотентность. Способы получения и культивирования этих клеток более подробно представлены ниже.

Кроме того, плюрипотентные стволовые клетки человека обладают одной или несколькими (включая все) характерной морфологией: высоким ядерным/цитоплазматическим соотношением, заметными ядрышками и компактным образованием колоний. Плюрипотентные клетки могут характеризоваться наличием маркеров дискретной клеточной поверхности или экспрессии фактора транскрипции, который включает одно или несколько (включая все) из следующего: OCT-4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81. Эти клетки также характеризуются экспрессией мРНК всех или одного или нескольких (включая все) следующих факторов: POU5F1 (OCT4), NANOG, SOX-2, TDGF, THY1, FGF4, TERT и LEFTYА. Плюрипотентные стволовые клетки человека также могут характеризоваться экспрессией мРНК и/или белка одного или нескольких (включая все) ядерных факторов (эритроидного происхождения 2) -подобного 3 (NFE2L3), подсемейства ядерных рецепторов 5, группы А, членов 2 (NR5A2), специфичных для лимфоцитов протеинтирозинкиназы (LCK), домена Vset, содержащего ингибитор активации Т-клеток 1 (VTCNI), плюрипотентности, связанной с развитием 4 (DPPA4), семейством носителей растворенного вещества 12 (SLC12A1), C14orf115, миозином VIIA и взаимодействующим белком Rab

(MYRIP), алкогольдегидрогеназой 4 (ADH4) и PR-доменом, содержащим 14 (PRDM14).

В дополнение к профилям экспрессии маркера и фактора транскрипции, плюрипотентные стволовые клетки человека также могут поддерживать нормальный диплоидный кариотип. Можно получить линии клеток XX и XY. Нормальный кариотип – это тот, где присутствуют все хромосомы, обычно присутствующие у вида, и они не были заметно изменены. Нормальный кариотип обычно относится к отсутствию хромосомных транслокаций, делеций или вставок. Нормальный кариотип легко определяется любым методом, известным специалисту в данной области, таким как любая методика связывания, такая как G-banding и/или флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) для обнаружения транслокации. Описанные здесь плюрипотентные стволовые клетки человека имеют кариотип, который стабилен во время культивирования *in vitro*. Кроме того, кариотип остается стабильным, даже когда ПСК культивируют для дифференциации в специфичные для органа клетки и используют для терапевтических целей, таких как трансплантация.

ПСК могут размножаться как самообновляющаяся клеточная линия, а также обеспечивать возобновляемый источник МПСК и других перевиваемых клеток. ПСК могут дифференцироваться при соответствующих условиях в линию зародышевых клеток и жизнеспособные гаметы и три зародышевых слоя зародыша; мезодерма (например, кости, хрящи, гладкие мышцы, поперечно-полосатые мышцы и кроветворные клетки); эндодерма (например, печень, первичная кишка и респираторный эпителий); эктодерма (например, нейроны, глиальные клетки, волосные фолликулы и зубные почки). Специалист в данной области техники знаком с тем, как оценить способность ПСК дифференцироваться в клетки трех зародышевых слоев. В одном примере стволовые клетки имплантируют в животную модель, такую как «голая» мышь, и клеткам позволяют расти и образовывать тератомы. После подходящего промежутка времени тератомы удаляют, разрезают и окрашивают, чтобы определить образовавшиеся слои. Если клетка плюрипотентна, полученная тератома будет содержать ткани из каждого из трех зародышевых слоев. В другом примере ПСК культивируют в определенных условиях *in vitro* для дифференциации в конкретные типы клеток.

Описанные здесь плюрипотентные стволовые клетки человека отличаются от других плюрипотентных стволовых клеток человека, описанных ранее, тем, что они генерируются путем переноса ядерного генетического материала из соматической клетки одного субъекта (такого

как пациент) в клетку реципиента, такую как ооцит, от другого человека, т.е. стволовые клетки получают свой ядерный генетический материал от интересующего субъекта, в то время как энуклеированная клетка реципиента (или хозяина) происходит от другого донора, который обеспечивает митохондриальную ДНК.

Например, ПСК и МПСК, полученные при помощи описанных здесь способов, будут по существу идентичны ядерно-генетическому материалу субъекту, являющемуся источником донорского ядерного генетического материала, и как таковая аутологичная трансплантация дифференцированных клеток, полученных из стволовых клеток, не должна вызывать отторжение иммунитета при пересадке обратно донору.

Показанные здесь ПСК не включают стволовые клетки человека, которые были получены с использованием исключительно оплодотворенных сперматозоидами ооцитов, и, таким образом, имеют равный вклад от двух отдельных субъектов (родителей). Методы определения того, получила ли стволовая клетка свой ядерный генетический материал от одного человека, легко известны специалисту в данной области, включая, но не ограничиваясь, микросателлитный анализ. Описанные здесь плюрипотентные (или мультипотентные) стволовые клетки человека имеют митохондриальную ДНК от одного человека и ядерную ДНК от второго, другого человека. В одном варианте исполнения клетки не включают митохондриальную ДНК от первого представляющего интерес субъекта. Таким образом, в одном примере митохондриальная ДНК и ядерная ДНК плюрипотентных стволовых клеток человека (или мультипотентных стволовых клеток) происходят от разных субъектов одного и того же вида.

Здесь раскрыт очищенный препарат ПСК человека, который (а) способен культивироваться в течение более одного месяца *in vitro*; (б) поддерживает нормальный кариотип; и (в) способен дифференцироваться в половые клетки, эктодерму, мезодерму и энтодерму; где указанные плюрипотентные стволовые клетки получены из энуклеированной клетки от первого донора и ядерного генетического материала от второго донора. Очищенный препарат ПСК человека может обладать одной или несколькими (включая все) следующими характеристиками: (а) способен культивироваться в течение более 4 месяцев *in vitro*; (б) поддерживает нормальный кариотип; (в) способен дифференцироваться в половые клетки, эктодерму, мезодерму и энтодерму; и (г) получает свой ядерный генетический материал от одного субъекта.

Показаны составы, которые содержат одну или несколько изолированных плюрипотентных стволовых клеток человека, обладающих

одной или несколькими (включая все) следующими характеристиками: (а) способны культивироваться более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев *in vitro*; (б) поддерживать нормальный кариотип в культуре; (в) способны дифференцироваться в линии зародышевых клеток, эктодерму, мезодерму и энтодерму; и (г) получают свой ядерный генетический материал от одного субъекта. В некоторых примерах плюрипотентные стволовые клетки могут характеризоваться присутствием митохондриальной ДНК из энуклеированной клетки от первого донора и ядерного генетического материала от второго донора.

Мультипотентные стволовые клетки, полученные из этих плюрипотентных стволовых клеток человека и линий стволовых клеток, показаны в данном документе. Эти мультипотентные клетки не являются плюрипотентными и дают начало клеткам определенной линии. В нескольких вариантах исполнения мультипотентные стволовые клетки способны пролиферировать, как минимум, на 5, 6, 7, 8 или более клеточных делений, при этом сохраняя мультипотентность. В дополнительных вариантах исполнения мультипотентные стволовые клетки способны культивироваться в течение более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев *in vitro*. Раскрытие также охватывает составы, включая, но не ограничиваясь, фармацевтические составы, содержащие изолированные мультипотентные клетки, которые были получены из одной или нескольких плюрипотентных стволовых клеток человека, обладающие одной или несколькими (включая все) следующими характеристиками: (а) имеют возможность культивирования в течение более 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев *in vitro*; (б) поддерживают нормальный кариотип в культуре; (в) способны дифференцироваться в половые клетки, эктодерму, мезодерму и энтодерму; и (г) получают свой ядерный генетический материал от одного субъекта, а их митохондриальную ДНК – от второго субъекта. В одном аспекте плюрипотентные стволовые клетки получены из энуклеированной клетки от первого субъекта, ядерный генетический материал от второго субъекта, а мультипотентные стволовые клетки получены из этих плюрипотентных клеток.

Здесь также представлены плюрипотентные линии стволовых клеток человека, которые обладают одной или несколькими (включая все) из следующих характеристик: (а) способны к 4 или более клеточным делениям *in vitro*; (б) поддерживают нормальный кариотип в культуре; (в) способны дифференцироваться в половые клетки, эктодерму, мезодерму и энтодерму; и (г) получают свой ядерный генетический материал от одного донора-

человека и митохондриальный генетический материал от другого донора-человека.

Здесь представлены очищенные препараты плюрипотентных стволовых клеток человека и мультипотентных клеток, которые были получены при помощи ядерного переноса соматических клеток (SCNT). Успешное поколение таких клеток обычно требует ядерного ремоделирования донорского ядра. Способы, показанные в данном документе, позволяют специалисту в данной области достичь успеха в области ядерного ремоделирования.

Указание на то, что клетка подвергается ядерному перемоделированию, обычно известно специалисту в данной области и включает такие события, как преждевременная конденсация хроматина и разрушение ядерной оболочки.

SCNT обеспечивает способ получения изогенных клеток любого типа клеток от донора. Таким образом, предоставлен препарат, который содержит одну или несколько плюрипотентных стволовых клеток или трансплантируемых клеток, которые генетически соответствуют клетке-донору ядра. Под генетическим соответствием понимается, что 100% генетическое соответствие не требуется, но что есть, как минимум, около 99,5% соответствия. В некоторых случаях генетическое совпадение составляет, как минимум, примерно на 99%, как минимум, примерно на 98%, как минимум, примерно на 97%, как минимум, примерно на 96%, как минимум, примерно на 95% и, как минимум, примерно на 94%. В других случаях генетическое совпадение будет, как минимум, примерно на 90%. В одном примере генетическое совпадение находится в одном главном локусе гистосовместимости (МНС). В других примерах совпадение происходит в одном или нескольких локусах МНС. В остальных примерах генетическое совпадение находится в 2, 3, 4, 5, 6 или более локусах МНС. В дальнейших примерах генетическое соответствие также находится в минорных локусах гистосовместимости.

Клеточные линии также могут быть получены из мультипотентных стволовых клеток или других трансплантируемых клеток, полученных из плюрипотентных стволовых клеток. Здесь также представлены препараты трансплантируемых клеток, полученных из ПСК. Эти клетки включают, но не ограничиваясь, нейроны, кардиомиоциты, гемопоэтические клетки, кератиноциты, островковые клетки, зрелые гаметы (сперматозоиды или ооциты) или любые другие типы клеток, включая клетки любого типа организма. В некоторых вариантах исполнения очищенный препарат трансплантируемых клеток вводят в фармацевтический состав или

используют в методе лечения. Фармацевтический состав может содержать добавки, носители, компоненты среды или другой компонент в дополнение к перевиваемым клеткам человека.

Таким образом, здесь представлен состав человеческих ПСК, МПСК или перевиваемых клеток и полученных из них клеточных линий.

Методы

Предлагаются способы получения и культивирования плюрипотентных стволовых клеток человека. Методы требуют успешного соблюдения следующего: (а) осуществления полного или по существу полного удаления ядерного генетического материала из клетки-реципиента, которая может быть ооцитом, для получения энуклеированного цитопласта хозяина; (б) введение ядра соматической клетки донора в цитопласт энуклеированной клетки-хозяина с образованием эмбриона SCNT; и (с) чтобы и (а), и (б) проводились в таких условиях, что при ядерном ремоделировании введенного ядра соматической клетки в цитоплазме клетки-хозяина и индукции активации полученный эмбрион SCNT проявлял свойства оплодотворенного спермой эмбриона, так что последующее деление митотических клеток привело бы к развитию бластоцисты, из которой могут быть получены ПСК в условиях культивирования, которые обычно поддерживают культуры линий обычных эмбриональных стволовых клеток (ESC), полученных из оплодотворенных спермой эмбрионов, что в итоге приводит к жизнеспособности культуры плюрипотентных стволовых клеток. Обычно ядерный донор и клетка-реципиент (например, ооцит) принадлежат разным субъектам.

Любая подходящая клетка может служить источником для цитопласта энуклеированной клетки-хозяина при условии, что она обеспечивает достаточное ядерное перепрограммирование ядра донорной соматической клетки. В целом, клетка-хозяин представляет собой неоплодотворенный ооцит, но донором также может быть плюрипотентный цитопласт ESC.

Если в качестве клетки для энуклеации используются ооциты, то одним из важных аспектов методологии является использование ооцитов высокого качества. Ооциты высокого качества могут быть получены с использованием протоколов, которые стимулируют донора к образованию ряда жизнеспособных ооцитов. Примеры таких протоколов стимуляции описаны ниже. Другим аспектом, который важен для окончательного успеха в развитии плюрипотентных стволовых клеток, является метод сбора. В одном примере ооциты могут быть собраны с использованием методов, известных в данной области, таких как фолликулярная аспирация, и затем отделены от

загрязняющих клеток крови. В качестве альтернативы, ооциты могут быть получены из ПСК *in vitro*.

В одном примере, когда человеческих доноров стимулируют продуцировать ооциты (например, гормонально), и собирают ооциты, эти собранные ооциты могут находиться в разных фазах. Некоторые ооциты находятся в метафазе I, тогда как другие ооциты находятся в метафазе II. В таких случаях ооциты, находящиеся в метафазе I, могут быть введены в культуру до достижения метафазы II, а затем использованы для энуклеации в качестве клетки-хозяина. Необязательно, чтобы ооциты при культивировании для достижения метафазы II объединялись с ооцитами, которые уже находятся в метафазе II при сборе для пула потенциальных клеток-хозяев. В других случаях для энуклеации используются только ооциты, которые находятся в метафазе II при сборе. Любой из этих ооцитов может быть заморожен для дальнейшего использования.

В некоторых примерах энуклеация клетки-хозяина дополняется при помощи методики, которая позволяет избежать ингибирования или подавления фактора, способствующего созреванию (MPF) или его активности. Энуклеация клетки-хозяина относится к удалению мейотического веретена. Фактор, способствующий созреванию, или MPF – это гетеродимерный белок, содержащий циклин В и циклинзависимую киназу 1 (p34cdc2), который стимулирует митотические и мейотические клеточные циклы. Не будучи связанными теорией, MPF способствует входу в митоз из фазы G2 путем фосфорилирования множества белков, необходимых во время митоза.

Техника, используемая для энуклеации клетки, включает использование любой системы визуализации, которая позволяет избежать снижения уровней MPF или активности. Активность или уровни MPF могут быть определены путем поиска биологических эффектов, которые указывают на то, что активация произошла. Такие эффекты включают конденсацию хроматина и разрушение ядерной оболочки. Кроме того, предполагается, что методы SCNT, используемые здесь, включают в себя не только те, которые непосредственно влияют на уровни или активность MPF, но также те, которые косвенно влияют на уровни или активность MPF.

В некоторых примерах удаление ядерного генетического материала (т.е. энуклеация) осуществляется без снижения уровней фактора, способствующего созреванию (MPF) или его активности. В одном случае это означает, что энуклеация осуществляется без использования процедур энуклеации на основе УФ-излучения, таких как окрашивание Hoechst 33342, с последующей УФ-визуализацией. Один из методов, который можно

использовать вместо Hoechst 33342 – это визуализация веретена в реальном времени. В одном примере метод энуклеации использует систему визуализации шпинделя в реальном времени, такую как система визуализации OOSIGHT™ (CRI, Inc. Woburn, Mass.). Эта система использует длину волны 545 нм и имеет дифракционное ограниченное пространственное разрешение. Релейная оптика равна 0,65x. Обычно система включает в себя интерференционный фильтр с круговой поляризацией с перестраиваемыми жидкокристаллическими поляризационными фильтрами. Однако любая система, которая включает в себя перестраиваемый жидкокристаллический волоконно-оптический кабель, оптоволоконный интерференционный круговой/зеленый интерференционный оптический элемент и, опционально, ПЗС-камеру с программным обеспечением для получения и анализа изображений, которые могут использоваться для этой цели.

Как правило, система может объединять визуализацию поляризованного света с анализом по одной точке путем количественной оценки величины и ориентации двулучепреломления на каждом пикселе в поле почти в реальном времени. Веретено и вителлиновый слой ооцита обладают внутренним свойством, называемым двулучепреломлением, при освещении поляризованным светом, который может использоваться для эффективной визуализации, а также энуклеации. Использование такой системы реального времени позволяет получить неинвазивную визуализацию и полное или практически полное удаление ядерного материала из ооцита или другой клетки. В одном случае все митотическое веретено и связанная с ним ДНК из клетки-хозяина удаляются таким образом, чтобы любой потенциал для генерации партенот был снижен или полностью удален.

Кроме того, воздействие кофеина, ингибитора протеинфосфатазы или ингибитора протеасом, MG-132 повышает активность MPF. MG-132 можно использовать в способах, показанных в настоящем изобретении, в концентрациях, например, от примерно 0,1 до 10 мкМ, или от примерно 0,5 до примерно 10 мкМ, или от примерно 0,5 до примерно 5 мкМ, или от примерно 1 до примерно 3 мкМ, или примерно 1 до примерно 2 мкМ. В некоторых случаях можно использовать 0,2, 2 или 5 мкМ MG-132. Кофеин можно использовать, например, в концентрациях от примерно 0,25 до примерно 25 мМ, или от примерно 0,5 до 10 мМ, или от 0,5 до 2,5 мМ, или примерно 1,25 мМ.

Любая подходящая соматическая клетка может быть использована в качестве источника донорского ядра. Специалистам в данной области будет понятно, что выбор типа соматической клетки от донора, который будет источником ядра для SCNT, не является критическим и может быть выбран

из клеток, которые могут быть удалены в соответствующих количествах от донора без значительного дискомфорта или риска. Типичные соматические клетки включают, но не ограничиваясь, кератиноциты, лейкоциты, клетки кожи и жировые клетки. В одном варианте исполнения донорское ядро соматической клетки может включать модифицированные нуклеиновые кислоты, такие как нуклеиновая кислота (например, ДНК), которая включает рекомбинантный продукт. В одном неограничивающем примере донорское ядро получено от трансгенного животного или животного с искусственно-блокированной мутацией. В дополнительном примере донорная нуклеиновая кислота включает гетерологичную ДНК, которая кодирует белковый продукт, такой как детектируемый маркер, фермент или другой белок. Донорная нуклеиновая кислота также может включать другие нуклеиновые кислоты, такие как рибозимы или антисмысловые последовательности нуклеиновых кислот. Гетерологичная нуклеиновая кислота также может представлять собой регуляторную последовательность, такую как промотор, энхансер, инсулятор или репрессор. Методы модификации нуклеиновых кислот хорошо известны в данной области и включают в себя вставку синтетической ДНК или ДНК другого организма в донорскую нуклеиновую кислоту, удаление одной или нескольких последовательностей ДНК у донора и введение мутаций, таких как точечные мутации, в донорскую нуклеиновую кислоту, донорскую нуклеиновую кислоту. Методы и инструменты для манипулирования нуклеиновыми кислотами хорошо известны в данной области.

В другом примере, для стадии энуклеации или стадии переноса ядра, или для того и другого, может быть использован любой подходящий реагент, который минимизирует потоки кальция в донорской клетке сразу после переноса ядра. Не будучи связанным теоретически, уменьшение потоков кальция после переноса ядер обеспечивает более успешное ядерное перепрограммирование. В одном аспекте предотвращение потоков или колебаний кальция в клетке-хозяине позволяет поддерживать высокие уровни MPF и, таким образом, обеспечивает более успешное ремоделирование ядра.

В нескольких примерах энуклеация и/или перенос ядра осуществляются в среде, не содержащей кальций (Ca^{2+}). В дополнительных примерах энуклеация проводится в среде без магния (Mg^{2+}) и с ионами без кальция. Например, можно использовать не содержащий кальций фосфатно-солевой буфер. Эта среда практически не содержит ионов кальция. В одном варианте исполнения среда, не содержащая кальция, содержит менее чем приблизительно 10^{-6} М катионов кальция (Ca^{2+}), это такая среда, которая

содержит менее чем 10^{-7} М катионов кальция, 10^{-8} М катионов кальция, 10^{-9} М катионов кальция, или практически не содержит катионов кальция. Аналогично, не содержащая магния среда содержит менее чем около 10^{-6} М катионов магния (Mg^{2+}), это такая среда, которая содержит менее чем около 10^{-7} М катионов магния, 10^{-8} М катионов магния, 10^{-9} М катионов магния или практически не содержит катионов магния. Подходящие среды или другие реагенты, которые будут, например, хелатировать внеклеточный кальций и/или магний, такие как этиленгликольтетрауксусная кислота (EGTA) или этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), и которые не содержат добавленных ионов кальция и/или магния или иным образом уменьшают потоки кальция во время этих манипуляций, известны в данной области. Примерные среды описаны ниже. Эти среды и реагенты имеются в продаже, и подходящие среды могут регулярно производиться в лаборатории.

Количество времени, необходимое после введения донорского ядра в клетку-реципиент для образования преждевременной конденсированной хромосомы и веретена, может варьироваться от типа клетки к типу и/или от вида к виду. Чтобы предоставить достаточно времени для формирования преждевременной конденсированной хромосомы и веретена, клетке может потребоваться культивирование в течение от около 0,5 часа до около 10 часов, от около 1 часа до около 8 часов, от около 1,25 часа до около 6 часов, от около 1,5 часов до около 4 часов, от около 1,75 часов до около 3 часов или около 2 часов после введения донорского ядра в клетку реципиента или хозяина.

Соответственно, предусмотрены способы получения плюрипотентных стволовых клеток человека, включающие стадии: (а) энуклеации ооцита человека при помощи системы визуализации веретена, не основанной на УФ-излучении, таким образом, что удаляется достаточное количество ядра и партеногенез не может происходить; и (б) введения ядра соматической клетки человека в энуклеированную клетку, где стадии энуклеации и вставки происходят в присутствии ингибитора протеинфосфатазы, такого как кофеин или MG-132, и где полученный зародыш SCNT активируется при помощи импульса электропорации.

После введения ядра донорской соматической клетки в энуклеированную реципиентную клетку ее культивируют *in vitro*. Способы культивирования бластоцитов или плюрипотентных стволовых клеток человека хорошо известны в данной области. Можно использовать любые среды для культивирования клеток, которые могут поддерживать рост и дифференцирование эмбриональных стволовых клеток человека. В некоторых вариантах исполнения плюрипотентные стволовые клетки

культивируют на фидерном слое, таком как мышинные или человеческие эмбриональные фибробласты. Однако фидерный уровень может включать в себя любую ячейку, которая поддерживает рост ESC. Этот подход создает полностью аутологичную систему культивирования, тем самым устраняя риск загрязнения между видами. Для терапевтического использования методы культивирования могут быть свободны от ксенона (без ксеногенных клеток или компонентов), а также могут избегать использования сыворотки (такой как фетальная бычья сыворотка, FBS) в среде культивирования.

Человеческие плюрипотентные клетки могут быть выделены и впоследствии культивированы в «среде ES», которая поддерживает рост эмбриональных стволовых клеток. Например, среда ES содержит 80% среды Игла в модификации Дульбекко (DMEM; без пирувата, с высоким содержанием глюкозы, Gibco BRL), с 20% фетальной бычьей сывороткой (FBS; Hyclone), 0,1 mM В-меркаптоэтанолом (Sigma), 1% неосновных аминокислот (Gibco BRL).

В одном примере ооцит энуклеируют, используя вышеуказанные методы, и ядро соматической клетки вставляют в энуклеированный ооцит, как описано здесь. Полученную клетку затем культивируют в среде, такой как, но не ограничиваясь, безбелковая среда NECM-9 и культивируют при 37°C в 5-6% CO₂ до использования. Эти культуры могут содержаться под парафиновым маслом. Как только эмбрион SCNT достигает стадии 2 клеток или более, такой как стадия 4, 8 или 16 клеток, клетки могут быть перенесены для дальнейшего культивирования. В одном варианте исполнения эти эмбрионы SCNT культивируют до стадии бластоцисты в среде культивирования, такой как, но не ограничиваясь, среда NECM-9.

В некоторых вариантах исполнения вителлиновый слой отобранных расширенных бластоцист удаляют коротким воздействием (45-60 секунд) 0,5% проназы в среде TH3. В некоторых вариантах исполнения ICM может быть выделен из клеток трофэктодермы с помощью иммунохирургии, где не содержащие вителлиновый слой бластоцисты подвергаются воздействию противорезусной сыворотки кролика в течение около 30 минут при температуре около 37°C. После интенсивного промывания (такого как использование среды TH3) эмбрионы инкубируют в комплементе морской свинки, восстановленном NECM-9 (1:2, об/об), в течение дополнительных 30 минут при температуре около 37 °C. Частично лизированные трофэктодермальные клетки механически диспергируют путем осторожного пипетирования, такого как пипетка с небольшим отверстием (например, с внутренним диаметром около 125 мкл; пипеткой для экстракции, Midatlantic Diagnostics Inc., Marlton, NJ) с последующим промыванием ICM три раза,

например, средой TH3. Изолированные ICM высевают на твердый субстрат, такой как 4-луночные чашки Nunc, содержащие митотически инактивированные питательные слои, которые состоят из эмбриональных фибробластов мыши (mEFs), и культивируют, например, в среде DMEM/F12 (Invitrogen) с глюкозой и без пирувата натрия с добавлением 1% неосновных аминокислот (Invitrogen), 2 mM L-глутамина (Invitrogen), 0,1 mM β -меркаптоэтанола и 15% FBS и поддерживают в условиях при температуре около 37°C, около 3% CO₂, около 5% O₂ и около 92% N₂. В качестве альтернативы, целые, неповрежденные бластоцисты могут быть непосредственно нанесены на mEFs для выделения ESC.

Примерно через 1-7 дней клетки, такие как бластоцисты или ICM, которые прикрепились к слою фидера и инициировали рост, могут быть диссоциированы на небольшие скопления клеток, например, ручной диссоциацией с помощью микроскальпеля, и пересажены на новый субстрат, такой как новые эмбриональные фибробласты (mEFs). После первого пассажа отбирают колонии с морфологией, подобной эмбриональным стволовым клеткам (ESC), для дальнейшего размножения, определения характеристик и хранения при низких температурах. Обычно морфология ESC – это компактные колонии, имеющие высокое отношение ядра к цитоплазме, выступающие ядрышки, острые края и плоские колонии. В некоторых случаях среду меняют ежедневно, и колонии ESC разделяют примерно каждые 5-7 дней вручную или путем дезагрегации в коллагеназе IV (например, около 1 мг/мл, при около 37°C в течение примерно 2-3 минут; Invitrogen) и повторно высеивают собранные клетки на чашки со свежими питательными слоями. Культуры поддерживают при температуре около 37°C, около 3% CO₂, около 5% O₂ и около 92% N₂. В другом случае используют бессывороточные среды.

Затем ПСК можно выделить и поддерживать *in vitro* при помощи стандартных процедур. В одном случае человеческие ПСК выделяют на сливном слое фибробласта в присутствии среды ESC. В другом случае для получения фидерного слоя ксеногенные эмбриональные фибробласты получают от плодов беспородных мышей возрастом 14-16 дней (таких как CF1, доступный от SASCO), но в качестве альтернативы могут использоваться другие штаммы. В качестве альтернативы можно использовать человеческие фибробласты, полученные из кожи взрослого человека или клеток, полученных из фибробластов, полученных из TSC. В другом случае могут быть использованы чашки для тканевых культур, обработанные примерно 0,1% желатином (тип I; Sigma). В отличие от мышинных ПСК-клеток, человеческие клетки ПСК (hPSC) не экспрессируют

специфичный для данной стадии эмбриональный антиген SSEA-1, но экспрессируют SSEA-4, который является другим антигеном гликолипидной клеточной поверхности, распознаваемым специфическим моноклональным антителом.

Диссоциированные ICM клетки можно высевать на питающие слои в свежей среде и наблюдать за образованием колоний. Колонии, демонстрирующие морфологию ESC, отбирают индивидуально и снова разделяют, как описано выше. Получающиеся в результате ПСК затем обычно разделяются механическими методами каждые шесть дней, когда культуры становятся плотными. Ранние клетки пассажа также замораживают и хранят в жидком азоте.

ПСК, а также трансплантируемые клетки могут быть получены и подвергнуты кариотипированию, например, с помощью стандартной техники G-banding и далее сравниваются с опубликованными кариотипами человека.

В других вариантах исполнения иммунохирургическое выделение ICM не используется. Таким образом, бластоцисты культивируют напрямую, без использования каких-либо иммунохирургических методов. Условия культивирования, описанные выше, также можно использовать для культивирования ПСК из бластоцист. Описаны условия культивирования тотипотентных стволовых клеток человека, полученных по обычным протоколам от оплодотворенных ооцитов до бластоцисты. В некоторых вариантах исполнения совместное культивирование эмбрионов SCNT человека с яйцеводными клетками человека приводит к получению высококачественных бластоцист. ICM человека из бластоцист, выращенных в клеточной сокультуре или в среде, которая устраняет потребность в слое питающих клеток, позволяет выделять ПСК человека с помощью тех же процедур, которые описаны выше.

Использование человеческих плюрипотентных стволовых клеток.

Здесь также представлены терапевтические составы, включающие трансплантируемые клетки, которые были получены (произведены) из ПСК в составе, подходящем для введения человеку. В одном случае этот человек является источником соматического ядра. Терапевтические составы включают мультипотентные клетки, специфичные для клонов стволовые клетки, а также частично или полностью дифференцированные клетки, полученные из ПСК, представленных здесь.

Клетки могут быть сопоставлены в одном или нескольких локусах главного комплекса гистосовместимости (МНС). В одном случае полное совпадение в каждом локусе МНС. В другом случае ПСК получают путем переноса ядра из соматической клетки субъекта в энуклеированный ооцит от

второго индивидуума, как описано здесь. Терапевтически эффективное количество плюрипотентных или мультипотентных клеток затем может быть использовано для лечения субъекта.

Предлагаются способы лечения заболевания, которые включают трансплантацию ПСК или клеток, полученных из ПСК, человеку, страдающему заболеванием, характеризующимся поврежденными или дегенеративными соматическими клетками. Такие клетки могут быть мультипотентными клетками или любым другим типом трансплантируемых клеток.

Описанные здесь человеческие ПСК полезны для генерации желаемых типов клеток. В некоторых вариантах исполнения ПСК используются для получения мезенхимальных, нервных и/или гемопоэтических стволовых клеток. В других вариантах исполнения ПСК используются для генерирования клеток, включая, но не ограничиваясь, клетки поджелудочной железы, печени, костей, эпителия, эндотелия, сухожилий, хрящей и мышц и их клетки-предшественники. Таким образом, трансплантируемые клетки, полученные из ПСК, можно вводить индивидууму, нуждающемуся в одном или нескольких типах клеток, для лечения заболевания, расстройства или состояния. Примеры заболеваний, расстройств или состояний, которые можно лечить или предотвращать, включают неврологические, эндокринные, структурные, скелетные, сосудистые, мочевые, пищеварительные, кожные, кровяные, иммунные, аутоиммунные, воспалительные, почечные заболевания, заболевания мочевого пузыря, сердечно-сосудистые заболевания, рак, заболевания кровообращения, кроветворения, метаболические, репродуктивные и мышечные заболевания, расстройства и состояния. В некоторых вариантах исполнения гематопоэтические стволовые клетки, полученные из ПСК человека, используют в лечении рака. В некоторых вариантах исполнения эти клетки используются для реконструктивных целей, таких как восстановление или замена тканей или органов.

Описанные здесь ПСК могут быть использованы для создания мультипотентных стволовых или трансплантируемых клеток. В одном случае трансплантируемые клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки. Мезенхимальные стволовые клетки дают начало очень большому количеству различных тканей. Мезенхимальные стволовые клетки, способные дифференцироваться в кости, мышцы, сухожилия, жировую ткань, стромальные клетки и хрящи, также были выделены из костного мозга. Известен способ выделения мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга. В других случаях эпителиальные клетки-предшественники

или кератиноциты можно получить для использования в лечении кожных состояний и слизистой оболочки кишечника. Клетки также можно использовать для получения клеток-предшественников печени или клеток-предшественников почки. Клетки также можно использовать для получения клеток-предшественников внутреннего уха.

Трансплантируемые клетки также могут быть нейронными клетками. Объем суспензии клеток, такой как суспензия нейронных клеток, вводимой субъекту, варьируется в зависимости от места имплантации, цели лечения и количества клеток в растворе. Обычно количество клеток, вводимых субъекту, является терапевтически эффективным количеством. Например, в случае лечения болезни Паркинсона трансплантация терапевтически эффективного количества клеток обычно приводит к снижению количества и/или тяжести симптомов, связанных с этим расстройством, например, ригидности, акинезии и нарушения походки. В одном случае пациенту с тяжелой болезнью Паркинсона требуется, как минимум, около 100 000 выживших дофаминовых клеток на трансплантируемый участок, чтобы достичь существенный положительный эффект от трансплантации. Поскольку выживаемость клеток при трансплантации мозговой ткани в целом низкая (5–10%), вводится, как минимум, 1 млн. клеток, например, от 1 до 4 млн. дофаминергических нейронов. В одном варианте исполнения клетки вводят в мозг субъекта. Клетки могут быть имплантированы в паренхиму головного мозга, в пространство, содержащее спинномозговую жидкость, такое как субарахноидальное пространство или желудочки, или внешне. Таким образом, в одном случае клетки трансплантируют в области субъекта, которые не находятся в центральной нервной системе или периферической нервной системе, такие как чревной ганглий или седалищный нерв. В другом варианте исполнения клетки трансплантируют в центральную нервную систему, которая включает в себя все структуры твердой мозговой оболочки. Специалисты в данной области знакомы с методами введения клеток в мозг субъекта.

Человеческие ПСК, полученные при помощи методов, указанных в настоящем описании, способны вносить вклад в зародышевую линию. Таким образом, соматические клетки от интересующего субъекта могут быть использованы для получения ES-клеток, которые впоследствии могут быть дифференцированы в ооциты или сперматозоиды. Эти ооциты или сперматозоиды могут затем использоваться для оплодотворения, что позволяет бесплодному субъекту производить детей, которые генетически связаны с субъектом. Кроме того, яйцеклетки, полученные из клеток ES, используются в исследованиях. Например, эти яйцеклетки могут, в свою

очередь, использоваться для создания клеток ES, полученных из SCNT. Такая доступность этих ооцитов позволяет уменьшить использование донорских человеческих яйцеклеток для исследований.

Клетки, полученные способами, раскрытыми в данном документе, такими как ПСК, также используются для тестирования интересующих агентов, например, для определения, влияет ли агент на дифференцирование или пролиферацию клеток. Например, ПСК связываются с агентом, и способность клеток дифференцироваться или пролиферировать оценивается в присутствии и в отсутствие агента. Таким образом, клетки, полученные способами, указанными в настоящем документе, также можно использовать для скрининга фармацевтических агентов при выборе агентов, которые влияют на конкретные типы клеток человека, таких как агенты, влияющие на нейронные клетки. Клетки, полученные способами, представленными в настоящем описании, также можно использовать для скрининга тестируемых соединений для выбора тех, которые влияют на дифференцирование. Тестируемое соединение может быть любым представляющим интерес соединением, включая химические соединения, небольшие молекулы, полипептиды или другие биологические агенты (например, антитела или цитокины). В нескольких случаях производится скрининг панели потенциальных агентов, таких как скрининг цитокинов или факторов роста.

Примеры.

Следующие примеры демонстрируют возможность осуществления заявленного изобретения. В свете данного раскрытия специалисты в данной области поймут, что вариации этих примеров и других примеров указанного способа были бы возможны без лишних экспериментов.

Пример 1 – Обзор.

Перепрограммирование соматических клеток в плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки (ESC) с помощью переноса ядер соматических клеток (SCNT) долгое время предполагалось сгенерировать с помощью ESC (NT-ESCs), переносимых с использованием переноса ядер, для изучения механизмов заболевания и разработки методов лечения. До сих пор все попытки произвести человеческие NT-ESC не увенчались успехом, в основном из-за раннего эмбрионального блока эмбрионов SCNT. Здесь раскрыто определение преждевременного выхода из мейоза в ооцитах человека и субоптимальной активации в качестве ключевых факторов, ответственных за остановку эмбриона. Далее раскрыты оптимизированные методы SCNT, предназначенные для преодоления этих недостатков и

позволяющие впервые получить человеческие NT-ESC. NT-ESC показали нормальные диплоидные кариотипы и унаследовали свой ядерный геном исключительно от родительских соматических клеток. Профили экспрессии и дифференцировки генов в человеческих NT-ESC были сходны с подлинными ESC, происходящими из эмбрионов, что предполагает эффективное превращение соматических клеток в плюрипотентность.

Основным препятствием на пути создания человеческих NT-ESC является эмбриональный блок эмбрионов SCNT человека до развития стабильных NT-ESC. Как правило, эмбрионы SCNT не могут продвигаться дальше 8-клеточной стадии, вероятно, из-за неспособности активировать критические эмбриональные гены из соматического ядра. В тех немногих случаях, описывающих эмбрионы SCNT, достигающие стадии бластоцисты, такие эмбрионы не могли производить стабильные ESC.

Хотя основная причина этого раннего блока в развитии остается неясной, в этих исследованиях механически применяются протоколы SCNT, разработанные для других видов ооцитов человека. Ранее было продемонстрировано, что для того, чтобы быть эффективными, процедуры SCNT должны быть адаптированы к приматам. Было достигнуто перепрограммирование фибробластов кожи взрослых макаков-резус в NTESC.

Удаление ядерного генетического материала ооцита человека (хромосом) отрицательно влияет на способность цитопласта вызывать перепрограммирование. Однако, когда ядро соматической клетки трансплантировали в интактный ооцит с полным набором хромосом, полученные полиплоидные эмбрионы смогли преодолеть блок развития и продуцировать ESC.

Также было отмечено, что остановка мейоза в ооцитах МП человека является нестабильной и может быть нарушена механическими манипуляциями. Кроме того, сохранение специфической активности мейоза в цитопласте является критическим для ядерного ремоделирования после трансплантации межфазного ядра соматической клетки. Ядерное ремоделирование положительно коррелирует с дальнейшим развитием эмбрионов SCNT после активации. Поэтому систематически оценивались модификации энуклеации ооцитов и введения донорских клеток, которые сохраняют факторы мейоза в цитопластах человека.

Здесь показано, что стандартных процедур искусственной активации недостаточно для поддержки последующего развития человеческого SCNT и что изменения в SCNT значительно улучшают образование бластоцисты эмбрионами человеческого SCNT. Несколько человеческих NT-ESC линий были получены из этих эмбрионов. Эти линии NT-ESC были подтверждены

тем, что их ядерная ДНК была идентична ядерным донорским соматическим клеткам, но их митохондриальная ДНК была идентична ДНК реципиентных ооцитов. Наконец, обширные анализы плюрипотентности были выполнены на полученных человеческих NT-ESCs, и их полное перепрограммирование было проверено.

Пример 2 – Оптимизация протокола SCNT у нечеловекообразных приматов.

Ооциты МП человека подвержены преждевременной активации, вызванной удалением и реинтродукцией мейотических веретен. Большая часть ооцитов, подвергнутых переносу веретена человека (ST), подвергалась самопроизвольному возобновлению и выходу из мейоза до оплодотворения, что позволяет предположить, что механические манипуляции вызывают снижение активности мейотической киназы. Кроме того, разрушение ядерной оболочки (NEBD) и преждевременная конденсация хромосом (PCC), которые происходят сразу после введения ядра межфазной соматической клетки, улучшают развитие SCNT.

Было высказано мнение, что задержка развития эмбрионов SCNT человека и их неспособность продуцировать NT-ESC могут быть вызваны отсутствием или неполным NEBD и PCC. Поэтому необходимы новые протоколы переноса ядер, которые минимизируют преждевременную активацию.

Было показано, что слияние клеток, индуцированное электропорацией, доставляет преждевременный активационный стимул в цитопласт, что приводит к выходу из мейоза. Ранее описанный протокол переноса веретена заменял электрофузию гемагглютинирующим вирусом Японии (HVJ-E). Использование HVJ-E было критически важным для поддержания цитопластов при мейозе. Это слияние клеток на основе HVJ-E затем использовали для развития эмбрионов SCNT макака-резуса.

Скорость слияния составляла 100% при использовании либо электрофузии, либо HVJ-E, что позволяет предположить, что введение ядер донорских клеток можно эффективно использовать для обоих подходов. Межфазные соматические ядра, введенные с помощью электрофузии, сохраняли неповрежденную ядерную мембрану, как обнаружено окрашиванием ламином В, без заметной преждевременной конденсации хромосом. Напротив, ядра слитых клеток HVJ-E подвергались быстрой NEBD с последующей PCC в течение 30 минут после слияния. Эффективные NEBD и PCC были связаны формированием веретенообразных структур, легко обнаруживаемых неинвазивным исследованием при помощи

поляризованного микроскопа. Эти результаты согласуются с преждевременной активацией и снижением активности мейотических факторов, вызванных электропорацией. Однако неожиданным результатом было то, что эмбрионы SCNT, полученные слиянием HVJ-E, не смогли продвинуться дальше стадии компактной морулы, в то время как небольшая часть эмбрионов SCNT контрольной группы, полученных при помощи электрофузии, достигла стадии бластоцисты.

Эти результаты показали, что электрофузия будет полезна для перепрограммирования SCNT и может действовать как дополнительный стимул активации. В результате, слитые с HVJ-E эмбрионы SCNT подвергались электропорации до стандартного лечения активацией иономицином/DMAP. Действительно, этот метод дал эмбрионы SCNT, способные достигать стадии бластоцисты со скоростью, аналогичной контрольной группе. Неожиданно, что на скорость образования бластоцисты SCNT не влияли даже случаи, когда воздействие иономицина было опущено, и эмбрионы SCNT активировали электропорацией с последующей обработкой DMAP. Вместе эти данные указывают на то, что, хотя стимул электропорации не требуется для слияния клеток, он важен для правильной активации цитопласта после SCNT.

Ингибиторы гистондеацетилазы, такие как трихостатин А, были связаны с улучшенным перепрограммированием SCNT у нескольких видов млекопитающих. Усовершенствованное развитие эмбрионов SCNT обезьяны до бластоцист наблюдали, когда эмбрионы обрабатывали 37,5 нМ TSA (от 4% до 18%).

Однако качество таких бластоцист и их способность вызывать стабильные ESC оставались неизвестными до настоящего раскрытия. В общей сложности 16 бластоцист SCNT обезьяны, полученных обработкой TSA, высевали на митотически инактивированные питательные слои мышинных эмбриональных фибробластов (mEF). Ни один из этих бластоцист не продуцировал линии NT-ESC (Таблица 1). Более низкие концентрации TSA, а также более короткое время воздействия TSA не влияли на развитие бластоцисты SCNT обезьяны и изоляцию ESC. Снижение концентрации TSA до 10 нМ или сокращение времени воздействия TSA с 24 до 12 ч не влияло на частоту бластоцист (Таблица 1). Примечательно, что только бластоцисты SCNT, полученные с 10 нМ TSA, поддерживали образование стабильных линий NT-ESC обезьяны (Таблица 2).

Таблица 1.
Развитие эмбриона SCNT обезьяны после обработки трихостатином А (TSA)

Концентрация TSA и время	Получено	N	Состав (%)	PN (%)	8-клеточный (%)	CM (%)	Бластоцисты (%)
37,5 нМ в течение 24 часов	39	511	503 (98.4)	498 (99.0)	418 (90.3)	107 (23.1)	85 (18.4)
10 нМ в течение 24 часов	10	108	104 (95.4)	104 (100)	100 (97.1)	33 (32.0)	25 (24.3)
10 нМ в течение 12 часов	37	571	567 (99.3)	535 (94.4)	494 (93.7)	147 (27.9)	99 (18.8)
5 нМ в течение 12 часов	16	212	210 (99.1)	207 (98.6)	192 (92.8)	58 (26.0)	30 (14.5)

Таблица 2.
Выделение NT-ESC обезьяны после обработки TSA

Концентрация TSA	Длительность TSA	Кол-во культивированных бластоцист	Кол-во NT-ESC (%)
37,5 нМ	24 часа	16	0
10 нМ	24 часа	4	0
	12 часов	23	3 (13%)
5 нМ	12 часов	7	0

Пример 3. Получение бластоцист SCNT человека и линий NT-ESC.

Данный пример описывает производство бластоцист SCNT человека и линий NT-ESC. Ооциты МП человека собирали у здоровых добровольцев (возраст: 23-33 года) и подвергали протоколу SCNT, который давал наилучшие результаты в модели нечеловекообразных приматов. Ооциты извлекали, следуя стандартным протоколам стимуляции яичников и трансвагинальному извлечению фолликулов. Дермальные фибробласты эмбрионального происхождения (HDF-f), синхронизированные в фазе клеточного цикла G0/G1, использовались в качестве ядерных доноров. Удаление веретена и слияние донорских клеток с помощью HVJ-E проводили в течение 60 минут после извлечения ооцитов.

Большинство ооцитов (95,2%: 60/63) выжили после удаления веретена МП, проведенного с помощью поляризованного микроскопа, а ядра донорских фибробластов были введены при помощи слияния HVJ, описанного выше. Эффективность синтеза составила 100%. Сразу после подтверждения слияния ооциты активировали электропорацией/DMAP (4 часа) и подвергали воздействию 10 нМ TSA в течение 12 часов. Большинство эмбрионов SCNT человека (81,7%, 49/60) сформировали один или два пронуклеуса во время удаления TSA. Несколько более высокая доля расщепленных зародышей (86,7% 52/60) указывает на то, что у некоторых

эмбрионов SCNT не было видимых пронуклеусов во время исследования. Большинство расщепленных эмбрионов развивалось до 8-клеточной стадии (61,5%, 32/52), но еще меньше прогрессировало до компактной морулы (CM) (13,5%, 7/52) и бластоцисты (11,5%, 6/52) этапы.

Активация эмбриональных генов и транскрипция из ядра трансплантированных соматических клеток необходимы для развития эмбрионов SCNT за пределами 8-клеточной стадии. Следовательно, эти результаты свидетельствуют о том, что данные методы успешно перепрограммируют соматические клетки человека в эмбриональное состояние. Тем не менее, бластоцисты SCNT человека демонстрировали плохо организованную трофэктодерму и небольшие или не обнаруживаемые массы внутренних клеток (ICM). Кроме того, крупные бластомероподобные клетки были исключены из числа бластоцист SCNT. Шесть из этих бластоцист SCNT высевали на питательный слой для проверки их способности поддерживать деривацию ESC. Четыре из бластоцист прикреплены к фидерным клеткам mEFs, но только у одного был обнаружен рост, который затем был дополнительно пассирован. Дальнейшее пассирование не позволило получить стабильные ESC-подобные клетки.

Очевидно, что для получения жизнеспособных NT-ESC необходима дальнейшая оптимизация протоколов SCNT человека. Соматические ядра были введены в интактные ооциты МII человека, и их свойства двойного лучепреломления были оценены при помощи поляризованного микроскопа. Все соматические ядра, введенные в ооциты МII, эффективно образовывали веретенообразные структуры, которые были видны в течение 30 минут после слияния (17/17). Однако образования веретена не наблюдалось, когда ядра соматических клеток были слиты с энуклеированными ооцитами человека (0/3). Эти наблюдения согласуются с другими недавними наблюдениями того, что ооциты МII человека подвергаются преждевременной активации, вызванной энуклеацией.

Воздействие на ооциты обезьяны кофеина, ингибитора протеинфосфатазы, эффективно защищало цитопласт от преждевременной активации и улучшало развитие эмбрионов SCNT. Таким образом, ооциты человека содержались в 1,25 мМ кофеина во время энуклеации и слияния соматических клеток. Как и ожидалось, ядра соматических клеток, введенные в цитопласты ооцитов в этих условиях, эффективно образовывали веретенообразные структуры, обнаруживаемые под микроскопом с двойным лучепреломлением (83,3%, 10/12). Что еще более важно, развитие бластоцисты у эмбрионов, обработанных кофеином, также заметно улучшилось (23,5%) по сравнению со стандартной группой SCNT.

Человеческие бластоцисты SCNT в этой группе содержали видимые, заметные ICM, сходные с наблюдаемыми для эмбрионов ЭКО.

Примечательно, что, когда восемь бластоцист SCNT, полученных при воздействии кофеином, были использованы для выделения ESC, все они прикреплялись к mEF и 4 дали ICM-рост. Все четыре роста ICM дали начало ESC-подобным колониям при ручном расщеплении mEF на свежих чашках. Последующий пассаж привел к эффективному размножению стабильных колоний ESC с типичной морфологией и характеристиками роста. Этот удивительно высокий уровень деривации ESC был аналогичен тому, о котором сообщалось в нашем предыдущем исследовании с бластоцистами человека, производными в результате ЭКО (50%), и был даже выше, чем у манипулированных эмбрионов ST (38%).

В совокупности наши результаты показывают, что протоколы, усовершенствованные в модели NHP, поддерживают развитие бластоцисты для эмбрионов SCNT человека. Однако низкое качество бластоцист SCNT человека препятствовало выделению ESC. Включение кофеина во время энуклеации и слияния для противодействия спонтанной активации ооцитов МП человека улучшало развитие бластоцисты и поддерживало образование ESC.

Пример 4 – Воспроизводимость результатов SCNT человека.

Все 4 линии NT-ESC человека согласно описанному выше способом были получены из ооцитов, извлеченных от одного конкретного донора яйцеклеток. Восемь зрелых ооцитов МП были извлечены у этого донора после одного цикла стимуляции и использованы для SCNT. Используя раскрытые методы, было получено 5 бластоцист (62,5%), которые дали 4 линии NT-ESC (80%). Кроме того, все четыре клеточные линии были получены с использованием фетробластов кожи плода в качестве ядерных доноров. В контексте создания специфичных для пациента плюрипотентных стволовых клеток терапевтический потенциал SCNT зависит от воспроизводимости результатов с различными соматическими клетками, полученными от пациента, и различными донорами ооцитов.

Культура фибробластов кожи была получена от пациента с синдромом Лея. В общей сложности 15 и 5 МП ооцитов были собраны у двух неродственных доноров яйцеклеток (доноры №11 и №12, соответственно). Указанные способы SCNT были затем осуществлены при помощи ядер из фибробластов кожи. Все ооциты пережили энуклеацию и успешно слились с донорскими клетками. После активации и культивирования от каждого донора яйцеклеток были получены 4 (27%, 4/15) и 3 (60%, 3/5) бластоцисты,

соответственно. После посева на mEF и ручного пассирования были установлены две стабильные линии NT-ESC, по одной от каждой когорты яйцеклеток. Таким образом, эти результаты подтверждают воспроизводимость и эффективность указанных протоколов SCNT с другими ядерными донорскими клетками и другой когортой ооцитов человека.

Пример 5 – Ретроспективный анализ факторов, влияющих на успешность SCNT человека.

Хотя манипуляции и лечение SCNT строго контролировались, качество и количество человеческих ооцитов, полученных от разных доноров яйцеклеток, значительно варьировались. Избыточное количество ооцитов, извлеченных из цикла, как правило, связано с плохими клиническими результатами ЭКО.

Был проведен ретроспективный анализ процедур стимуляции яичников с целью определения влияния количества ооцитов, извлеченных за цикл, на развитие эмбриона SCNT человека и результаты деривации NT-ESC. Циклы донорства ооцитов были разделены на три группы в зависимости от диапазона собранных зрелых ооцитов МП – 10 или менее ооцитов за цикл (5 доноров), от 11 до 15 ооцитов (2 донора) и более 16 ооцитов за цикл (3 донора). Хотя выживаемость после энуклеации, слияния, образования пронуклеусов и расщепления эмбрионов SCNT в этих группах была одинаковой, больше эмбрионов получено от доноров, производивших ≥ 16 МП ооцитов/цикл, заблокированных после 8-клеточной стадии, чем в двух других группах. Кроме того, качество бластоцист SCNT также отрицательно коррелирует с количеством собранных ооцитов за цикл. В то время как пять линий NT-ESC были получены от доноров, производивших ≤ 10 ооцитов/цикл, только одна линия была получена от доноров, которая произвела 11-15 ооцитов за цикл, и не было установлено ни одной линии клеток из циклов с ≥ 16 ооцитами. Пиковый уровень эстрадиола (E2), измеренный в крови доноров яйцеклеток до инициирования ХГЧ, положительно коррелировал с последующим выходом ооцитов. Таким образом, эти наблюдения подразумевают, что чем больше количество собранных ооцитов, тем хуже их качество и способность к перепрограммированию в контексте SCNT.

Были найдены оптимальные протоколы стимуляции, дающие наилучшую возможность продуцирования ооцитов, способных производить NT-ESC при помощи SCNT. Впервые было оценено воздействие агонистов и антагонистов GnRH, используемых для подавления гипоталамической функции доноров яйцеклеток. До стимуляции у каждого отдельного донора

яйцеклеток измеряли уровень антимюллеровского гормона (АМН) и подсчет антральных фолликулов (ПАФ) (Таблица 3). Доноры с более высокими профилями АМН и ПАФ связаны с высоким резервом яичников и получали агонист GnRH Lupron (4 цикла), в то время как оставшиеся доноры получали антагонист GnRH (ганиреликс, 6 циклов) (Таблица 3).

Таблица 3.

Клинические значения для различных групп в режиме подавления гипофиза

	Антагонист GnRH	Агонист GnRH	
Кол-во циклов	6	4	
Кол-во ооцитов	11.7±5.6	20.5±11.9	NS
Возраст	29±2.5	24.3±1.3	P<0.05
АМН (нг/мл)	2.8±0.5	4.2±1.2	P<0.05
ПАФ	23.1±7.2	33.3±5.4	P<0.05
Дозировка FSH (ME)	958.3±241.7	950±253.3	NS
Кол-во образцов hMG	8.5±1.6	8.8±0.9	NS
Кол-во стимуляций	8.7±1.6	9±0.8	N
Пик E2	2568.2±806.1	2709±1597.3	NS

Среднее количество ооцитов МП (среднее значение ± стандартное отклонение), собранных за цикл, статистически не различалось между группами, принимавшими антагонист GnRH и агонист GnRH (11,7±5,6 и 20,5±11,9 соответственно). Однако развитие эмбрионов SCNT за пределами 8-клеточной стадии было нарушено в ооцитах, произведенных при помощи агониста GnRH. Более того, все шесть линий NT-ESC были получены из ооцитов, собранных у доноров, обработанных антагонистом GnRH. Основываясь на этих наблюдениях, можно сделать вывод, что подавление гипофиза агонистами GnRH во время стимуляции яичников может привести к образованию ооцитов с ухудшенным качеством, несовместимым с развитием бластоцисты SCNT и изоляцией ESC.

Пронуклеарное образование также оценивалось для использования в качестве прогностического маркера результатов SCNT. Большинство эмбрионов SCNT сформировали один пронуклеус на следующий день после переноса ядра (56%, 68/122), в то время как у меньшей части (20%, 24/122) было 2 пронуклеуса. Как указано выше, пронуклеарное образование не наблюдалось у части 1-клеточных эмбрионов SCNT (20%, 24/122), или они уже перешли к 2-клеточной стадии ко времени пронуклеарной проверки. После отдельного культивирования было установлено, что расщепление и раннее предимплантационное развитие были одинаковыми среди этих групп. В то время как скорость образования бластоцисты была выше у эмбрионов SCNT с 2 пронуклеусами (39%), стабильные линии NT-ESC были получены

от всех четырех типов эмбрионов. Хотя анализировалось небольшое количество эмбрионов SCNT, разумно сделать вывод, что пронуклеарное образование не коррелирует напрямую с получением NT-ESC.

Пример 6 - Анализ NT-ESC человека.

Для определения происхождения SCNT и степени перепрограммирования, четыре линии NT-ESC (обозначенные как hESO-NT1, 2, 3 и 4), полученные из фибробластов плода HDF-f, были расширены и тщательно проанализированы. Первоначально использовалось микросателлитное типирование с использованием 23 маркеров, отображающих 22 аутосомных локуса человека и один X-связанный локус для генотипирования ядерного генома. Результаты несомненно соответствовали всем 4 линиям NT-ESC донорских фибробластов плода без заметного вклада аллелей из ооцитов (Таблица 4). Отличительной особенностью SCNT является то, что ооцит в значительной степени способствует митохондриальному геному (мтДНК) у эмбрионов SCNT и NT-ESC. Как и ожидалось, анализ различий последовательностей мтДНК в петле смещения (D-петля), содержащей гипервариабельный сегмент (HSV), подтвердил, что линии NT-ESC наследовали, в основном, мтДНК ооцитов. Во время слияния цитопластов с ядерными донорскими фибробластами небольшое количество соматической мтДНК переносится в эмбрионы SCNT, что может привести к гетероплазме в NT-ESC. Была использована чувствительная ARMS-qPCR (система амплификационной рефрактерной мутации – количественная полимеразная цепная реакция) и был обнаружен низкий уровень вклада соматической мтДНК во всех четырех линиях NT-ESC ($3,4 \pm 1,7\%$; диапазон 1,2-4,9%) (Таблица 5). Этот перенос был выше, чем в линиях переноса веретена – ESC ($0,6 \pm 0,9\%$), полученных после переноса веретена между ооцитами. Цитогенетический анализ методом G-banding показал, что все 4 линии NT-ESC содержат нормальный эуплоидный женский кариотип (46XX) без числовых или структурных отклонений (Таблица 5).

Для оценки плюрипотентности в линиях NT-ESC экспрессию общих маркеров оценивали с помощью иммуноцитохимии (ICC) и сравнивали с двумя линиями ESC, полученными в результате ЭКО (hESO-7 и -8). Обращаем внимание, что контрольные линии ESC и четыре линии NT-ESC были созданы из донорских ооцитов от одного и того же донора, таким образом, они несут идентичную мтДНК. Как и в контрольной группе, все линии NT-ESC выражали OCT-4, NANOG, SOX2, SSEA-4, TRA-1-60 и TRA-1-81 (Таблица 6). При инъекции мышам с иммунодефицитом SCID все линии

NT-ESC вызывали опухоли, состоящие из тканей и типов клеток, представляющих все три зародышевых слоя. Анализ дифференцирования *in vitro* продемонстрировал эффективное образование в эмбрионидных телах в суспензионной культуре, которая после прикрепления образовала спонтанно сокращающиеся кардиомиоциты).

Таблица 4

Микросателлитный анализ линий NT-ESC человека

Образец	HDF-e	Донор ооцитов	hESONT1	hESONT2	hESONT3	hESONT4
Пол	Жен.	Жен.	Жен.	Жен.	Жен.	Жен.
AME	XX	XX	XX	XX	XX	XX
D1S548	172/172	172/172	172/172	172/172	172/172	172/172
D2S1333	293/301	297/305	293/301	293/301	293/301	293/301
D3S1768	192/196	184/192	192/196	192/196	192/196	192/196
D4S2365	284/296	296/296	284/296	284/296	284/296	284/296
D4S413	123/123	133/153	123/123	123/123	123/123	123/123
D5S1457	115/123	123/123	115/123	115/123	115/123	115/123
D6S501	172/172	164/172	172/172	172/172	172/172	172/172
D7S513	179/189	179/193	179/189	179/189	179/189	179/189
D9S921	183/183	183/203	183/183	183/183	183/183	183/183
D10S1412	162/171	162/165	162/171	162/171	162/171	162/171
D11S2002	254/254	254/254	254/254	254/254	254/254	254/254
D11S925	282/295	297/303	282/295	282/295	282/295	282/295
D12S364	264/276	266/272	264/276	264/276	264/276	264/276
D12S67	252/260	252/264	252/260	252/260	252/260	252/260
D13S765	188/192	192/200	188/192	188/192	188/192	188/192
D16S403	141/141	141/141	141/141	141/141	141/141	141/141
D17S1300	257/257	257/269	257/257	257/257	257/257	257/257
D18S537	196/200	196/204	196/200	196/200	196/200	196/200
D18S72	305/305	305/305	305/305	305/305	305/305	305/305
DXS2506	282/282	278/278	282/282	282/282	282/282	282/282
MFGT22	104/108	104/108	104/108	104/108	104/108	104/108
D6S291	201/209	245/249	201/209	201/209	201/209	201/209
G51152	213/213	ND	213/213	213/213	213/213	213/213
MICA	183/195	ND	183/195	183/195	183/195	183/195
MOGCA	121/137	ND	121/137	121/137	121/137	121/137
D6S276	251/251	199/209	251/251	251/251	251/251	251/251
D6S1691	223/237	213/213	223/237	223/237	223/237	223/237

Таблица 5

Перенос соматической мтДНК в NT-ESC человека

Клеточная линия	% гетероплазмии мтДНК ($\pm$ sd)
hESO-NT1	4,6 $\pm$ 0,7
HESO-NT2	2,8 $\pm$ 0,3
HESO-NT3	1,2 $\pm$ 0,2
hESO-NT4	4,9 $\pm$ 0,7
Среднее	3,4 $\pm$ 1,7

Наконец, был проведен сравнительный анализ экспрессии микрочипов клеточной линии hESO-NT1 по сравнению с контрольным методом ЭКО

hESO-7 и родительским соматическим HDF-f на платформе Affymetrix PrimeView. Первоначально в каждом образце сравнивались друг с другом три биологических копии. Для сравнения обнаруженный сигнал для каждого набора зондов был нанесен на график рассеяния, и было вычислено значение корреляции. Этот анализ продемонстрировал 99%-ную транскрипционную корреляцию внутри каждого типа клеток, что позволяет предположить, что существуют минимальные различия между биологическими репликатами, собранными из разных культуральных чашек.

Затем каждый тип NT-ESC и IVF-ESC сравнивался между собой и соматическими клетками (HDF-f). Как и ожидалось, оба типа стволовых клеток показали низкую транскрипционную корреляцию с фибробластами. Среди 50 генов с наибольшим кратным изменением наблюдались многие известные гены плюрипотентности, включая LIN28, POU5F1, NANOG и SOX2 (Таблица 6). Напротив, ESC, полученные при помощи ЭКО и SCNT, были похожи друг на друга. Наблюдались некоторые транскрипционные различия между человеческими NT-ESC и IVF-ESC, однако в этот список не были включены известные гены плюрипотентности (Таблицы 7 и 8). Интересно, что основной ген гистосовместимости HLA-C был сильно подавлен в hESO-NT1 по сравнению с hESO-7 (в 79 раз) (Таблица 8).

Таблица 6

Гены, высоко экспрессированные в человеческих NT-ESC (hESO-NT1 и контрольных IVF-ESC (hESO-7) по сравнению с родительскими фибробластами

№	Идентификатор набора зондов Affymetrix	Наименование гена	Обозначение гена	Изменение экспрессии гена*	
				hESO-7	hESO-NT1
1	11725430_at	Гомолог Lin-28	<i>LIN28</i>	758	750
2	11723364_at	Домен транспозазы типа LINE-1, содержащий 1	<i>L1TD1</i>	435	381
3	11720993_at	SRV (регион Y, определяющий пол) – блок 2	<i>SOX2</i>	429	395
4	11723191_at	2 член семейства Zic	<i>ZIC2</i>	418	373
5	11717386_s_at	Металлотионеин 1G	<i>MT1G</i>	343	168
6	11755599_x_at	POU гомеобокс 1 класса 5	<i>POU5F1</i>	340	316
7	1736127_s_at	Связанная с развитием плюрипотентность 4	<i>DPPA4</i>	340	295
8	11730462_s_at	Гомеобокс Orthodenticle 2	<i>OTX2</i>	326	381
9	11719444_s_at	Протеин-тирозин-фосфатаза, рецепторного типа, Z-полипептид 1	<i>PTPRZ1</i>	316	321
10	11740301_a_at	Убиквитин-специфическая пептидаза 44	<i>USP44</i>	314	261
11	11745651_a_at	Молекула адгезии эпителиальных клеток	<i>EPCAM</i>	312	347
12	11716906_a_at	Кадгерин 1, тип 1, E-кадгерин (эпителиальный)	<i>CDH1</i>	286	200
13	11759218_at	3 член семейства Zic	<i>ZIC3</i>	283	220
14	11733551_at	5 член семейства Zic	<i>ZIC5</i>	252	238

15	11720460_x_at	Рецептор F11	<i>F11R</i>	247	223
16	11746506_a_at	Секретированный фосфопротеин 1	<i>SPP1</i>	241	340
17	11719869_a_at	Миелоцитоматоз, вирусный связанный онкоген	<i>MYCN</i>	241	221
18	11727909_at	Семейство растворенных носителей 7 (катионный переносчик аминокислот, система у +), член 3	<i>SLC7A3</i>	240	226
19	11747223_a_at	Рецептор эндотелина типа В	<i>EDNRB</i>	230	245
20	11723543_a_at	Эпителиальный сплайсинг регуляторного белка 1	<i>ESRP1</i>	222	191
21	11746022_s_at	Тератокарцинома, фактор роста 1	<i>TDGF1</i>	210	227
22	11758000_s_at	Вирус Коксаки и рецептор аденовируса	<i>CXADR</i>	205	204
23	11725749_a_at	Галанин препропептид	<i>GAL</i>	203	308
24	11725436_a_at	Секретоглобин, семейство 3А, член 2	<i>SCGB3A2</i>	200	182
25	11729643_s_at	Опухолевый белок D52	<i>TPD52</i>	194	165
26	11734366_x_at	Гомолог 42 белка «цинковые пальцы»	<i>ZFP42</i>	190	186
27	11733474_at	SRY (регион Y, определяющий пол) - блок 21	<i>SOX21</i>	185	122
28	11721990_at	хемотаксин, полученный из клеток лейкоцитов 1	<i>LECT1</i>	183	135
29	11716017_at	Mal, белок дифференцирования Т-клеток 2	<i>MAL2</i>	181	179
30	11719684_a_at	Нейротензин	<i>HTC</i>	157	255
31	11725237_a_at	РНК-связывающий белок с множественным сплайсингом 2	<i>RBPMS2</i>	157	163
32	11734427_at	Трехкомпонентный мотив, содержащий 71	<i>TRIM71</i>	154	138
33	11757573_s_at	Ожоговый гомолог 5	<i>FZD5</i>	148	115
34	11755164_a_at	Коэффициент определения лево-право 1	<i>LEFTY1</i>	147	117
35	11731121_s_at	Васохибин 2	<i>VASH2</i>	147	90
36	11727987_a_at	ДНК (цитозин-5-)- метилтрансфераза 3 бета	<i>DNMT3B</i>	137	110
37	11748773_a_at	Катепсин L2	<i>CTSL2</i>	134	169
38	11718350_s_at	семейство NLR, пириновый домен, содержащий 2	<i>NLRP2</i>	132	88
39	11757625_s_at	Молекула CD200	<i>CD200</i>	128	133
40	11729429_a_at	Член 26А семейства Кинезин	<i>KIF26A</i>	127	105
41	11757702_s_at	Десмоколлин 2	<i>DSC2</i>	118	146
42	11732577_x_at	Гомеобокс Nanog	<i>NANOG</i>	111	154
43	11728591_at	Гипотетический белок LOC729993	<i>LOC729993</i>	111	127
44	11759881_at	Пептидилпролилизомераза (циклофилин А) А	<i>PPIA</i>	103	114
45	11756165_s_at	Глициндегидрогеназа (декарбоксилирование)	<i>GLDC</i>	102	116
46	11747042_a_at	Контактин-ассоциированный белок-подобный 2	<i>CNTNAP2</i>	91	142
47	11725524_s_at	Десмоглеин 2	<i>DSG2</i>	91	91
48	11731989_at	Гомеобокс HESX 1	<i>HESX1</i>	91	73
49	11758166_s_at	Последовательность 1 Синдрома Кальманна	<i>KAL1</i>	88	124
50	11732657_a_at	Цитохром P450, семейство 26, подсемейство А, полипептид 1	<i>CYP26A1</i>	88	110

Таблица 7

Гены с высокой положительной регуляцией в NT-ESC (hESO-NT1) по сравнению с IVF-ESC (hESO-7)

№	Идентификатор набора зондов Affymetrix	Наименование гена	Обозначение гена	Изменение экспрессии гена*
1	11755911_a_at	G-белок-связанный рецептор 128	<i>GPR128</i>	115
2	11722472_a_at	Выраженный по отцовской линии 3	<i>MEG3</i>	26
3	11728941_at	Хромосома 13, открытая рамка считывания 38	<i>C13orf38</i>	12
4	11740844_s_at	Домены фактора D и EGF фон Виллебранда	<i>VWDE</i>	11
5	11737126_x_at	Аналогично STAGE6	<i>LOC441294</i>	8
6	11720703_at	миозин, легкая цепь 4, щелочь; предсердный, эмбриональный	<i>MYL4</i>	5
7	11736163_a_at	Циклинзависимый ингибитор киназы 2B (p15, ингибирует CDK4)	<i>CDKN2B</i>	4
8	11759120_a_at	Лейцин-богатые повторы, содержащие рецептор 5, связанный с G-белком	<i>LGR5</i>	4
9	11746373_s_at	RRN3, гомолог фактора транскрипции РНК-полимеразы I	<i>RRN3</i>	4
10	11727675_at	Сульфураса кофактора молибдена	<i>MOCOS</i>	4
11	11760343_x_at	Белок «цинковые пальцы» 726	<i>ZNF726</i>	4
12	11717912_s_at	Хемокин (С-Х-С мотив) лиганд 14	<i>CXCL14</i>	4
13	11735201_x_at	NEDD4-связывающий белок 2	<i>N4BP2</i>	4
14	11744894_at	Семейство со сходством последовательностей 20, член А	<i>FAM20A</i>	4
15	11764141_x_at	Семейство переносчиков растворенных веществ 25 (митохондриальный носитель; цитратный транспортер), член 1	<i>SLC25A1</i>	4
16	11757096_s_at	Белок «цинковые пальцы» 98 (F7175)	<i>ZNF98</i>	4
17	11718766_at	Протеаза, серин, 23	<i>PRSS23</i>	3
18	11729820_at	Гомолог 5 активирования генов во время роста скелетных мышц	<i>USMG5</i>	3
19	11756542_a_at	Рецептор 87, связанный с G-белком	<i>GPR87</i>	3
20	11719120_a_at	Кинурениназа (L-кинуруенин гидролаза)	<i>KYNU</i>	3
21	11750167_a_at	Кальпаин 2, (м/II) большая субъединица	<i>CAPN2</i>	3
22	11727117_at	Предшественник натрийуретического пептида типа В	<i>NPPB</i>	3
23	11744435_a_at	«Двойная» специфичность фосфатазы 6	<i>DUSP6</i>	3
24	11716433_s_at	Стеарил-КоА-десатураза 5	<i>SCD5</i>	3
25	11715796_s_at	Люмикан	<i>LUM</i>	3

Таблица 8

Гены с высокой степенью понижающего регулирования в NT-ESC человека

№	Идентификатор набора зондов Affymetrix	Наименование гена	Обозначение гена	Изменение экспрессии гена*
1	11715316_x_at	Главный комплекс гистосовместимости, класс I, С	<i>HLA-C</i>	79
2	11763252_x_at	Фосфосеринфосфатаза	<i>PSPH</i>	9
3	11730995_a_at	Актинин, альфа 3	<i>ACTN3</i>	6
4	11759838_x_at	Белок «цинковые пальцы» 506	<i>ZNF506</i>	5
5	11747933_a_at	Никотинат фосфорибозилтрансферазный домен, содержащий 1	<i>NAPRT1</i>	5
6	11720803_at	S100 кальцийсвязывающий белок A14	<i>S100A14</i>	4
7	11716034_a_at	Антиген стромальных клеток костного мозга 2	<i>BST2</i>	4
8	11720549_a_at	Пероксисомальный фактор биогенеза 6	<i>PEX6</i>	4
9	11746500_x_at	Глутатион S-трансфераза омега-2	<i>GSTO1</i>	3
10	11755044_x_at	Голубиный гомолог	<i>PION</i>	3
11	11726063_a_at	Хромосома 2, открытая рамка считывания 40	<i>C2orf40</i>	3
12	11732934_a_at	Связанная с развитием плюрипотентность 5	<i>DPPA5</i>	3
13	11730250_a_at	Лиганд нечувствительного белка X 1	<i>LNK1</i>	3
14	11733305_a_at	Фактор транскрипции AP-2 бета (активация	<i>TFAP2B</i>	3

		энхансер-связывающего белка 2 бета)		
15	11728437_at	Бромодомен и WD повторяющийся домен, содержащий 1	BRWD1	3
16	11734175_a_at	Хромосома 13, открытая рамка считывания 38	C13orf38	3
17	11728244_s_at	Семейство носителей растворенных веществ 12 (переносчики натрия/калия/хлорида), член 1	SLC12A1	3
18	11755819_a_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) блок полипептидов 58	DDX58	2
19	11746803_s_at	Связанная с развитием плюрипотентность 3	DPPA3	2
20	11717191_a_at	Тропонин С тип 2 (быстрый)	TNNC2	2
21	11731771_at	Протокадегрин бета 15	PCDHB15	2
22	11719028_a_at	Плекстрин и Sec7 домен, содержащий 3	PSD3	2
23	11718230_a_at	Большой комплекс гистосовместимости, класс I, F	HLA-F	2
24	11743972_a_at	Транскрипт 4, индуцируемый повреждением ДНК	DDIT4	2
25	11725196_s_at	«Цинковые пальцы» SWIM-типа, содержащий 7	ZSWIM7	2

Пример 7 – Процедуры.

SCNT макака-резуса: сборы ооцитов, SCNT, культивирование эмбрионов и процедуры выделения NT-ESC выполняли, как описано выше.

Донорство ооцитов человека. Анонимные доноры ооцитов в возрасте 23–31 года были наняты через Отдел исследований здоровья женщин OHSU при помощи печатной и интернет-рекламы. Откликнувшиеся женщины были проверены на предмет их репродуктивного, медицинского и психосоциального здоровья. Здоровые и не страдающие ожирением (ИМТ <28 кг/м²) женщины, которые прошли первые 10 медицинских и психологических обследований, были приглашены на исследование донорства яйцеклеток.

Протоколы стимуляции яичников, сопровождаемые установленными руководящими принципами ЭКО, были описаны ранее. Вкратце, была дана комбинация рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (rFSH), менопаузальных гонадотропинов человека (hMG) и агониста GnRH или антагониста. Хорионический гонадотропин человека (ХГЧ) был назначен для запуска созревания ооцитов. Самостоятельное введение инъекционного rFSH начинается на второй или третий день цикла и продолжается в течение около 8-12 дней. Начальная доза гонадотропина составляла 75-125 МЕ/день и 1-2 мг/ч; доза корректировалась согласно индивидуальному ответу при помощи установленных понижающих режимов до дня введения ХГЧ. Реакцию яичников и рост фолликулов контролировали с помощью трансвагинального УЗИ и измерения уровня эстрадиола в сыворотке. Когда два или более фолликула достигли >18 мм в диаметре, субъекты получали ХГЧ (104 МЕ, подкожно), чтобы вызвать созревание. Через тридцать шесть часов после инъекции ХГЧ у субъектов извлекали ооциты путем трансвагинальной фолликулярной аспирации.

Кумулюс-ооцитные комплексы (КОК) собирали из аспирированных и помещали в среду HTF с HEPES с добавлением 10% заменителей сывороточного белка (HTF с HEPES 10%) при 37°C. КОК обрабатывали гиалуронидазой для дезагрегации клеток кумулюса и гранулезы. Ооциты выделяли и классифицировали как стадии зародышевого пузырька, мейотической метафазы I (MI) и зрелой метафазы II (MII), а затем помещали в среду Global с добавлением 10% заменителей сывороточного белка (Global 10%) при 37°C в 5% CO₂ и покрывали маслом для тканевых культур.

Подготовка ядерных донорских клеток: коммерчески доступные женские дермальные фибробласты эмбрионального происхождения (HDF-f) были предварительно получены. Клетки размножали в колбах для культивирования клеток объемом 75 см³, содержащих DMEM/F12, с добавлением 100 МЕ мл⁻¹ пенициллина, 100 мкг мл⁻¹ стрептомицина, 10% FBS при 37°C в 5% CO₂. Фибробласты затем дезагрегировали обработкой трипсином и замораживали в аликвотах 3×10⁵ клеток в среде, содержащей 10% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки были затем расставлены по приоритетам в SCNT и культивированы в 4-луночных чашках в стандартных условиях до слияния. Конфлюэнтные клетки синхронизировали в фазе G0/G1 клеточного цикла путем культивирования в среде DMEM/F12 с 0,5% FBS в течение 2-4 дней перед SCNT.

Процедуры SCNT человека и культивирование эмбрионов. Энуклеация веретена MII была описана выше. Ооциты помещали в 50 мкл капли для манипуляции с HTF с 10% средой HEPES, содержащей 5 мкг/мл цитохалазина В и 1,25 мМ кофеина, в чашку со стеклянным дном. Капли покрывали маслом для тканевых культур и ооцитами, выдерживали при 37°C в течение 10-15 мин перед удалением веретена. Затем чашка устанавливалась на этапе с инвертированным микроскопом, оборудованным подогревателем, микроманипулятором, системой визуализации и лазерным объективом. Ооцит располагали удерживающей пипеткой так, чтобы веретено находилось в положении между «2 часами» и «4 часами». Вителлиновый слой рядом с веретеном сверлят лазерным импульсом и через отверстие вводят пипетку для энуклеации. Небольшое количество цитоплазмы, окруженной плазматической мембраной и контактирующей с веретеном, было аспирировано в пипетку. Затем дезагрегированный фибробласт аспирировали в микропипетку и перенесли в экстракт HVJ-E. Клетка была помещена в перивителлиновое пространство цитоплазмы на стороне, противоположной первому полярному телу. Конструкции SCNT промывали HTF с 10% раствором HEPES, переносили в среду 10% Global и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 30 минут до слияния. Успешное слияние подтверждалось

визуально через 30 минут исчезновением донорской клетки в перивителлиновом пространстве. Импульс электропорации (два импульса постоянного тока 50 мкс 2,7 кВ см⁻¹) в 0,25 М буфере d-сорбита, содержащем 0,1 mM ацетата кальция, 0,5 mM ацетата магния, 0,5 mM среды HEPES и 1 мг мл⁻¹ БСА, не содержащим жирных кислот. Активированные конструкции SCNT затем инкубировали в среде Global (без сыворотки), содержащей 2 mM DMAP при 37°C в 6% CO₂ в течение 4 часов. После DMAP эмбрионы SCNT промывали HTF с 10% SSS HTF и переносили в 4-луночные чашки, содержащие среду Global с добавлением 10% FBS, 12 мкМ β-меркаптоэтанола (BME), 10 нМ трихостатина А (TSA, Sigma) и культивировали при 37°C в 6% CO₂, 5% O₂ и 89% N₂ в течение 12 часов. Затем зародыши промывали, проверяли на пронуклеарное образование и культивировали в среде Global, дополненной 10% FBS и 12 мкМ β-меркаптоэтанолом (BME) при 37°C в 6% CO₂, 5% O₂ и 89% N₂ в течение максимум 7 дней. Среду меняли один раз на 3 день культивирования.

Выделение, культивирование и характеристика NT-ESC человека.

После удаления вителлинового слоя с кратковременным воздействием 0,5% протеазы (Sigma) бластоцисты SCNT высевали на сливные питающие слои инактивированных митомицином C эмбриональных фибробластов мыши (mEFs) и культивировали для 5-7 дней при 37°C в 3% CO₂, 5% O₂ и 92% N₂ в среде деривации ESC. Производная среда состояла из DMEM/F12 с добавлением 0,1 mM неосновных аминокислот, 1 mM l-глутамина, 0,1 mM β-меркаптоэтанола, 5 нг/мл основного фактора роста фибробластов, 10 мкМ ингибитора ROCK (Sigma), 10% FBS и 10% заменителем нокаутной сыворотки (KSR). Перед использованием свежую деривационную среду ESC смешивали (50%:50%, об/об) с деривационной средой, подготовленной для 24-часового культивирования с растущими ESC человека. Росты внутренней клеточной массы (ICM) вручную диссоциировали на небольшие скопления с помощью микроскопической пластины и реплицировали на свежие ME9-планшеты. После первого прорастания ICM ингибиторы FBS и ROCK были исключены, а KSR был увеличен до 20%. Колонии с ESC-подобной морфологией отбирали для дальнейшего размножения, определения характеристик и цитогенетического анализа. Иммуноцитохимия, дифференциация *in vivo* и *in vitro*, а также анализ микрочипов выполнялись, как описано выше. Подробные протоколы также доступны в дополнительных процедурах.

Генотипирование ядерной ДНК и цитогенетический анализ: генотипирование NT-ESC выполняется микросателлитной типизацией с использованием 23 маркеров, представляющих 22 аутосомных локуса

человека и один X-связанный локус, как описано выше. Кариотипирование выполняли путем GWT-связывания на 20 метафазных клетках из каждой линии человеческого NT-ESC.

Генотипирование мтДНК: генотипирование мтДНК проводилось, как было описано выше. Область человеческой митохондриальной петли смещения (D-петля), несущая гипервариабельный сегмент 1 (HSV-1), был амплифицирован при помощи опубликованных праймеров. Продукты ПЦР секвенировали и информативные участки однонуклеотидных полиморфных (SNP) идентифицировали при помощи программного обеспечения Sequencher v.4.7. Количественный анализ мтДНК выполняли с помощью ARMS-qPCR.

Иммуоцитохимия: иммуоцитохимический анализ, как описано выше с использованием антител к OCT-4, SOX2, TRA1-60, TRA1-81 и SSEA-4, антитело NANOG, ядра были помечены DAPI.

Анализ тератомы: Приблизительно 3-5 млн. недифференцированных ESC были введены в мышцу задней ноги 4-недельных SCID, бежевых мышей-самцов при помощи иглы 18 калибра. Через шесть-семь недель после инъекции мышей подвергали эвтаназии и иссекали опухоли, делали срезы и гистологически характеризовали на наличие репрезентативных тканей, как описано выше.

Кардио-дифференцирование: дифференцирование в сердечные клетки инициируется образованием эмбриоидного тела в суспензионной культуре, как описано выше. Вкратце, колонии ESC свободно отделяли от питающих клеток и переносили в 6-луночные планшеты со сверхнизкой адгезией без подачи и культивировали в суспензии в среде ESC с добавлением 20% FBS, но без FGF в течение 5-7 дней. Затем эмбриоидные тела высевали в покрытые коллагеном чашки и культуры поддерживали в среде ESC в течение дополнительных 2-4 недель до спонтанного сокращения кардиомиоцитов.

Анализ ARMS-qPCR: Количественный анализ ПЦР Амплификационной системы для идентификации мутации проводили в ESC. Праймеры и зонды TaqMan MGB были разработаны для обнаружения уникальных SNP мтДНК между клетками-донорами фибробластов кожи HDF-F и гаплотипами мтДНК доноров яйцеклеток. Недискриминационные и дискриминантные анализы смешивали и измеряли с помощью набора Rotor-Gene Multiplex PCR Kit. Реакции ПЦР (15 мкл), содержащие 1X мастер-смесь для ПЦР, 100-250 нМ каждого праймера, 150 нМ каждого образца TaqMan и примерно 1-4 нг общей геномной ДНК, выполняли в соответствии с инструкциями производителя. Интенсивность флуоресцентного сигнала регистрировали и анализировали во время ПЦР в ПЦР-системе ABI 7900HT

практически в режиме реального времени при помощи программного обеспечения SDS (Ver.2.4). Все реакции проводились в двух экземплярах с двумя различными количествами ДНК: 1-4 нг и 1:8 разведениями. Программное обеспечение SDS генерирует стандартную кривую, используя четыре 8-кратных разведения плюс последнее 4-кратное разведение. Процент переноса мтДНК по отношению к общему содержанию мтДНК рассчитывали по уравнению гетероплазмы = $100 * (\text{количество D} / \text{количество ND})$.

Транскрипционный анализ при помощи микроматрицы.
Сравнительный анализ мРНК микрочипов для hESO-NT1, hESO-7 и HDF-f проводили при помощи матрицы генома человека. Образцы РНК были преобразованы в меченую кРНК и гибридизованы с массивом экспрессии гена PrimeView человека при помощи GeneChip Scanner 3000 с обновлением 7G и программным обеспечением AGCC версии 3.2, обеспечивающим интенсивность флуоресценции клеток (файлы .cel). Проверка изображения производилась один раз после каждого сканирования. Обработанные файлы изображений были нормализованы по массивам при помощи надежного алгоритма мультичипового усреднения и логарифмически преобразовывались (база 2) для прямого сравнения значений набора зондов между образцами. Программное обеспечение для анализа экспрессии микрочипов GeneSifter использовалось для идентификации дифференциально выраженных транскриптов. Для данного сравнения ESC, полученные при ЭКО, были выбраны в качестве базового эталона, а транскрипты, которые демонстрировали различные кратные изменения относительно базовой линии, считались дифференциально выраженными. Для облегчения глубокого сравнения обработанные файлы изображений были нормализованы с помощью надежного алгоритма усреднения по нескольким чипам и логарифмически преобразовывались (база 2) с помощью программы StatView. Соответствующие данные по экспрессии микрочипов анализировали по парным различиям, определенным по t-критерию Стьюдента ($P < 0,05$).

Статистика: Для развития эмбрионов и клинических параметров статистический анализ проводили при помощи ANOVA или t-теста с программным обеспечением Statview со статистической значимостью, установленной на 0,05. Эффективность выделения ESC анализировали при помощи хи-квадрата со статистической значимостью, установленной на 0,05.

Пример 8. Сравнение плюрипотентных стволовых клеток, полученных в результате переноса ядер соматических клеток, с такими

же клетками, полученными с помощью ЭКО, и индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками.

Человеческие плюрипотентные стволовые клетки обладают большим потенциалом для регенеративной медицины, но доступные типы клеток имеют важные ограничения. Хотя эмбриональные стволовые клетки, полученные из оплодотворенных эмбрионов (IVF-ESC), считаются «золотым стандартом» плюрипотентности, они являются аллогенными для потенциальных реципиентов. Аналогично, аутологичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) подвержены эпигенетическим и транскрипционным аберрациям. Чтобы определить, является ли накопление таких аберраций присущим перепрограммированию соматических клеток или вторичным по отношению к методу перепрограммирования, была создана генетически подобранная коллекция IVF-ESC, iPSC и ESC человека, полученных в результате переноса ядер соматическими клетками (SCNT; NT-ESC), и подвергнута геномному, эпигенетическому и транскрипционному анализу. Репрограммирование на основе SCNT опосредуется полным набором цитоплазматических факторов ооцитов, таким образом тесно переплетая ранний эмбриогенез. NT-ESC и iPSC, полученные из одних и тех же соматических донорских клеток, содержали сравнимое количество вариаций числа новых копий (CNV), что позволяет предположить, что два метода перепрограммирования не могут существенно различаться с точки зрения мутагенного или селективного давления.

Напротив, профили метилирования ДНК и транскриптома NT-ESC очень близко соответствовали профилям IVF-ESC, в то время как iPSC заметно отличались от IVF-ESC и паттернов остаточного метилирования ДНК, типичного для родительских фибробластов, что предполагает неполное репрограммирование. Мы пришли к выводу, что соматические клетки человека могут быть точно перепрограммированы на плюрипотентность с помощью SCNT и поэтому являются идеальными кандидатами для заместительной клеточной терапии.

Краткое описание: происхождение ESC человека от оплодотворенных *in vitro* эмбрионов было встречено с энтузиазмом из-за их потенциального использования в клеточной терапии, сдерживаемой только признанием, что иммуносупрессия необходима на протяжении всей жизни для приживания и выживания аллогенных IVF-ESC. Появление технологии iPSC преодолевает это ограничение, поскольку клетки, подобранные пациенту, могут быть получены сравнительно легко и не затратно.

Однако в последнее время возникают проблемы, связанные с высокой частотой генетических и эпигенетических нарушений, наблюдаемых при

iPSC, включая субхромосомные дупликации и делеции, обнаруживаемые как вариации числа копий (CNV), кодирующие белок мутации и дефекты метилирования ДНК и экспрессии генов в областях, подверженных импринтингу и инактивации X-хромосомы.

Хотя еще не ясно, отражают ли эти аберрантные эпигенетические метки ошибки, возникающие во время перепрограммирования или неполного возврата к плюрипотентности, эти аномалии могут повлиять на точность моделирования заболеваний *in vitro* или на полезность iPSC для регенеративной медицины. Учитывая наличие SCNT в качестве альтернативного подхода к перепрограммированию соматических клеток, было начато исследование с целью изучения механизмов, лежащих в основе репрограммирования на основе фактора транскрипции и SCNT.

Хотя молекулы, ответственные за перепрограммирование на основе SCNT, остаются в основном неизвестными, общепринято, что вовлеченные цитоплазматические факторы отличаются от тех, которые используются для генерации iPSC. Например, OCT4 играет критическую роль в индукции и поддержании плюрипотентности при iPSC, но не требуется при перепрограммировании на основе ооцитов.

Была проверена гипотеза о том, что различные механизмы, лежащие в основе репрограммирования на основе SCNT и фактора, приводят к различиям в генетической и эпигенетической стабильности получаемых плюрипотентных клеток. Совпадающая коллекция линий NT-ESC и iPSC была получена из одних и тех же родительских соматических клеток. В качестве контроля IVF-ESC были получены с использованием ооцитов от того же донора, который предоставил ооциты для SCNT. Мы подвергали клеточные линии генетическому, эпигенетическому и транскрипционному анализу высокого разрешения, тем самым определяя четкие молекулярные профили каждого типа плюрипотентных стволовых клеток.

Извлечение генетически подобранных линий: ранее были получены четыре человеческие линии NT-ESC из дермальных фибробластов кожи (HDF), обозначенные NT1-4. Описанные здесь случаи также производили генетически подобранные iPSC из той же культуры HDF. Были использованы два вектора перепрограммирования; 1) интегративные ретровирусные векторы, несущие OCT4, SOX2, KLF4 и MYC и 2) неинтегрирующие векторы на основе вируса Сендай, несущие те же четыре фактора. Колонии были случайным образом основаны на типичной ESC-морфологии. Пять клонов/линий iPSC, полученных по методике Сендай, были расширены и обозначены как iPS-S1-5. Две линии, полученные из ретровирусной трансдукции, были расширены и обозначены как iPS-R1 и -R2.

Две линии IVF-ESC, обозначенные hESO-7 и -8, были получены из бластоцист, генерируемых ооцитов от того же донора при ЭКО, которые использовались для SCNT. Все клеточные линии были получены в одной лаборатории, и условия пассирования и культивирования были идентичны. Подобно IVF-ESC и NT-ESC все линии iPSC сохраняли типичную морфологию ESC, выраженные маркеры плюрипотентности и были способны образовывать тератомы, содержащие клетки, представляющие все три зародышевых линии. Цитогенетический G-banding анализ подтвердил, что все плюрипотентные клеточные линии сохранили диплоидный кариотип без обнаруживаемых численных или структурных хромосомных аномалий.

Генотипирование на основе короткого tandemного повтора (STR) с использованием 1 маркера для определения пола (AME) и 22 различных маркеров, распределенных по 16 хромосомам (15 аутосом и X-хромосома), подтвердило, что все линии NT-ESC и iPSC были генетически сопоставлены друг с другом и к оригинальным HDF. Единственной линией, которая не показала идеального соответствия для всех 23 маркеров STR, была линия iPS-R1, которая демонстрировала гомозиготность в локусе D3S1768 на хромосоме 3 по сравнению с HDF и другими перепрограммированными клеточными линиями, которые все были гетерозиготными в этом локусе. Это свидетельствует о том, что потеря линии гетерозиготности произошла в линии iPS-R1.

Генотипирование однонуклеотидного полиморфизма (SNP) на основе микрочипов с высоким разрешением выполнялось с целью детального генетического сравнения между стволовыми клетками, родительскими HDF и донорами ооцитов и сперматозоидов. Анализ повторяющихся ошибок подтвердил, что все линии NT-ESC и iPSC, за исключением iPS-R1, были практически идентичны друг другу и родительским HDF (сходство >99,96%). Примечательно, что iPS-R1 показал большее количество различий по сравнению с HDF (сходство 99,855%). В соответствии с анализом STR, эта линия показала большую область новой гомозиготности (ROH) на хромосоме 3. Генотипирование SNP показало, что доноры ооцитов и сперматозоидов не связаны с HDF, NT-ESC и iPSC (сходство 88,859-88,987%). Наконец, мы подтвердили генетические связи первой степени между двумя линиями IVF-ESC и донорами ооцитов и сперматозоидов (сходство 92,554-94,23%).

На основании данных секвенирования в гипервариабельной области D-петли митохондриального генома (мтДНК), мтДНК в NT-ESC была в основном получена из ооцитов. Здесь, используя секвенирование всего генома бисульфита (MethylC-Seq) и секвенирование транскриптома (RNA-Seq), было показано, что, как и ожидалось, весь митохондриальный геном во

всех четырех линиях NTESC и двух IVF-ESC был практически идентичен, что было ожидаемым, т.к. все ооциты были предоставлены одним и тем же донором. Однако последовательности мтДНК этих линий отличались в 13 положениях нуклеотидов по сравнению с HDF или iPSC, что было подтверждено традиционным секвенированием Сэнгера. Клеточная линия NT4 показала С/Т гетероплазму в положении мтДНК 16092, в то время как другие линии NT-ESC и IVF-ESC содержали гомоплазматический С-аллель. Анализ RNA-Seq также выявил небольшое количество переноса мтДНК из HDF в 3 из 4 линий NT-ESC, в диапазоне от 1% до 4,9%. Количественная оценка была основана на относительном количестве специфичных для ооцитов и HDF считываний при информативных SNP, и результаты соответствовали измерениям гетероплазмы в NT-ESC, выполненным ARMSqPCR.

Субхромосомные генетические aberrации. Для выявления новых генетических aberrаций, возникающих во время перепрограммирования, мы сравнили высокопроизводительный генотип SNP от раннего пассажа iPSCs и NT-ESC (пассаж 5-6) до HDF, что позволяет распознавать и удалять ранее существовавшие aberrации. Всего было выявлено тринадцать новых CNV размером от 6 до 52,696 кб, в том числе десять в iPSC и три в NT-ESC. NT3 несет делецию одной копии на хромосоме 16, а NT4 имеет две дупликации, по одной на хромосоме 3 и 6. Нарушения CNV не обнаружены в NT1 и NT2. Множественные CNV были идентифицированы в четырех линиях iPSC; в iPS-S1 обнаружены две дупликации в хромосомах 1 и 5, в iPS-S2 было три делеции по одной копии в хромосомах 1, 4 и 17, а в iPS-S3 было удалено по одной копии в хромосоме 10. Линия iPS-R1 отображала две дупликации на хромосомах 3 и 4, один большой ROH, охватывающий большую часть короткого плеча хромосомы 3, и одну делецию с двумя копиями в ROH. Как указано выше, потеря гетерозиготности в этой области хромосомы 3 также была подтверждена независимым анализом STR. Никаких аномалий CNV не обнаружено в iPS-S4, iPS-S5 и iPS-R2. Все CNV, обнаруженные с помощью анализа генотипирования SNP, были подтверждены с использованием нормализованного количества считываний PHK-Seq qPCR или STR. При сравнении IVF-ESC с донорской ДНК ооцитов и сперматозоидов в hESO-7 была выявлена делеция одной копии на X-хромосоме.

Чтобы дополнительно оценить генетическую стабильность, генотипирование SNP выполнялось на второй группе совпадающих образцов, состоящей из двух линий NT-ESC, полученных от пациента с синдромом Лея, и трех соответствующих линий Сендай iPSC. Цитогенетический G-banding анализ продемонстрировал, что все, кроме одной из клеточных линий

Leigh, сохраняли диплоидный мужской кариотип без каких-либо обнаруживаемых численных или хромосомных аномалий. Leigh-NT2 имел тетраплоидный кариотип и поэтому был исключен из дальнейшего анализа. Генотипирование STR подтвердило, что Leigh-NT1 и три линии Leigh-iPSC были генетически сопоставлены с родительскими фибробластами. Было также подтверждено, что Leigh-NT1 несет мтДНК ооцитов, в то время как все Leigh-iPSC наследуют митохондриальный геном Leigh-fib, включая гомоплазматическую мутацию m.8993T→G. В линиях клеток Leigh было идентифицировано девять новых CNV, включая несколько CNV в Leigh-iPS1 и -iPS3 и по одному в Leigh-iPS2 и Leigh-NT1.

На основании общего числа обнаруженных CNV было рассчитано, что iPSC (десять клеточных линий), NT-ESC (5 клеточных линий) и IVF-ESC (2 клеточные линии) несут в среднем 1,8, 0,8 и 0,5 CNV на клеточную линию, соответственно. Существенных различий между типами плюрипотентных стволовых клеток не обнаружено. Анализ InDel данных PHK-Seq из того же набора линий плюрипотентных стволовых клеток человека также показал, что в линиях NT-ESC было меньше InDels по сравнению с линиями iPSC, но различие не было значительным. Однако эти результаты согласуются с предыдущим отчетом о том, что iPSC, в среднем, несут 2 новых CNV на линию. Ни одна из идентифицированных CNV не была распределена между клеточными линиями. Кроме того, не было более высокой средней частоты геномных aberrаций в линиях iPSC, полученных из ретровирусов, по сравнению с неинтегрирующими iPSC, индуцированными вирусом Сендай.

Поскольку NT-ESC и iPSC были получены из одних и тех же соматических клеток и не содержали статистически значимого различного количества CNV, оказывается, что мутагенные и селективные давления, присутствующие в репрограммировании на основе факторов транскрипции и SCNT, сходны по величине.

Глобальное метилирование ДНК. Метилирование ДНК является важным эпигенетическим механизмом, способствующим идентификации клеток. Сообщалось о значительных различиях метилирования ДНК между iPSC и IVF-ESC, а также различий между линиями iPSC. Поскольку такие различия могут отражать неполное или ненормальное перепрограммирование и приводить к измененной экспрессии генов, влияющей на функцию клеток, соответствующие линии стволовых клеток, полученные из соматических клеток HDF, были профилированы при помощи профиля с использованием Infinium HumanMethylation450 BeadChip для определения этих различий в масштабе всего генома. Чтобы определить, были ли глобальные паттерны

метилирования ДНК похожи на ранее сообщенные клеточные линии; была проведена иерархическая кластеризация без присмотра.

Анализ повторной выборки при начальной загрузке выявил два четко определенных кластера, один из которых содержит семь линий iPSC (включая четыре линии iPSC, сгенерированные в данном документе) и одну линию IVF-ESC (HUES64). Вторым кластером включали четыре линии NT-ESC и четыре линии IVF-ESC. Основываясь на этом сравнении, мы определили, что NT-ESC кластеризуются вместе с IVF-ESC (за исключением HUES64), в то время как iPSC формируют отдельную группу. Чтобы гарантировать, что внутригрупповая изменчивость была сходной между iPSC, NT-ESC и IVF-ESC, коэффициент вариации (CV) рассчитывали для каждого типа стволовых клеток и сравнивали с ранее сообщенными клеточными линиями (iPSC = 0,71, NT-ESC = 0,73, IVF-ESC = 0,74; Циллер и др. iPSC = 0,73 и IVF-ESC = 0,72,).

Комплексный групповой анализ выявил 6,478 дифференциально метилированных зондов (DMP) между iPSC и IVF-ESC ($FDR < 0,01$). Используя те же критерии, только 110 DMP были обнаружены между NT-ESC и IVF-ESC, что позволяет предположить, что в отличие от iPSC, NT-ESC были удивительно похожи на IVF-ESC. Затем было определено, могут ли DMP, идентифицированные в iPSC и NT-ESC, быть отнесены к остаточной эпигенетической памяти, унаследованной от HDF. Из 6 478 DMP, идентифицированных в iPSC, 780 продемонстрировали существенную разницу в метилировании ДНК (среднее β -различие $> |0,3|$) как между iPSCs и IVF-ESC, так и между HDF и IVF-ESC. Из 110 DMP, идентифицированных в NT-ESC, 87 существенно отличались как между NT-ESC и IVF-ESC, так и между HDF и IVF-ESC. Анализ функционального обогащения зондов, которые были высоко метилированы в iPSC и HDF по сравнению с IVF-ESC, показал связь с последовательностью специфической ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора (2,02-кратное обогащение, $FDR < 0,0001$). Для гиперметилированных зондов, общих для NT-ESC и HDF, значимых аннотационных терминов обнаружено не было. Однако зонды, которые были гипометилированы в iPSC, NT-ESC и HDF по сравнению с IVF-ESC, были обогащены для локусов, связанных с белковым комплексом MHC класса II (72-кратное обогащение, $FDR < 0,001$).

Основываясь на этих результатах, можно сделать вывод, что профили метилирования NT-ESC намного больше похожи на IVF-ESC, чем на iPSC. Как NT-ESC, так и iPSC действительно показывают наличие остаточной эпигенетической памяти HDF, но iPSC имеют примерно в 5-8 раз больше таких участков. Интересно, что почти 80% DMP в NT-ESC, но только 12% в

iPSC, могут быть связаны с соматической эпигенетической памятью, что позволяет предположить, что большинство нарушений метилирования в iPSC были результатом ошибок перепрограммирования.

Аберрантное метилирование ДНК в импринтированных областях.

Импринтинг – это форма эпигенетической регуляции, которая контролирует экспрессию отдельных областей генома в зависимости от родителя. Аберрантное метилирование динуклеотидов CpG в импринтированных локусах наблюдалось в iPSC и в некоторых IVF-ESC. Поэтому анализировались ранее идентифицированные импринтированные регионы. Для импринтированных областей динуклеотиды CpG со значением β от 0,2 до 0,8 на микрочипе метилирования ДНК, как и следовало ожидать, считались частично метилированными. Импринтированные области со значениями β выше 0,8 считались аберрантно гиперметилированными, а области ниже 0,2 – гипометилированными. Сначала определялось, была ли дисперсия клеточных линий сопоставимой с другими независимо сгенерированными клетками в ранее идентифицированных импринтированных областях, на основании расчетов CV. CV для линий SCNT, описанных здесь, варьировались от 0,27 до 0,36. Неконтролируемая иерархическая кластеризация внутри импринтированных областей показала, что линии NT-ESC более тесно кластеризовались с контрольными IVF-ESC и демонстрировали более низкий процент аберрантно метилированных зондов по сравнению с iPSC (средний процент от импринтированных зондов, аберрантно метилированных в iPSC = 16,1%, NT-ESC = 10,4% и IVF-ESC = 7,9%). Несколько локусов (DLGAP2, KCNK9, MKRN3) гиперметилировались во всех трех типах плюрипотентных стволовых клеток. Однако дифференциальной экспрессии ассоциированных генов в этих локусах не наблюдалось.

Также были отмечены NT-ESC-специфические различия метилирования ДНК. Все NT-ESC показали гипометилирование в локусе GNAS, в то время как линии NT2 и NT3 были гиперметилированы в локусе GNASAS/GNAS, а NT4 был гипометилирован в локусе H19. Гипометилирование NT4 в H19 соответствовало двуаллельной экспрессии этого гена.

Все линии iPSC и hESO-7 отображали гиперметилированные CpG в локусе PEG3, в то время как только линии iPSC отображали гиперметилированные CpG в локусе MEG3. Это гиперметилирование было связано с пониженной экспрессией соответствующего транскрипта (Р-значение с поправкой на MEG3 <0,001, среднее изменение сгиба 19,8; Р-значение с поправкой PEG3 <0,005, среднее изменение сгиба 128,9; см.

цветные полосы на гистограмме). Локус DIRAS3 также был гиперметилован во всех iPSC, но не коррелировал с изменением экспрессии генов.

Нарушения метилирования ДНК в импринтированных локусах, связанные с изменениями в экспрессии генов, были более частыми в iPSC. Напротив, профили метилирования ДНК в NT-ESC были больше похожи на контроли IVF-ESC, предлагая более точное перепрограммирование и лучшее поддержание отпечатков.

Метилирование ДНК на участках, инактивированных X-хромосомой:
инактивация X-хромосомы (XCI) приводит к моноаллельному транскрипционному подавлению экспрессии генов на одной из X-хромосом в клетках женского пола, таким образом обеспечивая компенсацию дозировки X-хромосомы между мужчинами и женщинами. Доказательства XCI могут быть обнаружены с помощью аллель-специфической экспрессии и покрытия X-хромосомы с помощью длинных некодирующих РНК XIST и XACT. Большинство женских IVF-ESC демонстрируют XCI, за некоторыми исключениями. На основе RNA-Seq было установлено, что все десять женских плюрипотентных линий стволовых клеток и HDF экспрессировали сходные уровни XIST, но только плюрипотентные клетки экспрессировали XACT.

Оценены различия метилирования ДНК между типами стволовых клеток в ранее аннотированных локусах XCI. Как и ожидалось, профиль тепловой карты X-хромосомы для мужской линии, hESO-8, был универсально неметилованным. Значения β для большинства этих локусов для всех линий женских стволовых клеток и соматических HDF были между 0,2 и 0,8, что согласуется с частичным метилированием, как и ожидалось на участках XCI. NT-ESC и IVF-ESC продемонстрировали в среднем более высокие уровни метилирования ДНК в локусах XCI по сравнению с родительскими HDF, в то время как уровни метилирования в линиях iPSC были заметно и значительно выше, чем в NT-ESC и женских hESO-7 (значение $p < 0,001$), с существенным разбросом по линиям. Когда aberrантное метилирование было определено как $\beta < 0,2$ или $> 0,8$, все линии NT и hESO-7 имели в 4 раза меньше aberrаций метилирования XCI по сравнению с iPSC (значение $p < 0,001$).

Также было исследовано, связано ли aberrантное метилирование ДНК на участках XCI с изменениями в экспрессии генов. РНК-Seq продемонстрировала, что гиперметилование POU3F4, SLITRK2 и SLITRK4 в линии iPS-R2 соответствует более низким уровням экспрессии генов, что указывает на то, что относительная генетическая стабильность (без CNV)

этой клеточной линии не коррелирует с эпигенетической целостностью. Кроме того, гипометилирование DACH2, RPS6KA6 и CHM в iPS-R1 и TMEM187 в iPS-S2 коррелировало с повышенной экспрессией генов. Аберрантное метилирование ДНК, связанное с изменениями в экспрессии генов, ассоциированных с опухолью, таких как семейство генов SLITRK, подчеркивает необходимость тщательных мер по контролю качества стволовых клеток, предназначенных для клинического использования.

Метилирование ДНК в аутомсомных не-импринтированных локусах: анализ метилирования ДНК аутомсомных не импринтированных сайтов CpG и non-CpG с использованием теста Крускала-Уоллиса выявил 1621 DMP среди NT-ESCs, iPSC и IVF-ESCs (значение $p < 0.01$, $\Delta\beta > 0,5$). Мы сгруппировали эти зонды в шесть основных кластеров, используя неконтролируемый алгоритм самоорганизующейся карты. Все шесть кластеров были проанализированы на цис-регуляторное функциональное обогащение с использованием GREAT, но только кластер 3 показал значительное обогащение для категорий, связанных с морфогенезом и развитием нервной системы, iPSC показали более высокие уровни ДНК метилирования по сравнению с NT-ESC и IVF-ESC для большинства кластеров, за исключением кластера 4. NT-ESC демонстрировали промежуточную картину метилирования ДНК между iPSC и IVF-ESC, но в целом были ближе к IVF-ESC.

Было исследовано несколько разных подмножеств зондов. Наблюдались более высокие уровни метилирования среди линий iPSC по сравнению с линиями IVF-ESC, что согласуется с предыдущими сообщениями. Изученные подмножества включали: зонды, расположенные в пределах -2000 п.о. от стартового участка транскрипции (TSS); CpG-островки (CGI); участки 5' и 3' (0-2 kb от CGI и 2-4 kb от CGI); Промоторы FANTOM 4 с низким и высоким содержанием CpG; прогнозируемые энхансеры; основные области комплекса гистосовместимости; CDMR (связанные с раком DMR) и R-DMR (связанные с перепрограммированием DMR); и повторяющиеся элементы. Наибольшая разница между iPSC и NT/IVF-ESC была очевидна в R-DMR, где iPSC были очень похожи на родительские HDF. Это открытие удивительно, так как ранее сообщалось, что R-DMR дифференциально метилированы между iPSC и фибробластами.

Аберрантное перепрограммирование метилирования CG, обнаруженное секвенированием целого генома бисульфита: чтобы получить более детальную картину основных различий метилирования между линиями NT-ESC и iPSC, метиломы базового разрешения с высоким охватом соответствующих линий стволовых клеток HDF и контрольных групп IVF-

ESC (охват варьировался от 14X до 25X) были получены при помощи MethylC-Seq. Затем данные сравнивались с существующими цельными метиломными данными из трех дополнительных линий IVF-ESC (H1, H9 и HUES6). Иерархическая кластеризация уровня метилирования в CG-DMR продемонстрировала, что ландшафт метилирования CG в NT-ESC более сходен с ландшафтом IVF-ESC по сравнению с iPSC. Сравнивая метиломы всех IVF-ESC, NT-ESC, iPSC и фильтрующих областей, которые были неясны по схеме метилирования или сильно варьировали в IVF-ESC, было идентифицировано в общей сложности 678 CG-DMR, которые присутствовали, как минимум, в одной линии NT-ESC или iPSC, но не в IVF-ESC (FDR=0,01, также см. Методы). Большинство этих CG-DMR были идентифицированы в iPSC (619), тогда как NT-ESC содержали в 3 раза меньше (212). В общей сложности 153 CG-DMR были распределены между обоими типами клеток. Используя аналогичный подход скрининга CG-DMR, было рассчитано, что пять предварительно профилированных линий iPSC несут в общей сложности 792 CG-DMR, что свидетельствует о сопоставимости обеих групп iPSC. Детальный анализ показал, что большинство этих CG-DMR были локализованы в CG-островках и генных телах. Анализ распределения CG-DMR по отдельным клеточным линиям показал, что каждая линия NT-ESC имела меньше аберрантных областей метилирования CG, чем любая из линий iPSC, снова подразумевая, что NT-ESC были более похожи на контроли (значение $p=0,0147$, тест Манна-Уитни). Затем CG-DMR были распределены на три группы: DMR памяти (mDMR), которые использовались совместно с HDF; NT-специфичные (ntDMR) и iPSC-специфичные DMR (iDMR). Сравнивая количество mDMR и специфичных для клеток DMR, было обнаружено, что в среднем 38% всех CG-DMR в линиях NT-ESC имели происхождение соматической памяти, в то время как 22% DMR в iPSC имели происхождение соматической памяти.

Проверка рекуррентных CG-DMR (участок активации DMR), которые были идентифицированы в каждой линии iPSC или NT-ESC, показала, что четыре линии NT-ESC имели 50 участков активации DMR, что было в 2 раза меньше, чем 104 участка активации DMR, присутствующих во всех четырех линиях iPSC. Интересно, что 48 из 50 участков активации DMR, идентифицированных среди NT-ESC, были также разделены с iPSC (значение $p<0,001$, гипергеометрический тест). Дальнейший анализ этих участков активации DMR, общих для всех 8 клеточных линий, показал, что 63% (30 из 48) были mDMR. Это говорит о том, что большинство участков активации DMR, общих как для NT-ESC, так и для iPSC, представляют собой области, устойчивые к перепрограммированию любым из этих подходов.

Только 2 из 50 (4%) участков активации DMR были уникальными для NT-ESC по сравнению с 56 из 104 (54%) конкретных точек доступа iPSC. Это подразумевает, что SCNT связан с меньшим количеством новых aberrантных случаев метилирования CG по сравнению со способом перепрограммирования iPSC.

NT-ESC показывают менее aberrантное метилирование без CG, чем iPSC: распространенное и исключительное метилирование без CG было обнаружено в плюрипотентных стволовых клетках по сравнению с фибробластами. Кроме того, iPSC часто несут метилирование без CG в мегабаземных регионах. Здесь показано, что единственными областями в массиве метилирования, где iPSC были последовательно гипометилированы по сравнению с NT/IVF-ESC, были участки без CpG, включая «мега-DMR». На 110 участках без CpG в мега-DMR, проверенных с помощью Infinium HumanMethylation450 BeadChip, iPSC были значительно гипометилированы по сравнению с IVF-ESC ($P < 0,001$, тест Манна-Уитни), в то время как между NT-ESC и IVF-ESC существенной разницы не было. Поскольку не-CpG метилирование заметно более распространено в плюрипотентных клетках по сравнению с фибробластами, эти результаты согласуются с представлением о том, что SCNT приводит к более полному репрограммированию, чем стандартное репрограммирование на основе транскрипционных факторов.

Для более детального изучения степени метилирования без CG, систематически определяли регионы, демонстрирующие крупномасштабные различия в метилировании без CG в перепрограммированных клеточных линиях по сравнению с IVF-ESC. Пять линий IVF-ESC служили золотым стандартом метилирования для плюрипотентных стволовых клеток. В общей сложности было идентифицировано 150 аутосомных мега-DMR без CG при сравнении метилом четырех NT-ESC с девятью iPSC с контрольной группой. Мега-DMR без CG, связанные с половыми хромосомами, были исключены из этого исследования из-за смешанного пола пяти контрольных IVF-ESC. Эти мега-DMR без CG охватывали 123 Мб генома и включали все участки, о которых сообщалось в предыдущем исследовании (99% оснований). Из всех 150 мега-DMR без CG, идентифицированных в комбинированном наборе данных, 77 были идентифицированы как в NT-ESC, так и в iPSC из этого исследования, из которых 75 произошли исключительно в iPSC. Эти DMR были распределены на каждую аутосомную хромосому, кроме 13-й хромосомы. Только 7 мега-DMR без CG (в 10 раз меньше) присутствовали в NT-ESC и были локализованы на четырех хромосомах. Показано, что мега-DMR без CG значительно ближе к центральным и теломерным участкам по сравнению с перетасованными мега-DMR без CG (значение $p < 0,001$).

Наблюдалось несколько различных паттернов aberrантного метилирования без CG, включая гипометилирование только в iPSC, гипометилирование как в NT-ESC, так и в iPSC и гиперметилирование только в iPSC. Однако подавляющее большинство мега-DMR без CG (79,6% или 92,5% от общего количества оснований) были гипометилированы в iPSC и/или NT-ESC по сравнению с IVF-ESC.

iPSC, описанные в данном документе, были определены как аналогичные другим iPSC по сравнению с линиями iPSC, созданными ранее. Четыре линии iPSC из этого исследования содержали в общей сложности 75 DMR, в то время как пять линий iPSC, сгенерированных ранее, содержали 121 мега-DMR без CG. Это указывает на то, что, несмотря на различное происхождение соматических клеток и возможные различия в культуре в разных лабораториях, линии iPSC имеют сходные уровни aberrантного метилирования без CG. Напротив, NT-ESC показали менее aberrантное метилирование без CG по сравнению со всеми iPSC (значение $p < 0,005$, тест Манна-Уитни). Иерархическая кластеризация iPSC и NT-ESC по состоянию метилирования без CG для всех мега-DMR без CG также подтверждает вывод о том, что NT-ESC больше похожи на IVF-ESC, чем на iPSC.

Чтобы понять функциональное влияние мега-DMR без CG, была изучена транскрипционная активность в этих участках. В среднем, 2 гена в NT-ESC и 30 в iPSC были расположены в мега-DMR без CG, что означает, что под потенциальным нарушением в результате метилирования находится меньшее количество генов в NT-ESC (значение $p = 0,0147$, тест Манна-Уитни). GO-анализ для генов в гипометилированных DMR без CG показал, что эти гены были обогащены по категориям, связанным с обонятельной трансдукцией, дифференцировкой эпидермальных клеток, цитоскелетом, иммуноглобулином и гомеобоксом ($FDR \leq 0.001$). Экспрессия генов в iPSC для 2 генов в гиперметилированных мега-DMR без CG была повышенной, тогда как экспрессия 24 генов в iPSC и 6 генов в NTESC в гипометилированных мега-DMR без CG была пониженной, в соответствии с предыдущими результатами (значение $p < 0,001$). Взятые вместе, эти наблюдения показывают, что на участках метилирования без CG NT-ESC были более точно перепрограммированы в состояние, которое более близко напоминало состояние золотого стандарта IVF-ESC по сравнению с iPSC. Среди NTESC NT4 имел наименее aberrантные метилирования как в контексте CG, так и в контексте без CG.

Глобальная экспрессия генов: Наконец, сравнивали глобальные паттерны экспрессии генов из специфичной для цепи RNA-Seq. В соответствии с метилированием ДНК, внутригрупповая вариабельность была

одинаковой среди трех типов плюрипотентных клеток (CV: NT-ESC = 1,41, IVF-ESC = 1,45, iPSC = 1,44) и неконтролируемая иерархическая кластеризация с повторной выборкой при начальной загрузке показала, что, в отличие от iPSC, NT-ESC тесно связаны с IVF-ESC. Анализ дифференциальной экспрессии ($FDR < 0,05$) среди типов плюрипотентных стволовых клеток позволил получить 1220925 транскриптов, которые были сгруппированы в 10 кластеров путем неконтролируемой кластеризации. Большинство (65%) этих генов были значительно повышены или понижены в iPSC по сравнению с NT-ESC и IVF-ESC. Кластеры 2 и 3 показали более высокую экспрессию генов в NT-ESC и IVF-ESC по сравнению с iPSC. Будучи подвергнутыми функциональному анализу обогащения, эти кластеры были связаны с сигнальным путем p38 MAPK ($FDR = 0,02$; $n = 51$) и Krueppel-ассоциированными бокс-генами ($FDR = 0,001$; $n = 91$), соответственно. Кластер 10 имел транскрипты, которые были активированы в IVF-ESC по сравнению как с NT-ESC, так и с iPSC. Этот кластер включает гены, связанные «цинковыми пальцами» и C2H2-подобными генами ($FDR = 0,002$; $n = 227$). Транскрипты в кластере 8 были обогащены для экспрессии MGI гигантских клеток первичного трофобласта TS10 ($FDR = 0,03$; $n = 46$). Гены в кластере 5, связанные с Y-сцепленным наследованием, были активированы в одной паре мужского IVF-ESC.

На основании результатов анализа дифференциальной экспрессии были обнаружены признаки транскрипционной памяти. Чтобы определить, какие гены отображают транскрипционную память как в наших линиях iPSC, так и в линиях NT-ESC, были проведены три отдельных t-теста между образцами HDF и линиями IVF-ESC, линиями NT-ESC и линиями IVF-ESC и линиями iPSC и линиями IVF-ESC при пороге FDR 0,05. Также были идентифицированы гены, которые были дифференциально экспрессированы как в HDF, так и в NT-ESC или в линиях iPSC. Всего было экспрессировано 24 гена на значительно более низких уровнях в NT-ESC и HDF по сравнению с IVF-ESC. Они представляли собой гены, которые были потенциально не полностью реактивированы во время перепрограммирования. Всего было экспрессировано 12 генов на значительно более высоких уровнях в NT-ESC и HDF по сравнению с IVF-ESC. Они представляли собой гены, которые были потенциально не полностью заглушены во время перепрограммирования. Для сравнения: 171 ген в линиях iPSC, которые были потенциально не полностью реактивированы, и 32 гена, которые были потенциально не полностью подавлены. Таким образом, количество пораженных генов было заметно выше в iPSC по сравнению с NT-ESC.

Затем было исследовано, имеют ли гены, которые проявляют транскрипционную память, также различия в метилировании промоторной ДНК. Только гены, которые были не полностью реактивированы в наших линиях iPSC, обладали значительным отличием в метилировании в своих участках промотора (тест Манна-Уитни $p < 2,2 \times 10^{-16}$) по сравнению с линиями IVF-ESC. Это говорит о том, что неполное деметилирование промоторных участков могло происходить во время генерации iPSC и приводило к транскрипционным различиям между нашими iPSC и IVF-ESC. В целом, результаты экспрессии генов и метилирования ДНК были согласованы, и в обоих случаях предполагается, что линии NT-ESC заметно больше похожи на IVF-ESC, чем на iPSC.

Формула изобретения

1. Способ получения плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемых переносом ядер соматических клеток, включающий процессы энуклеизации донорского ооцита, ядерного переноса соматических клеток и культивирование эмбриона, отличающийся тем, что

проводят энуклеизацию донорского ооцита путем удаления веретена метафазы II без снижения уровня фактора созревания, и с образованием цитопласта;

осуществляют взаимодействие донорского ядра с экстрактом гемагглютинирующего вируса Японии (HVJ-E) с последующим взаимодействием цитопласта с донорским ядром с образованием эмбриона ядерного переноса соматических клеток (далее – SCNT);

обрабатывают ингибитором протеинфосфатазы, включающим кофеин, ооцит и/или цитопласт, и/или донорское ядро и/или эмбрион SCNT,

осуществляют воздействие, по меньшей мере, одного импульса электропорации на эмбрион SCNT с получением активированного эмбриона SCNT;

культивируют активированный эмбрион SCNT в первой среде, далее во второй среде, далее в третьей среде с образованием бластоциста;

культивируют бластоцисты на фидерном слое с последующим выбором клетки с эмбриональной стволовой клеточной морфологией.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что осуществляют воздействие первым импульсом электропорации – импульсом постоянного тока длительностью 50 мкс при 2,7 кВ см⁻¹, и при необходимости повторяют вторым импульсом электропорации, идентичным по параметрам первому импульсу.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивируют активированный эмбрион SCNT в первой среде, содержащей, по меньшей мере, 2 mM 6-диметиламинопуринов в течение, по меньшей мере, 4 часов

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивируют активированный эмбрион SCNT во второй среде, содержащей, по меньшей мере, 10 mM трихостатин А в течение, по меньшей мере, 12 часов.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивируют активированный эмбрион SCNT в третьей среде, содержащей, по меньшей мере, BSA и β-меркаптоэтанол.

ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ(статья 15(3) ЕАПК и правило 42
Патентной инструкции к ЕАПК)Номер евразийской заявки:
201900232

Дата подачи: 15 апреля 2019 (15.04.2019) Дата испрашиваемого приоритета: 09 апреля 2019 (09.04.2019)

Название изобретения: Способ получения плюрипотентных стволовых клеток, продуцируемых переносом ядер соматических клеток

Заявитель: ТОВАРИЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "СЕНТРАКОР"

☐ Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)☐ Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

МПК: C12N 5/0735 (2010.01)

СПК: C12N 5/0696 (2013-01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 7/00 (2017-08)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/09 (2013-01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)

C12N 5/02, 5/0735, 15/09, 7/00

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	US 2017/0152476 A1 (OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY) 01.06.2017 формула	1-5
A	US 9896699 B2 (NEW YORK STEM CELL FOUNDATION, INC.) 20.02.2018, формула	1-5
A	WO 2018/089553 A1 (OREGON HEALTH & SCIENCE UNIVERSITY et al.) 17.05.2018, формула	1-5
A	RU 2352637 C1 (ТЕПЛЯШИН АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ) 20.04.2009, формула	1-5

☐ последующие документы указаны в продолжении графы В☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"А" документ, определяющий общий уровень техники

"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета

"D" документ, приведенный в евразийской заявке

"Т" более поздний документ, опубликованный после даты

приоритета и приведенный для понимания изобретения

"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

"L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска: 04 сентября 2019 (04.09.2019)

Наименование и адрес Международного поискового органа:

Федеральный институт

промышленной собственности

РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб.,

д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо



М.А. Белугин

Телефон № (499) 240-25-91