

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091354** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.08.20**

(51) Int. Cl. *C12N 5/079* (2010.01)  
*C12N 5/071* (2010.01)  
*C12N 5/0735* (2010.01)  
*C12N 5/10* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2018.11.29**

---

(54) **СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК**

---

(31) **2017-230074**

(72) Изобретатель:

(32) **2017.11.30**

**Икея Макото, Камия Яей (JP)**

(33) **JP**

(74) Представитель:

(86) **PCT/JP2018/043949**

**Медведев В.Н. (RU)**

(87) **WO 2019/107485 2019.06.06**

(71) Заявитель:

**КИОТО ЮНИВЕРСИТИ; ТАКЕДА  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КОМПАНИ  
ЛИМИТЕД (JP)**

---

(57) В качестве способа обеспечения пролиферации клеток нервного гребня без уменьшения способности к дифференцировке предусматривается способ получения клеток нервного гребня, включающий стадии (1) получения клеток нервного гребня и (2) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста (bFGF), где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, который демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 и ниже 5 мкМ.

**A1**

**202091354**

**202091354**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 562277EA/026

### СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001]

Настоящее изобретение относится к способу получения клеток нервного гребня, к способу обеспечения возможности пролиферации клеток нервного гребня, к среде, к замороженной исходной культуре и к способу получения различных типов клеток из клеток нервного гребня. Более конкретно, настоящее изобретение относится к способу получения клеток нервного гребня, к способу обеспечения возможности пролиферации клеток нервного гребня, к среде для применения в этих способах, к замороженной исходной культуре, содержащей клетки нервного гребня, и к способу получения различных типов клеток, дифференцировка в которые может быть индуцирована из клеток нервного гребня.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002]

Клетки нервного гребня (NCC) представляют собой клетки, которые образуются между нейроэктодермой и эпидермальной эктодермой, когда из нервной пластинки формируется нервная трубка в ходе раннего развития. Эти клетки обладают мультипотентностью для дифференцировки во многие типы клеток, такие как нервные клетки, глиальные клетки, мезенхимные стромальные клетки, клетки костей, хондроциты, клетки роговицы и пигментные клетки, и способностью к самопролиферации. Такая мультипотентность и способность к самопролиферации указывают на пригодность клеток нервного гребня в качестве средства клеточной терапии для регенеративной медицины. Таким образом, остается потребность в способе эффективного поддержания или пролиферации клеток нервного гребня.

[0003]

В непатентном документе 1 описано, что клетки нервного гребня индуцируются из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) человека, и, кроме того, из клеток нервного гребня индуцируются мезенхимные стромальные клетки и т.п. В непатентном документе 1 клетки нервного гребня подвергают поддерживающему культивированию посредством прикрепляющейся культуры с использованием среды, дополненной ингибитором TGF $\beta$ , эпидермальным фактором роста (EGF) и основным фибробластным фактором роста (bFGF (также обозначаемый как FGF2)).

[0004]

В непатентном документе 2 описано, что клетки нервного гребня индуцируются из нервной трубки куриного эмбриона, и, кроме того, из клеток нервного гребня индуцируются глиальные клетки и т.п. В непатентном документе 2 клетки нервного гребня подвергают поддерживающему культивированию посредством суспензионной культуры с использованием среды, дополненной экстрактами эмбрионов курицы,

инсулиноподобным фактором роста (IGF), bFGF и ретиноевой кислотой (RA).

[0005]

В непатентном документе 3 описано, что клетки нервного гребня индуцируются из эмбриональных стволовых клеток (ESC) человека или iPSC человека, и, кроме того, из клеток нервного гребня индуцируются гладкомышечные клетки и т.п. В непатентном документе 3 клетки нервного гребня подвергают поддерживающему культивированию посредством прикрепляющейся культуры с использованием среды, дополненной ингибитором GSK3 $\beta$  и ингибитором TGF $\beta$ .

[0006]

В непатентном документе 4 описано, что клетки нервного гребня индуцируются из iPSC человека, и их поддерживают посредством прикрепляющейся культуры или суспензионной культуры с использованием среды, дополненной ингибитором GSK3 $\beta$ , ингибитором TGF $\beta$ , EGF и bFGF. В непатентном документе 4 описано, что количество и доля клеток нервного гребня в популяции культивируемых клеток в поддерживающей культуре, осуществляемой посредством культивирования прикрепляющихся клеток, снижались зависимым от концентрации образом в диапазоне концентраций bFGF от 0 пг/мл до 10 нг/мл (см. фиг.5A-5C). В поддерживающей культуре, осуществляемой посредством культивирования суспензионной культуры, присутствие Sox10-положительных клеток подтверждали посредством культивирования в течение 7 суток с использованием 1 мкМ CHIR99021 в качестве ингибитора GSK3 $\beta$ . Однако не было определено, обладали ли клетки мультипотентностью.

[0007]

Ни в одном из патентных документов 1-4 не описано, что клетки нервного гребня поддерживают и позволяют им пролиферировать посредством суспензионной культуры с использованием среды, дополненной CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ и bFGF.

Список литературы

Непатентные документы

[0008]

Непатентный документ 1: Fukuta M. et al., "Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media.", PLoS One, 2014, 9(12):e112291.

Непатентный документ 2: Kerosuo L. et al., "Crestospheres: Long-Term Maintenance of Multipotent, Premigratory Neural Crest Stem Cells.", Stem Cell Reports, 2015, 5(4):499-507.

Непатентный документ 3: Menendez L. et al., "Wnt signaling and a Smad pathway blockade direct the differentiation of human pluripotent stem cells to multipotent neural crest cells.", Proc. Natl. Acad. Sci., 2011, 108(48):19240-5.

Непатентный документ 4: Horikiri T. et al., "SOX10-Nano-Lantern Reporter Human iPS Cells; A Versatile Tool for Neural Crest Research.", PLoS One, 2017, 12(1):e0170342.

Сущность изобретения

Техническая проблема

[0009]

Клетки нервного гребня изначально обладают мультипотентностью для дифференцировки во многие типы клеток, такие как нервные клетки, глиальные клетки, мезенхимные стромальные клетки, клетки костей, хондроциты, клетки роговицы и пигментные клетки. Однако известно, что в культуре клеток нервного гребня мультипотентность постепенно снижается и уменьшается количество типов клеток, в которые клетки нервного гребня могут дифференцироваться.

[0010]

Основной задачей настоящего изобретения является предоставление способа культивирования и пролиферации клеток нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность, на протяжении длительного периода времени.

Решение проблемы

[0011]

Для выполнения задачи настоящее изобретение относится следующим [1]-[21b].

[1] Способ получения клеток нервного гребня, включающий стадии:

(1) получения клеток нервного гребня; и

(2) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста (bFGF), где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.

[1a] Способ получения согласно [1], где концентрация ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[1b] Способ получения согласно [1], где

эффект оценивают, исходя из активности ингибитора GSK3 $\beta$  в отношении ингибирования GSK3 $\beta$ , где

активность ингибитора GSK3 $\beta$  в отношении ингибирования GSK3 $\beta$  определяют посредством методик:

(i) культивирования клеток, экспрессия репортерного гена которых подавляется под контролем GSK3 $\beta$ , в присутствии и в отсутствии ингибитора GSK3 $\beta$ ;

(ii) определения уровня экспрессии репортерного гена в присутствии и в отсутствии ингибитора GSK3 $\beta$ ; и

(iii) определения активности ингибитора GSK3 $\beta$  в отношении ингибирования GSK3 $\beta$ , исходя из величины увеличения уровня экспрессии репортерного гена в присутствии ингибитора GSK3 $\beta$  относительно уровня экспрессии репортерного гена в отсутствии ингибитора GSK3 $\beta$ .

[2] Способ получения согласно [1], где среда дополнительно содержит ингибитор TGF $\beta$ .

[3] Способ получения согласно [1], где среда представляет собой среду CDM.

[4] Способ получения согласно [1], где среда дополнительно содержит эпидермальный фактор роста (EGF).

[5] Способ получения согласно [1], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой по меньшей мере один представитель, выбранный из группы, состоящей из CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, кенпауллона, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 и SB415286.

[6] Способ получения согласно [5], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CHIR99021.

[6a] Способ получения согласно [6], где CHIR99021 имеет концентрацию выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[6b] Способ получения согласно [6a], где CHIR99021 имеет концентрацию 2 или выше и 4,5 мкМ или ниже.

[6c] Способ получения согласно [5], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CP21R7.

[6d] Способ получения согласно [6c], где CP21R7 имеет концентрацию 0,5 или выше и 1 мкМ или ниже.

[7] Способ получения согласно [2], где ингибитор TGF $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 и SB505124.

[7a] Способ получения согласно любому из [1]-[7], где bFGF имеет концентрацию от 20 до 40 нг/мл.

[8] Способ получения согласно [1], где на стадии (2) клетки нервного гребня пассируют каждые 5-8 суток после инокуляции.

[9] Способ получения согласно [1], где стадия (1) представляет собой стадию индукции дифференцировки стволовых клеток в клетки нервного гребня.

[10] Способ обеспечения пролиферации клеток нервного гребня, включающий стадию:

(I) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста (bFGF), где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.

[10a] Способ пролиферации согласно [10], где концентрация ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[10b] Способ пролиферации согласно [10], где среда дополнительно содержит ингибитор TGF $\beta$ .

[10c] Способ пролиферации согласно [10], где среда представляет собой среду CDM.

[10d] Способ пролиферации согласно [10], где среда дополнительно содержит

эпидермальный фактор роста (EGF).

[10e] Способ пролиферации согласно [10], где ингибитор GSK3 $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, кенпауллона, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 и SB415286.

[10f] Способ пролиферации согласно [10e], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CHIR99021.

[10g] Способ пролиферации согласно [10f], где CHIR99021 имеет концентрацию выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[10h] Способ пролиферации согласно [10g], где CHIR99021 имеет концентрацию 2 или выше и 4,5 мкМ или ниже.

[10i] Способ пролиферации согласно [10e], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CP21R7.

[10j] Способ пролиферации согласно [10i], где CP21R7 имеет концентрацию 0,5 или выше и 1 мкМ или ниже.

[10k] Способ пролиферации согласно [10b], где ингибитор TGF $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 и SB505124.

[10l] Способ пролиферации согласно [10], где на стадии (I), клетки нервного гребня пассируют каждые 5-8 суток после инокуляции.

[11] Среда, содержащая ингибитор GSK3 $\beta$ , основной фибробластный фактор роста (bFGF) и клетки нервного гребня, где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.

[11a] Среда согласно [11], где концентрация ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[12] Среда согласно [11], дополнительно содержащая ингибитор TGF $\beta$ .

[13] Среда согласно [11], где среда представляет собой среду CDM.

[14] Среда согласно [11], дополнительно содержащая эпидермальный фактор роста (EGF).

[15] Среда согласно [11], где ингибитор GSK3 $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, кенпауллона, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 и SB415286.

[16] Среда согласно [15], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CHIR99021.

[16a] Среда согласно [16], где CHIR99021 имеет концентрацию выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[16b] Среда согласно [16a], где CHIR99021 имеет концентрацию 2 или выше и 4,5 мкМ или ниже.

[16c] Среда согласно [15], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CP21R7.

[16d] Среда согласно [16c], где CP21R7 имеет концентрацию 0,5 или выше и 1 мкМ или ниже.

[17] Среда согласно [12], где ингибитор TGF $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 и SB505124.

[18] Замороженная исходная культура, содержащая клетки нервного гребня, полученные способом получения согласно [1].

[18a] Замороженная исходная культура согласно [18], где замороженную исходную культуру получают посредством стадий:

отделения клеток нервного гребня, полученных посредством стадий способа получения согласно [1]; и

сuspендирования отделенных клеток нервного гребня в растворе для консервации клеток с последующим замораживанием.

[19] Способ получения нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток кости, хондроцитов, клеток роговицы или пигментных клеток, включающий стадии:

(i) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста (bFGF), где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ; и

(ii) дифференцировки клеток нервного гребня, полученных на стадии (i), в клетки по меньшей мере одной линии, выбранной из группы, состоящей из нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток кости, хондроцитов, клеток роговицы и пигментных клеток.

[19a] Способ получения согласно [19], где концентрация ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[19b] Способ получения согласно [19], где среда дополнительно содержит ингибитор TGF $\beta$ .

[19c] Способ получения согласно [19], где среда представляет собой среду CDM.

[19d] Способ получения согласно [19], где среда дополнительно содержит эпидермальный фактор роста (EGF).

[19e] Способ получения согласно [19], где ингибитор GSK3 $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, кенпауллона, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 и SB415286.

[19f] Способ получения согласно [19e], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CHIR99021.

[19g] Способ получения согласно [19f], где CHIR99021 имеет концентрацию выше

1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[19h] Среда согласно [19g], где CHIR99021 имеет концентрацию 2 или выше и 4,5 мкМ или ниже.

[19i] Среда согласно [19e], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CP21R7.

[19j] Способ получения согласно [19i], где CP21R7 имеет концентрацию 0,5 или выше и 1 мкМ или ниже.

[19k] Способ получения согласно [19b], где ингибитор TGF $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 и SB505124.

[19l] Способ получения согласно [19], где на стадии (I), клетки нервного гребня пассируют каждые 5-8 суток после инокуляции.

[20] Способ культивирования клеток нервного гребня, обладающих мультипотентностью, в течение длительного периода времени, включающий стадии:

(1) получения клеток нервного гребня; и

(2) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста, где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.

[20a] Способ культивирования согласно [20], где концентрация ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который проявляет CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[20b] Способ культивирования согласно [20], где среда дополнительно содержит ингибитор TGF $\beta$ .

[20c] Способ культивирования согласно [20], где среда представляет собой среду CDM.

[20d] Способ культивирования согласно [20], где среда дополнительно содержит эпидермальный фактор роста (EGF).

[20e] Способ культивирования согласно [20], где ингибитор GSK3 $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, кенпауллона, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 и SB415286.

[20f] Способ культивирования согласно [20e], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CHIR99021.

[20g] Способ культивирования согласно [20f], где CHIR99021 имеет концентрацию выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ.

[20h] Способ культивирования согласно [20g], где CHIR99021 имеет концентрацию 2 или выше и 4,5 мкМ или ниже.

[20i] Способ культивирования согласно [20e], где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CP21R7.



[20j] Способ культивирования согласно [20i], где CP21R7 имеет концентрацию 0,5 или выше и 1 мкМ или ниже.

[20k] Способ культивирования согласно [20b], где ингибитор TGF $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 и SB505124.

[20l] Способ культивирования согласно [20], где на стадии (I) клетки нервного гребня пассируют каждые 5-8 суток после инокуляции.

[21] Применение среды, содержащей основной фибробластный фактор роста и ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ, для культивирования клеток нервного гребня, обладающих мультипотентностью, в течение длительного периода времени.

[21a] Применение основного фибробластного фактора роста и ингибитора GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ, для культивирования клеток нервного гребня.

[21b] Применение основного фибробластного фактора роста и ингибитора GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ, для получения среды для клеток нервного гребня.

[0012]

Как используют в рамках изобретения, "плюрипотентность" означает способность к дифференцировке в ткани и клетки, имеющие различные формы и функции, и способность к дифференцировке в клетки любого ростка 3 зародышевых слоев. "Плюрипотентность" отличается от "тотипотентности", которая представляет собой способность к дифференцировке в любую ткань живого организма, включая плаценту, тем, что плюрипотентные клетки не могут дифференцироваться в плаценту и, таким образом, не обладают способностью к формированию индивидуума.

[0013]

"Мультипотентность" означает способность к дифференцировке в значительные, но ограниченные количества линий клеток. Например, мезенхимные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, нейральные стволовые клетки являются мультипотентными, но не плюрипотентными. Клетки нервного гребня обладают мультипотентностью для дифференцировки в клетки, такие как нервные клетки, глиальные клетки, мезенхимные стромальные клетки, клетки костей, хондроциты, клетки роговицы и пигментные клетки.

[0014]

Как используют в рамках изобретения, "культура" относится к поддержанию, пролиферации (росту) и/или дифференцировке клеток в условиях *in vitro*. "Культивирование" означает поддержание клеток и/или обеспечения возможности клетка

пролиферировать (расти) и/или дифференцироваться из ткани или организма, например, в чашке или флаконе для культивирования клеток.

[0015]

"Прикрепляющаяся культура" означает культуру в состоянии, где клетки прикреплены к контейнеру, например, в состоянии, где клетки прикреплены к чашке или флакону для культивирования клеток, изготовленным из стерилизованной пластмассы (или покрытой пластмассы) в присутствии подходящей среды.

"Суспензионная культура" означает культуру в состоянии, где клетки диспергированы в качестве единичных клеток или в качестве клеточных сфер, каждая из которых состоит из двух или более клеток, в подходящей среде без прикрепления к контейнеру.

[0016]

"Экспансионная культура" означает культуру с целью обеспечения пролиферации желаемых клеток.

[0017]

"Ингибитор GSK3 $\beta$ " представляет собой вещество, обладающее активностью ингибирования GSK3 $\beta$  (киназа гликогенсинтазы 3 $\beta$ ). GSK3 (киназа 3 гликогенсинтазы) представляет собой сериновую/треониновую протеинкиназу, и она вовлечена во многие сигнальные пути, ассоциированные с продуцированием гликогена, апоптозом, поддержанием стволовых клеток и т.д. GSK3 имеет 2 изоформы:  $\alpha$  и  $\beta$ . "Ингибитор GSK3 $\beta$ ", используемый в рамках настоящего изобретения, конкретно не ограничен при условии, что ингибитор GSK3 $\beta$  обладает активностью ингибирования GSK3 $\beta$ . Ингибитор GSK3 $\beta$  может представлять собой вещество, обладающее как активностью ингибирования GSK3 $\beta$ , так и активностью ингибирования GSK3 $\alpha$ .

[0018]

"Ингибитор TGF $\beta$ " представляет собой вещество, обладающее активностью ингибирования TGF $\beta$  (трансформирующий фактор роста  $\beta$ ). TGF $\beta$  представляет собой цитокин, связывающийся с двумя типами рецепторов сериновых/треониновых протеинкиназ и контролирующей пролиферацию клеток, дифференцировку клеток, клеточную смерть и т.д. посредством передачи сигнала, в основном для активации Smad (R-Smad). Примеры вещества, обладающего активностью ингибирования TGF $\beta$ , включают вещества, ингибирующие связывание TGF $\beta$  с его рецептором, и вещества, ингибирующие нижеследующие сигналы после связывания TGF $\beta$  с его рецептором. Примеры нижеследующих сигналов включают фосфорилирование рецептора TGF $\beta$ I рецептором TGF $\beta$ II и фосфорилирование Smad фосфорилированным рецептором TGF $\beta$ I. "Ингибитор TGF $\beta$ ", используемый в рамках настоящего изобретения, конкретно не ограничен при условии, что ингибитор TGF $\beta$  обладает активностью ингибирования TGF $\beta$ .

[0019]

Как используют в рамках изобретения, "маркер" представляет собой "маркерный белок" или "маркерный ген" и означает белок, который специфически экспрессируется на

клеточной поверхности, в цитозоле и/или в ядре заданного типа клеток, или его ген. Маркер может представлять собой маркер положительной селекции и маркер отрицательной селекции. Предпочтительно маркер представляет собой маркер клеточной поверхности. В частности, маркер клеточной поверхности для положительной селекции позволяет концентрирование, выделение и/или детекцию живых клеток.

Детекцию маркерного белка можно проводить с использованием иммунологического анализа, например, ELISA, иммунного окрашивания или проточной цитометрии, с использованием антитела, специфичного к маркерному белку. В качестве антитела, специфичного к маркерному белку, можно использовать антитело, которое связывается с определенной аминокислотной последовательностью маркерного белка или определенной сахарной цепью, связанной с маркерным белком, и т.д. В случае внутриклеточно экспрессируемого маркерного белка, который не появляется на поверхности клеток (например, фактор транскрипции или его субъединца), детекцию представляющего интерес маркерного белка можно проводить путем экспрессии маркерного белка с репортерным белком и детекции репортерного белка (например, непатентный документ 4). Этот способ предпочтительно можно использовать, когда не могут найти подходящий маркер клеточной поверхности. Детекцию маркерного гена можно проводить с использованием способа амплификации и/или детекции нуклеиновых кислот, известного в данной области, например, ОТ-ПЦР, микрочипов, биочипов или секвенирования РНК.

[0020]

Как используют в рамках изобретения, "экспрессию" определяют как транскрипцию и/или трансляцию определенной нуклеотидной последовательности, запускаемую внутриклеточным промотором.

[0021]

Как используют в рамках изобретения, термин "содержат(содержит)" или "содержащий" относится к включению элемента(ов) после этого слова без его ограничений. Таким образом, это указывает на включение элемента(ов) после этого слова, но не указывает на исключение какого-либо другого элемента.

[0022]

Как используют в рамках изобретения, термин "приблизительно" или "примерно" относится к величине, которая может отклоняться вплоть до плюс или минус 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от эталонной величины. Предпочтительно, термин "приблизительно" или "примерно" относится к диапазону от минус до плюс 15%, 10%, 5% или 1% от эталонной величины.

Преимущественные эффекты изобретения

[0023]

Настоящее изобретение относится способу культивирования и пролиферации клеток нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность, на протяжении длительного периода.

## Краткое описание чертежей

[0024]

[Фиг.1] На фиг.1 представлен график, демонстрирующий изменение общего количества клеток после начала культивирования с использованием экспансионной культуры клеток нервного гребня (пример 1). По оси ординат представлено общее количество клеток, и "1.E+" соответствует множителю 10. Например, "1.E+04" означает 10000 клеток. По оси абсцисс представлено количество суток культивирования.

[Фиг.2] На фиг.2 представлен график, демонстрирующий изменение процента клеток, положительных по экспрессии SOX10, после начала культивирования с использованием экспансионной культуры клеток нервного гребня (пример 1). По оси ординат представлен процент положительных по экспрессии SOX10 клеток (%). По оси абсцисс представлено количество суток культивирования.

[Фиг.3] На фиг.3 представлен график, демонстрирующий результаты измерения изменения общего количества клеток нервного гребня, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры, посредством использования концентраций bFGF и EGF 20 нг/мл (А) или 40 нг/мл (В) и использования концентраций CHIR99021 1, 2, 3 или 5 мкМ (указано как 1×, 2×, 3× и 5×, соответственно) (пример 2). По оси ординат представлено общее количество клеток и "1.E+" соответствует множителю 10. Например, "1.E+04" означает 10000 клеток. По оси абсцисс представлено количество суток культивирования.

[Фиг.4] На фиг.4 представлен график, демонстрирующий результаты измерения изменения общего количества клеток нервного гребня, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры, с использованием концентраций bFGF и EGF 40 нг/мл и с использованием концентраций CHIR99021 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мкМ (пример 2). По оси ординат представлено общее количество клеток и "1.E+" соответствует множителю 10.

[Фиг.5] На фиг.5 представлен график, демонстрирующий результаты измерения изменения процента клеток нервного гребня, положительных по экспрессии SOX10, которые подвергались культивированию с использованием экспансионной культуры, с использованием концентраций bFGF и EGF 20 нг/мл (А) или 40 нг/мл (В) и с использованием концентрации CHIR99021 1, 2, 3 или 5 мкМ (указано как 1×, 2×, 3× и 5×, соответственно) (пример 2). По оси ординат представлен процент положительных по экспрессии SOX10 клеток (%). По оси абсцисс представлено количество суток культивирования.

[Фиг.6] На фиг.6 представлен график, демонстрирующий результаты измерения изменения процента клеток нервного гребня, положительных по экспрессии SOX10, которые подвергались культивированию с использованием экспансионной культуры, с использованием концентраций bFGF и EGF 40 нг/мл и с использованием концентраций CHIR99021 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мкМ (пример 2). По оси ординат представлен процент положительных по экспрессии SOX10 клеток (%). По оси абсцисс представлено

количество суток культивирования.

[Фиг.7] На фиг.7 представлен график, демонстрирующий изменение процента клеток с положительной экспрессией SOX10 после начала культивирования с использованием экспансионной культуры клеток нервного гребня с использованием CP21R7 в качестве ингибитора GSK3 $\beta$  (пример 3). По оси ординат представлен процент положительных по экспрессии SOX10 клеток (%). По оси абсцисс представлено количество суток культивирования.

[Фиг.8] На фиг.8 представлен график, демонстрирующий результаты измерения изменения общего количества клеток нервного гребня, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры, с использованием концентрации bFGF 10, 12,5, 15,0 или 17,5 нг/мл (пример 8). По оси ординат представлено общее количество клеток и "1.E+" соответствует множителю 10.

[На фиг.9] На фиг.9 представлен график, демонстрирующий результаты измерения изменения процента общего количества клеток нервного гребня, положительных по экспрессии SOX10, которые подвергали культивированию с использованием экспансионной культуры, с использованием концентраций bFGF 10, 12,5, 15,0 или 17,5 нг/мл (пример 8). По оси ординат представлен процент положительных по экспрессии SOX10 клеток (%). По оси абсцисс представлено количество суток культивирования.

Описание вариантов осуществления

[0025]

Далее описаны подходящие способы осуществления настоящего изобретения. Варианты осуществления, описанные ниже, приведены только для иллюстрации типичных вариантов осуществления настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения не следует интерпретировать как ограниченный этими вариантами осуществления.

[0026]

[Способ получения клеток нервного гребня и способ обеспечения пролиферации клеток нервного гребня]

Способ получения клеток нервного гребня в соответствии с настоящим изобретением включает стадии, приведенные ниже. Из этих стадий стадия (2), в частности, представляет собой способ обеспечения возможности пролиферации клеток нервного гребня в соответствии с настоящим изобретением.

(1) Получение клеток нервного гребня; и

(2) культивирование с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста (bFGF), где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.

[0027]

[Стадия (1) получения клеток нервного гребня]

Стадия (1) получения клеток нервного гребня представляет собой стадию получения клеток нервного гребня для проведения стадии (2). Примеры способа получения клеток нервного гребня на стадии (1) включают, но конкретно не ограничиваются ими, способ индукции дифференцировки стволовых клеток в клетки нервного гребня, способ приобретения коммерчески доступных клеток нервного гребня, и способ сбора встречающихся в природе клеток нервного гребня.

[0028]

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для получения клеток нервного гребня для проведения стадии (2) можно индуцировать дифференцировку стволовых клеток в клетки нервного гребня.

[0029]

Примеры "стволовых клеток", которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, включают плюрипотентные стволовые клетки. "Плюрипотентные стволовые клетки", которые можно использовать в рамках настоящего изобретения, относятся к стволовым клеткам, которые могут дифференцироваться в различные ткани и клетки, имеющие различные формы и функции, и обладают способностью дифференцироваться в клетки любого роста из 3 зародышевых листков (энтодерма, мезодерма и эктодерма). Их примеры включают, но конкретно не ограничиваются ими, эмбриональные стволовые клетки (ESC), эмбриональные стволовые клетки, происходящие из клонированных эмбрионов, полученных посредством трансплантации ядра, сперматогониальные стволовые клетки, эмбриональные половые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (далее также обозначаемые как "iPSC"). "Мультипотентные стволовые клетки", которые могут использоваться в рамках настоящего изобретения, относятся к стволовым клеткам, обладающим способностью к дифференцировке в значительные, но ограниченные количества ростков клеток. Примеры "мультипотентных стволовых клеток", которые могут использоваться в рамках настоящего изобретения, включают стволовые клетки зубной пульпы, стволовые клетки, происходящие из слизистой оболочки полости рта, стволовые клетки волосяных фолликулов и соматические стволовые клетки, происходящие из культивируемых фибробластов и стволовых клеток костного мозга. Плюрипотентные стволовые клетки предпочтительно представляют собой ESC и iPSC.

[0030]

Доступные "ESC" включают ESC мыши, такие как различные линии ESC мыши, разработанные в inGenious Targeting Laboratory, Riken (Institute of Physical and Chemical Research) и т.п., и ESC человека, такие как различные линии ESC человека, разработанные University of Wisconsin, NIH, Riken, Kyoto University, National Center for Child Health and Development, Cellartis, и т.п. Например, в качестве линий ESC человека можно использовать линии с CHB-1 по CHB-12, линию RUES1, линию RUES2 и линии с HUES1 по HUES28, разработанные ESI Bio, линию H1 и линию H9, разработанные WiCell Research, и линию KhES-1, линию KhES-2, линию KhES-3, линию KhES-4, линию KhES-5,

линию SSES1, линию SSES2 и линию SSES3, разработанную Riken.

[0031]

"Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки" относятся к клеткам, которые получают путем перепрограммирования соматических клеток млекопитающих или недифференцированных стволовых клеток путем введения конкретных факторов (ядерные факторы перепрограммирования). В настоящее время существуют различные "индуцированные плюрипотентные стволовые клетки" и также можно использовать iPSC, разработанные Yamanaka, et al. путем введения 4 факторов: Oct3/4, Sox2, Klf4 с-Мус, в фибробласты мыши (Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676); iPSC, происходящие из клеток человека, разработанные путем введения сходных 4 факторов в фибробласты человека (Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.); Nanog-iPSC, разработанные посредством сортировки клеток с использованием экспрессии Nanog в качестве индикатора после введения 4 факторов (Okita, K., Ichisaka, T., и Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.); iPSC, полученные способом без использования с-Мус (Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106); iPSC, разработанные путем введения 6 факторов способом без использования вируса (Okita K et al. Nat. Methods 2011 May; 8(5): 409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31 (3) 458-66) и т.п. Также можно использовать индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, разработанные Thomson et al. посредством введения 4 факторов: OCT3/4, SOX2, NANOG и LIN28 (Yu J., Thomson JA. et al., Science (2007) 318: 1917-1920.); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Daley et al. (Park IH, Daley GQ. et al., Nature (2007) 451: 141-146); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Sakurada et al. (публикация нерассмотренной патентной заявки Японии № 2008-307007) и т.п.

Кроме того, можно использовать любые из известных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, известных в данной области, которые описаны во всех опубликованных статьях (например, Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol 3, Issue 5, 568-574; Kim JB., Scholer HR., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, DA., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No. 7, 795-797) или патентах (например, публикация нерассмотренной патентной заявки Японии № 2008-307007, публикация нерассмотренной патентной заявки Японии № 2008-283972, US2008-2336610, US2009-047263, WO2007-069666, WO2008-118220, WO2008-124133, WO2008-151058, WO2009-006930, WO2009-006997, WO2009-007852).

Доступные индуцированные плюрипотентные клеточные линии включают различные линии iPSC, разработанные NIH, Riken, Kyoto University, и т.п. Примеры таких линий iPSC человека включают линию HiPS-RIKEN-1A, линию HiPS-RIKEN-2A, линию HiPS-RIKEN-12A и линию Nips-B2 от Riken, и линию 253G1, линию 253G4, линии 1201C1, линию 1205D1, линию 1210B2, линию 1383D2, линию 1383D6, линию 201B7, линию 409B2, линию 454E2, линию 606A1, линию 610B1, линию 648A1, линию 1231A3 и линию FfI-01s04 от Kyoto University. Предпочтительной является линия 1231A3.

[0032]

Индукцию дифференцировки стволовых клеток в клетки нервного гребня можно проводить известным способом, описанным в литературе (например, непатентный документ 1). В случае использования, например, iPSC человека, iPSC инокулируют на чашку и т.п., подвергают культивированию с использованием прикрепляющейся культуры, а затем подвергают культивированию с использованием прикрепляющейся культуры в среде, содержащей ингибитор TGF $\beta$  и ингибитор GSK3 $\beta$ , и, тем самым, им можно позволять дифференцироваться в клетки нервного гребня.

[0033]

В этом отношении используемая среда конкретно не ограничена и является пригодной, например, среда TeSR1 и среда с определенным химическим составом (CDM). Кроме того, можно использовать среду BME, среду BGJb, среду CMRL 1066, среду Glasgow MEM, усовершенствованную среду MEM (IMEM), усовершенствованную среду MDM (IMDM), среду Medium 199, среду MEM Игла, среду  $\alpha$ MEM, среду DMEM (высокое содержание глюкозы или низкое содержание глюкозы), среду DMEM/F12, среду Хэма, среду RPMI 1640, среду Фишера и их смешанную среду и т.д.

[0034]

Среда CDM конкретно не ограничена и можно использовать, например, среду, полученную из модифицированной способом Искова среды Дульбекко (производимая GE Healthcare Japan Corp.). В качестве более конкретного примера используют среду CDM, описанную в непатентном документе 1. Среда CDM может содержать апотрансферрин, монотиоглицерин, бычий сывороточный альбумин (BSA), инсулин и/или антибиотик.

[0035]

Период культивирования перед добавлением ингибитора TGF $\beta$  и ингибитора GSK3 $\beta$  может представлять собой период, в ходе которого достигают представляющее интерес количество клеток. Этот период культивирования конкретно не ограничен и составляет, например, от 2 до 6 суток.

[0036]

Примеры ингибитора TGF $\beta$  включают SB431542 (4-(5-бензол[1,3]диоксол-5-ил-4-пиридин-2-ил-1H-имидазол-2-ил)бензамид, 4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]бензамид, 4-[4-(3,4-метилendioксифенил)-5-(2-пиридил)-1H-имидазол-2-ил]бензамид), A83-01 (3-(6-метилпиридин-2-ил)-1-фенилтиокарбамоил-4-хинолин-4-илпиразол), LDN193189 (4-[6-[4-(1-пиперазинил)фенил]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-ил]-хинолин), Wnt3a/BIO (представитель семейства Wnt 3A/(2'Z,3'E)-6-броминдирубин-3'-оксим), BMP4 (морфогенетический белок костей 4), GW788388 (4-[4-[3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]пиридин-2-ил]-N-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)бензамид), SM16 (4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(6-метил-2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]-бицикло[2.2.2]октан-1-карбоксамид), IN-1130 (3-[[5-(6-метил-2-пиридинил)-4-(6-хиноксалинил)-1H-имидазол-2-ил]метил]бензамид), GW6604 (2-фенил-4-[3-(пиридин-2-ил)-1H-пиразол-4-ил]пиридин) и SB505124 (2-(5-бензо[1,3]диоксол-5-ил-2-трет-бутил-3H-имидазол-4-ил)-6-метилпиридин). Можно использовать два или более из этих веществ в комбинации.



[0037]

Концентрацию ингибитора TGF $\beta$  для добавления на этой стадии соответствующим образом корректируют в зависимости от типа добавляемого ингибитора TGF $\beta$ , и она составляет, например, от 1 до 40 мкМ, предпочтительно от 5 до 20 мкМ.

В случае использования SB431542 (4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]бензамида), концентрация добавляемого ингибитора TGF $\beta$ , в частности, может составлять 10 мкМ.

[0038]

Примеры ингибитора GSK3 $\beta$  включают CHIR98014 (2-[[2-[(5-нитро-6-аминопиридин-2-ил)амино]этил]амино]-4-(2,4-дихлорфенил)-5-(1H-имидазол-1-ил)пиримидин), CHIR99021 (6-[[2-[[4-(2,4-дихлорфенил)-5-(4-метил-1H-имидазол-2-ил)-2-пиридинил]амино]этил]амино]никотинотрил), CP21R7 (3-(3-аминофенил)-4-(1-метил-1H-индол-3-ил)-пиррол-2,5-дион), LY2090314 (3-[9-фтор-1,2,3,4-тетрагидро-2-(1-пиперидинилкарбонил)пирроло[3.2.1-jk][1,4]бензодиазепин-7-ил]-4-имидазо[1,2-a]пиридин-3-ил-1h-пиррол-2,5-дион), TDZD-8 (4-бензил-2-метил-1,2,4-тиадиазолидин-3,5-дион), SB216763 (3-(2,4-дихлорфенил)-4-(1-метил-1H-индол-3-ил)-1H-пиррол-2,5-дион), TWS-119 (3-[6-(3-аминофенил)-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-4-илокси]фенол), кенпауллон, 1-азакенпауллон, SB415286 (3-[(3-хлор-4-гидроксифенил)амино]-4-(2-нитрофенил)-1H-пиррол-2,5-дион), AR-AO144-18 (1-[(4-метоксифенил)метил]-3-(5-нитро-1,3-тиазол-2-ил)мочевина), CT99021, CT20026, BIO ((2'Z,3'E)-6-броминдирубин-3'-оксим), BIO-ацетоксим, пиридокарбазол-рутений циклопентадиенильный комплекс, OTDZT, альфа-4-дибромацетофенон и литий. Можно использовать два или более из этих веществ в комбинации.

Ингибитор GSK3 $\beta$  не ограничивается этими веществами и также в качестве ингибитора GSK3 $\beta$  можно использовать антисмысловые олигонуклеотиды и миРНК против мРНК GSK3 $\beta$ , антитела, связывающиеся с GSK3 $\beta$ , доминантно-негативные мутанты GSK3 $\beta$  и т.п. Эти ингибиторы GSK3 $\beta$  являются коммерчески доступными или могут быть синтезированы известным способом.

[0039]

Концентрацию ингибитора GSK3 $\beta$ , добавляемого на этой стадии, соответствующим образом корректируют в зависимости от типа добавляемого ингибитора GSK3 $\beta$ , и она составляет, например, от 0,01 до 20 мкМ, предпочтительно от 0,1 до 10 мкМ.

В случае использования CHIR99021 концентрация добавляемого ингибитора GSK3 $\beta$  конкретно не ограничена и может составлять, например, от 0,1 до 1 мкМ, предпочтительно от 0,5 до 1 мкМ, в частности, 1 мкМ.

[0040]

Период культивирования после добавления ингибитора TGF $\beta$  и ингибитора GSK3 $\beta$  может представлять собой период, в ходе которого достигают представляющего интерес количества клеток. Этот период культивирования конкретно не ограничен и составляет,

например, от 6 до 14 суток, от 8 до 12 суток, от 9 до 11 суток или 10 суток.

[0041]

Для прикрепляющейся культуры используют контейнер для культивирования, например, чашку, флакон, микропланшет или лист для культивирования клеток, такой как OptiCell (наименование продукта) (Nunc). Контейнер для культивирования предпочтительно имеет покрытую поверхность для повышения адгезивности для клеток (гидрофильности), или покрыт субстратом для клеточной адгезии, таким как коллаген, желатин, поли-L-лизин, поли-D-лизин, ламинин, фибронектин, матригель (например, матригель BD (Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.)) или витронектин.

"Матригель" представляет собой растворимый препарат базальной мембраны, экстрагированный из саркомы мышей Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), обогащенный внеклеточным матриксным белком. Покрытый матригелем контейнер для культивирования является коммерчески доступным. Матригель состоит в основном из ламинина, коллагена IV, протеогликан гепарансульфата и энтактин/нидогена-1,2. Матригель содержит, в дополнение к этим основным компонентам, TGF $\beta$ , фактор роста эпителиальных клеток, инсулиноподобный фактор роста, фибробластный фактор роста, тканевые активаторы плазминогена 3,4 и другие факторы роста, естественным образом продуцируемые в опухолях EHS.

Температура культивирования конкретно не ограничена и составляет от 30 до 40°C (например, 37°C). Концентрация диоксида углерода в контейнере для культивирования составляет порядка, например, 5%.

[0042]

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для получения клеток нервного гребня для проведения стадии (2) можно приобретать коммерчески доступные клетки нервного гребня. Примеры коммерчески доступных клеток нервного гребня включают клетки наружного корневого влагалища волосяного фолликула человека (производимые Cosmo Bio Co., Ltd.) и клеточную линию черепного нервного гребня мыши O9-1 (производимую Merck Millipore).

[0043]

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для получения клеток нервного гребня для проведения стадии (2) можно собирать встречающиеся в природе клетки нервного гребня. Согласно сообщениям, клетки нервного гребня присутствуют в живых организмах млекопитающих, например, в эмбриональной нервной трубке человека, приблизительно через 30 суток после оплодотворения, в эмбриональной нервной трубке мыши приблизительно на 9-е сутки после оплодотворения, и во взрослой коже человека, свиньи и грызуна (Betters et al., *Developmental biology*, 2010, 344 (2): 578-592; Jiang et al., *Development*, 2000, 127 (8): 1607-1616; Dupin et al., *Developmental biology*, 2012, 366 (1): 83-95; и Nagoshi et al., *Cell Stem Cell* 2, April 2008, 392-403). Такие клетки нервного гребня можно собирать с использованием известного способа (например, Motohashi et al., *Biology open*, 2016, 5: 311-322; и Pfaltzgraff et al., *Journal of Visualized Experiments*, 2012, 64: 4134)

и подвергать стадии (2).

[0044]

[Стадия (2) культивирования с использованием экспансионной культуры клеток нервного гребня]

Стадия (2) культивирования с использованием экспансионной культуры клеток нервного гребня представляет собой стадию суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста (bFGF).

[0045]

В этом отношении используемая среда конкретно не ограничена, и, например, пригодной является среда CDM. Кроме того, можно использовать среду TeSR1, среду BME, среду BGJb, среду CMRL 1066, среду Glasgow MEM, усовершенствованную среду MEM (IMEM), усовершенствованную среду MDM (IMDM), среду Medium 199, среду MEM Игла, среду  $\alpha$ MEM, среду DMEM (с высоким содержанием глюкозы или низким содержанием глюкозы), среду DMEM/F12, среду Хэма, среду RPMI 1640, среду Фишера и их смешанную среду, и т.д.

[0046]

Ингибитор GSK3 $\beta$ , упоминаемый выше, можно использовать без конкретных ограничений.

Ингибитор GSK3 $\beta$  предпочтительно является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, кенпауллона, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 и SB415286. Предпочтительно ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CHIR99021 или CP21R7.

[0047]

Концентрация ингибитора GSK3 $\beta$ , добавляемого на этой стадии, представляет собой концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ (или в концентрации выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ). В качестве ингибитора GSK3 $\beta$  может использоваться CHIR99021 сам по себе. В случае использования самого CHIR99021 в качестве ингибитора GSK3 $\beta$ , как упоминается далее, подходящая концентрация добавляемого ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию выше 1 мкМ, предпочтительно 2 мкМ или выше и ниже 5 мкМ, более предпочтительно выше 2 мкМ и 4,5 мкМ или ниже, в частности, предпочтительно 3 мкМ или выше и 4,5 мкМ или ниже. Таким образом, в случае использования ингибитора GSK3 $\beta$ , отличного от CHIR99021, на этой стадии концентрация добавляемого ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ, предпочтительно концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации 2 мкМ или выше и ниже 5 мкМ, более предпочтительно концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует

CHIR99021 в концентрации выше 2 мкМ и 4,5 мкМ или ниже CHIR99021, особенно предпочтительно концентрацию, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации 3 мкМ или выше и 4,5 мкМ или ниже.

Клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность, можно культивировать и можно позволять им пролиферировать в ходе периода культивирования в течение более 9 недель (63 суток) посредством суспензионной культуры клеток нервного гребня в присутствии ингибитора GSK3 $\beta$ , имеющего соответствующую концентрацию, и bFGF. Клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность, можно культивировать и можно позволять им пролиферировать в ходе периода культивирования в течение более 9 недель (63 суток) посредством суспензионной культуры клеток нервного гребня в присутствии ингибитора GSK3 $\beta$ , имеющего соответствующую концентрацию, и bFGF.

[0048]

В одном варианте осуществления настоящего изобретения "клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность", обладают способностью к дифференцировке в нервные клетки, глиальные клетки и мезенхимные стромальные клетки, или способность к дифференцировке в эти клетки, а также в клетки костей, хондроциты, клетки роговицы и пигментные клетки.

[0049]

"Клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность," можно оценивать множеством способов. Примеры способов включают, но конкретно не ограничиваются ими, способ индукции дифференцировки клеток нервного гребня, подлежащих оценке, в каждую линию, такие как нервные клетки, глиальные клетки и мезенхимальные стромальные клетки. При условии, что клетки нервного гребня в действительности могут дифференцироваться в нервные клетки, глиальные клетки и мезенхимные стромальные клетки и т.д., клетки нервного гребня, подверженные оценке, могут быть определены как "клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность". Другой пример способа включает способ определения экспрессии маркерного белка или гена. При условии, что фактор транскрипции SOX10 экспрессируется в клетках нервного гребня, подверженных оценке, клетки нервного гребня, подверженные оценке, могут быть определены как "клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность". Детекцию SOX10 можно проводить с использованием иммунологического анализа, например ELISA, иммунного окрашивания или проточной цитометрии, с использованием антитела, специфичного к маркерному белку. Детекцию маркерного гена можно проводить с использованием способа амплификации и/или детекции нуклеиновых кислот, известного в данной области, например, ОТ-ПЦР, микрочипов или биочипов. Когда клетки имеют вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей репортерный белок (например, Nano-Lantern (Saito K. et al., "Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging". Nat. Commun., 2012; 3: 1262)) ниже гена SOX10, маркерного гена NCC, и

экспрессируют слитый белок SOX10 и репортерный белок под контролем промотора SOX10, можно использовать способ детекции репортерного белка (например, определения интенсивности флуоресценции).

[0050]

Эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в "концентрации выше 1 мкМ" (или "в концентрации выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ"), в качестве ингибитора GSK3 $\beta$ , можно оценивать, исходя из активности ингибирования GSK3 $\beta$ . Активность ингибитора GSK3 $\beta$  в отношении ингибирования GSK3 $\beta$  можно определять с использованием способа, по существу известного, и можно измерять, например, способом, описанным в Patsch et al., *Nature cell biology*, 2015, 17 (8): 994-1003, или Uno et al., *Brain Res.*, 2009, 1296: 148-163. В частности, активность ингибирования GSK3 $\beta$  можно определять с использованием функции регуляции экспрессии генов (в частности, функции фосфорилирования  $\beta$ -катенина) GSK3 $\beta$  в каскаде Wnt/ $\beta$ -катенин в качестве показателя. Более конкретно, такой подход вовлекает: (i) культивирование клеток, в которых экспрессия репортерного гена подавляется под контролем GSK3 $\beta$ , в присутствии и в отсутствии ингибитора GSK3 $\beta$ ; (ii) определение уровня экспрессии репортерного гена в присутствии и в отсутствии ингибитора GSK3 $\beta$ ; и (iii) определение активности ингибитора GSK3 $\beta$  в отношении ингибирования GSK3 $\beta$ , исходя из величины увеличения уровня экспрессии репортерного гена в присутствии ингибитора GSK3 $\beta$  относительно уровня экспрессии репортерного гена в отсутствии ингибитора GSK3 $\beta$  (см. пример 9).

Когда ингибитор GSK3 $\beta$  демонстрирует активность ингибирования GSK3 $\beta$  (% ингибирование), эквивалентную активности, которую демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ, в результатах измерения, определяют, что ингибитор GSK3 $\beta$  демонстрирует "эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 (активность ингибирования GSK3 $\beta$ , эквивалентная эффекту, который демонстрирует CHIR99021) в концентрации выше 1 мкМ". В этом контексте "эквивалентная" величина (% ингибирование) относится к величине, которая может отличаться вплоть до плюс или минус 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от эталонной величины. Предпочтительно, величина относится к диапазону от минус до плюс 15%, 10%, 5% или 1% от эталонной величины.

[0051]

Эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в "концентрации выше 1 мкМ" (или "в концентрации выше 1 мкМ и ниже 5 мкМ"), в качестве ингибитора GSK3 $\beta$ , в более подходящем случае можно оценивать, исходя из периода, в течение которого "клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность" поддаются культивированию, когда клетки нервного гребня культивируют способом, описанным в примерах настоящего описания. Когда "клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность," поддаются культивированию с увеличением их количества относительно начала культивирования путем

культивирования клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$ , в течение периода времени, эквивалентного периоду времени культивирования клеток нервного гребня в среде, содержащей CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ, определяют, что ингибитор GSK3 $\beta$  демонстрирует "эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 (активность пролиферации клеток нервного гребня, эквивалентная эффекту, который демонстрирует CHIR99021) в концентрации выше 1 мкМ". В этом контексте "эквивалентная" величина (период) относится к величине, которая может отличаться вплоть до плюс или минус 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от эталонной величины. Предпочтительно, величина относится к диапазону от минус до плюс 15%, 10%, 5% или 1% от эталонной величины.

[0052]

В случае применения самого CHIR99021 в качестве ингибитора GSK3 $\beta$  концентрация добавляемого ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию выше 1 мкМ, предпочтительно 2 мкМ или выше или ниже 5 мкМ, более предпочтительно выше 2 мкМ и 4,5 мкМ или ниже, особенно предпочтительно 3 мкМ или выше и 4,5 мкМ или ниже. Было обнаружено, что эффект обеспечения возможности пролиферации клеток нервного гребня при сохранении способности к дифференцировке в течение длительного периода времени является высоким для 2 мкМ или выше и ниже 5 мкМ CHIR99021, и наиболее высоким он является для 3 мкМ или выше и 4,5 мкМ или ниже CHIR99021. В частности, CHIR99021 в концентрации от 3 до 4,5 мкМ позволял культивирование и пролиферацию клеток нервного гребня, которые сохраняли мультипотентность в течение 112 суток (16 недель) или более. Также CHIR99021 в концентрации 2 мкМ сохранял мультипотентность на протяжении 9 недель (63 суток) или более. С другой стороны, 1 мкМ или 5 мкМ CHIR99021 уменьшал количество клеток, которые сохраняли мультипотентность после культивирования в течение 3 недель (21 сутки) и 6 недель (42 суток), соответственно.

В случае использования CP21R7 в качестве ингибитора GSK3 $\beta$  концентрация добавляемого ингибитора GSK3 $\beta$  представляет собой концентрацию выше 0,1 мкМ, предпочтительно 0,5 мкМ или выше, более предпочтительно 1 мкМ или выше. Было обнаружено, что эффект обеспечения возможности пролиферации клеток нервного гребня при сохранении способности к дифференцировке в течение длительного периода времени является высоким для 0,5 мкМ или выше и 1 мкМ или ниже CP21R7. В частности, CP21R7 в концентрации от 0,5 до 1 мкМ позволял культивирование и пролиферацию клеток нервного гребня, которые сохраняли мультипотентность на протяжении 84 суток (12 недель) или более. С другой стороны, 0,1 мкМ CP21R7 снижал количество клеток, которые сохраняли мультипотентность после культивирования в течение 3 недель (21 суток).

[0053]

Концентрация добавляемого bFGF конкретно не ограничена и составляет, например, от 10 до 200 нг/мл, предпочтительно от 20 до 40 нг/мл.

[0054]

Среду можно дополнять ингибитором TGF $\beta$  и/или эпидермальным фактором роста (EGF), в дополнение к ингибитору GSK3 $\beta$  и bFGF. Ингибитор TGF $\beta$ , упомянутый выше, можно использовать без конкретных ограничений.

Ингибитор TGF $\beta$  предпочтительно является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3A/БИО, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 и SB505124. Особенно предпочтительно, ингибитор TGF $\beta$  представляет собой SB431542.

Концентрацию добавляемого ингибитора TGF $\beta$  надлежащим образом корректируют в зависимости от типа добавляемого ингибитора TGF $\beta$ , и она составляет, например, от 1 до 50 мкМ, предпочтительно от 5 до 20 мкМ.

В случае использования SB431542 добавляемая концентрация ингибитора TGF $\beta$  конкретно не ограничена и может составлять, например, от 1 до 40 мкМ, предпочтительно от 5 до 20 мкМ, в частности, 10 мкМ.

Концентрация добавляемого EGF конкретно не ограничена и составляет, например, от 5 до 100 нг/мл, предпочтительно от 20 до 40 нг/мл.

[0055]

В суспензионной культуре клетки нервного гребня, полученные на стадии (1), открепляют от контейнера для культивирования, а затем диспергируют в среде и формируют агрегированную клеточную массу, в то время как компоненты среды и внутреннюю концентрацию кислорода в среде униформируют посредством перемешивания или встряхивания. Подходящую скорость перемешивания соответствующим образом выбирают в зависимости от плотности клеток и размера контейнера для культивирования. Чрезмерное перемешивание или встряхивание обеспечивает физический стресс для клеток и ингибирует образования агрегированной клеточной массы. Таким образом, скорость перемешивания или встряхивания контролируют для обеспечения возможности униформизации компонентов среды и внутренней концентрации кислорода в среде, и чтобы не ингибировать образование агрегированной клеточной массы. Культивирование в суспензии можно проводить, просто оставляя культуру стоять без перемешивания или встряхивания.

Температура культивирования конкретно не ограничена и составляет от 30 до 40°C (например, 37°C). Концентрация диоксида углерода в контейнере для культивирования составляет порядка, например, 5%.

[0056]

Период культивирования на этой стадии может представлять собой период, в ходе которого достигают представляющего интерес количества клеток. Эта стадия позволяет культивирование и пролиферацию клеток нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность на протяжении длительного периода. Доля клеток нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность, в культивируемой клеточной популяции составляет по меньшей мере 20% или более, 30% или более, или 40% или более, и ее

можно поддерживать на уровне предпочтительно 50% или более, 60% или более, или 70% или более, более предпочтительно 80% или более, 90% или более, или 95% или более.

В ходе этого культивирования клетки надлежащим образом пассируют. Пассирование проводят каждые 5-8 суток после инокуляции, например. Предпочтительно, интервал между пассированиями представляет собой достаточный период для экспансии агрегированной клеточной массы, и этот период является более коротким, чем период, в ходе которого агрегированная клеточная масса препятствует достижению кислорода или питательных веществ клеток в агрегированной клеточной массе.

Период, в ходе которого эта стадия позволяет культивирование и пролиферацию клеток нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность, конкретно не ограничен и может составлять, например, 7 суток, 14 суток, 21 сутки, 28 суток, 35 суток, 42 суток, 49 суток, 56 суток, 63 суток, 70 суток, 77 суток, 84 суток, 91 сутки, 98 суток, 105 суток или 112 суток или более. Предпочтительно этот период составляет 35 суток или более, более предпочтительно 42 суток или более, еще более предпочтительно 63 суток или более, особенно предпочтительно 84 суток или более, наиболее предпочтительно 112 суток или более.

[0057]

[Среда]

Настоящее изобретение также относится к среде для применения в способе получения клеток нервного гребня и способе обеспечения пролиферации клеток нервного гребня, упомянутом выше, включающем клетки нервного гребня. Предпочтительная композиция среды является такой, как указано выше.

[0058]

[Исходная культура клеток]

Настоящее изобретение также относится к замороженной исходной культуре, содержащей клетки нервного гребня, полученные способом получения клеток нервного гребня и способом обеспечения пролиферации клеток нервного гребня, упомянутым выше. Клетки нервного гребня являются положительными в отношении экспрессии SOX10 и положительными в отношении экспрессии p75, антигенного маркера клеточной поверхности NCC.

[0059]

Замороженную исходную культуру можно получать путем отделения клеток нервного гребня, полученных способом получения клеток нервного гребня и способом обеспечения пролиферации клеток нервного гребня, от среды и суспендирования клеток нервного гребня в растворе для криоконсервации с целью замораживания. Отделение клеток нервного гребня от среды можно проводить с использованием клеточного сита или центрифугирования. Клетки, отделенные таким образом, при необходимости можно промывать. Замороженная исходная культура может содержать дополнительную клеточную популяцию в дополнение к клеткам нервного гребня и предпочтительно содержит очищенные клетки нервного гребня. Очистку клеток нервного гребня можно



проводить, например, путем отделения клеток нервного гребня от других клеточных популяций посредством сортировки клеток с использованием экспрессии маркеров, описанных выше, в качестве показателя. В качестве раствора для консервации клеток можно использовать общепринятый реагент для применения для криоконсервации клеток. Например, являются коммерчески доступными Cryostem Freezing Medium и CELLBANKER(R).

[0060]

Замороженную исходную культуру можно использовать в качестве исходного материала для индукции дифференцировки клеток нервного гребня для получения нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток костей, хондроцитов, клеток роговицы и пигментных клеток. Также замороженную исходную культуру можно использовать для получения тканевых моделей, имеющих клетки нервного гребня в качестве компонента.

[0061]

[Способ получения различных клеток из клеток нервного гребня]

Способ получения нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток кости, хондроцитов, клеток роговицы или пигментных клеток в соответствии с настоящим изобретением включает стадии, приведенные ниже. Из этих стадий стадия (i) является такой же, как стадия (2) способа получения клеток нервного гребня в соответствии с настоящим изобретением или как способ обеспечения пролиферации клеток нервного гребня в соответствии с настоящим изобретением.

(i) Суспензионная культура клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста (bFGF), где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ; и

(ii) обеспечение возможности клеткам нервного гребня, полученным на стадии (i), дифференцироваться в клетки по меньшей мере одного ростка, выбранного из группы, состоящей из нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток кости, хондроцитов, клеток роговицы и пигментных клеток.

[0062]

[Стадия индукции в различные клетки]

В соответствии со способом получения клеток нервного гребня и способом обеспечения пролиферации клеток нервного гребня в соответствии с настоящим изобретением, можно получать клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность для дифференцировки в нервные клетки, глиальные клетки и мезенхимные стромальные клетки, или мультипотентность для дифференцировки в эти клетки, а также в клетки костей, хондроциты, клетки роговицы и пигментные клетки.

Индукцию дифференцировки клеток нервного гребня в клетки каждого ростка, выбранных из нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток костей, хондроцитов, клеток роговицы и пигментных клеток можно проводить

известным способом, описанным в литературе (например, в непатентных документах 1-4).

[0063]

В частности, индукцию дифференцировки в нервные клетки можно проводить на основе способа, описанного в непатентном документе 1 или 4.

Например, клетки нервного гребня инокулируют на чашку, покрытую фибронектином, и среду заменяют на DMEM/F12, дополненную добавкой N-2 Supplement (17502-048, Gibco), BDNF (028-16451, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), GDNF (074-06264, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), NT-3 (141-06643, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и NGF (141-07601, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), а затем проводят культивирование при 37°C в течение 14 суток в 5% CO<sub>2</sub>.

Альтернативно клетки нервного гребня инокулируют на чашку и культивируют в течение 1 суток в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB431542 и 1 мкМ CHIR99021, а затем среду заменяют нейробазальной средой (21103-049, Gibco), дополненной добавкой B-27 Supplement (17504-044, Gibco), N-2 Supplement, L-глутамином (073-05391, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), пенициллином/стрептомицином (15140-122, Gibco), BDNF, GDNF, NT-3 и NGF, а затем проводят культивирование при 37°C в течение 35 суток в 5% CO<sub>2</sub>.

Клетки, культивированные таким образом, фиксируют в 4% параформальдегиде, и дифференцировку в нервные клетки, экспрессирующие белок TUBB3 подтверждают способом иммуногистохимического окрашивания.

[0064]

Индукцию дифференцировки в глиальные клетки можно проводить с использованием подхода, сходного с индукцией начала дифференцировки в нервные клетки способом, описанным в непатентном документе 1 или 4. После завершения периода индукции дифференцировки начало дифференцировки в глиальные клетки подтверждают на основе экспрессии белка GFAP.

[0065]

Индукцию дифференцировки в мезенхимные стромальные клетки можно проводить на основе способа, описанного в непатентном документе 1. В частности, например, клетки нервного гребня инокулируют с плотностью  $6,5 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> на чашку и культивируют в течение 1 суток в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB431542 и 1 мкМ CHIR99021. Через одни сутки среду заменяют на  $\alpha$ MEM (Nacalai Tesque, Inc.), содержащую 10% эмбриональную телячью сыворотку (FBS, Nichirei Corp.). Приблизительно через 4 суток наблюдают морфологическое изменение в клетках. Клетки пассируют путем открепления клеток с использованием 0,25% трипсина-EDTA (Gibco) и инокуляции с плотностью  $1,0 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>. Через 14 суток после начала индукции дифференцировки проводят анализ экспрессии поверхностных антигенных маркеров CD73, CD44, CD45 и CD105 мезенхимных стромальных клеток человека посредством FACS для подтверждения дифференцировки в мезенхимные стромальные клетки.

[0066]

Индукцию дифференцировки в клетки костей можно проводить на основе способа, описанного в непатентном документе 1. В частности, например, мезенхимные стромальные клетки, описанные выше, инокулируют в количестве  $2,5 \times 10^5$  клеток на чашку, покрытую фибронектином, и культивируют в течение 2 недель в  $\alpha$ MEM, содержащей 10% FBS, 0,1 мкМ дексаметазон, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10 мМ  $\beta$ -глицерофосфат. Среду заменяют один раз двое суток только в течение первой 1 недели. Кальцифицированный узелок выявляют посредством окрашивания ализариновым красным для подтверждения дифференцировки в клетки костей.

[0067]

Индукцию дифференцировки в хондроциты можно проводить на основе способа, описанного в непатентном документе 1. В частности, например, мезенхимные стромальные клетки, описанные выше, суспендируют в концентрации  $1,5 \times 10^5$  клеток/5 мкл в DMEM:F12 (Invitrogen Corp.), содержащей 1% (об./об.) предварительную смесь ITS+ (BD), 0,17 мМ AA2P, 0,35 мМ пролин (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,1 мМ дексаметазон (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,15% (об./об.) глюкозу (Sigma-Aldrich Co. LLC), 1 мМ Напируват (Invitrogen Corp.), 2 мМ GlutaMax, 0,05 мМ MTG, 40 нг/мл PDGF-BB и 1% (об./об.) FBS (Nishirei Corp.). 5 мкл суспензии клеток наносят точками на чашку, покрытую фибронектином и культивируют в течение 1 часа. Через один час к ним добавляют 1 мл среды для индукции дифференцировки, описанной выше. Через 3-5 суток после начала индукции дифференцировки к ним добавляют 10 нг/мл TGF $\beta$ 3 (R&D Systems, Inc.). На 10 сутки после начала индукции дифференцировки к ним добавляют 50 нг/мл BMP4. Клетки культивируют в течение 16 суток и начало дифференцировки в хондроциты подтверждают посредством окрашивания ализариновым синим.

[0068]

Индукцию дифференцировки в клетки роговицы можно проводить на основе способа, описанного в непатентном документе 1. В частности, например, клетки нервного гребня инокулируют на чашку, покрытую фибронектином, и культивируют в течение 1 суток в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB431542 и 1 мкМ CHIR99021. Через одни сутки среду заменяют кондиционированной средой, полученной посредством культивирования эндотелиальных клеток роговицы человека в среде CDM. Среду заменяют один раз в двое суток. На 12 сутки после начала индукции дифференцировки подтверждают экспрессию ZO-1, маркерной молекулы клеток роговицы, способом иммунного окрашивания, и экспрессию COL4A1 и COL8A1 подтверждают посредством кПЦР.

[0069]

Индукцию дифференцировки в пигментные клетки можно проводить на основе способа, описанного в непатентном документе 1. В частности, например, клетки нервного гребня инокулируют на чашку, покрытую фибронектином, и культивируют в течение 1 суток в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB и 1 мкМ CHIR. Через одни сутки среду заменяют средой CDM, содержащей 1 мкМ CHIR, 25 нг/мл BMP4 и 100 нМ эндотелин-3 (American Peptide Company). Среду заменяют один раз в двое суток. На 7 сутки после

начала индукции дифференцировки, дифференцировку в пигментные клетки подтверждают по экспрессии генов MITF и c-KIT.

[0070]

Все из полученных нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток кости, хондроцитов, клеток роговицы и пигментных клеток можно использовать для получения клеток для регенеративной медицины.

[0071]

Клетки нервного гребня представляют собой клетки, обладающие мультипотентностью для дифференцировки во многие типы клеток, такие как нервные клетки, глиальные клетки, мезенхимные стромальные клетки, клетки костей, хондроциты, клетки роговицы и пигментные клетки, и способностью к самопролиферации. Исходя из такой способности, обнаруженной для клеток нервного гребня, является возможным применение клеток нервного гребня в качестве клеточных средств для регенеративной медицины. Если бы клетки нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность, можно было эффективно поддерживать или позволять им пролиферировать, было бы возможным их крупномасштабное продуцирование. Если бы можно было получить исходную культуру клеток нервного гребня, которые сохраняют мультипотентность, исходная культура была бы пригодной в качестве исходного материала для клеточных средств. Например, применение клеток (например, клеток нервного гребня), находящихся на середине пути дифференцировке стволовых клеток в представляющие интерес клетки (например, нервные клетки) в качестве исходного материала было исследовано для цели, например, упрощения способов продуцирования, укорочения периодов продуцирования или снижения стоимости продуцирования при продуцировании клеточных средств. Настоящее изобретение считается способным обеспечить полезный способ для этой цели. Это может быть справедливо не только для получения клеточных средств, но и для конструирования скрининговых систем с использованием различных клеток и т.д.

Примеры

[0072]

[Пример 1: Культивирование с использованием экспансионной культуры клеток нервного гребня]

[Индукция дифференцировки iPSC в NCC]

Клеткам iPSC человека позволяли дифференцироваться в клетки нервного гребня (NCC) в соответствии со способом, описанным в непатентном документе 1. Использованные iPSC представляли собой iPSC человека SOX10-Nano-Lantern Reporter Human iPSC (линия 201B7), описанные в непатентном документе 4. Эта клеточная линия имеет вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей флуоресцентный белок Nano-Lantern (Saito K. et al., "Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging." Nat. Commun., 2012; 3: 1262) ниже гена SOX10, являющегося маркерным геном NCC, и экспрессирует слитый белок SOX10 и Nano-Lantern под контролем промотора SOX10.

[0073]

iPSC инокулировали на покрытую матригелем чашку, подвергали культивированию с использованием прикрепляющейся культуры в течение 4 суток в среде TeSR1, а затем подвергали культивированию с использованием прикрепляющейся культуры в течение 10 суток в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB431542 (ингибитор TGF $\beta$ ) и 1 мкМ CHIR99021 (ингибитор GSK3 $\beta$ ), и тем самым позволяли дифференцироваться в NCC.

[0074]

[Экспансионная культура NCC]

NCC открепляли от чашки и подвергали культивированию с использованием суспензионной культуры в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB431542, 3 мкМ CHIR99021, 40 нг/мл bFGF и 40 нг/мл EGF. Клетки пассировали каждые 7 суток.

[0075]

Изменение общего количества клеток после начала культивирования с использованием экспансионной культуры представлено на фиг.1, и изменение процента клеток, положительных по экспрессии SOX10, представлено на фиг.2. Для определения процента клеток, положительных по экспрессии SOX10, агрегированную клеточную массу подвергали диссоциации с использованием реагента StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (Invitrogen Corp.) для получения суспензий единичных клеток. Суспензии единичных клеток в буфере FACS (2% BSA HBSS), дополненном 1 мкг/мл PI (йодид пропидия, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) фильтровали через пробирку с нейлоновой сеткой с размером ячеек 35 мкм (BD Falcon), а затем анализировали с использованием проточного цитометра (FACS Aria, BD Biosciences) для определения доли GFP-положительных клеток в живых клетках (PI-негативные клетки). Общее количество клеток возрастало в течение всего периода и высокий процент клеток, положительных по экспрессии SOX10, подтверждался даже на 121 сутки культивирования. Экспрессированный SOX10 служит в качестве маркера NCC, обладающих мультипотентностью. Эти результаты указывают на то, что NCC пролиферируют при сохранении способности к дифференцировке на протяжении длительного периода культивирования.

[0076]

[Пример 2: Исследование концентрации добавки в среду]

Ингибитор GSK3 $\beta$ , bFGF и EGF исследовали в отношении влияния их концентраций на способность NCC к самопролиферации и их способность к дифференцировке в экспансионной культуре NCC. Далее проводили культивирование с использованием экспансионной культуры в тех же условиях, что и в примере 1, если нет иных указаний.

[0077]

На фиг.3 представлено изменение общего количества клеток, когда использовали концентрации bFGF и EGF 20 нг/мл (А) или 40 нг/мл (В) и использовали концентрацию

CHIR99021 1, 2, 3 или 5 мкМ. Уровень пролиферации клеток в течение 1 недели при использовании концентрации CHIR99021 1 мкМ или 2 мкМ был от 8 до 30-кратного (также см. пример 8, приведенный ниже). На фиг.4 представлено изменение общего количества клеток, когда использовали концентрации bFGF и EGF 40 нг/мл и использовали концентрацию CHIR99021 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мкМ. Концентрации bFGF, EGF и CHIR99021 не влияли на изменение общего количества клеток.

[0078]

На фиг.5 представлено изменение процента положительных по экспрессии SOX10 клеток, когда использовали концентрацию bFGF и EGF 20 нг/мл (А) или 40 нг/мл (В) и использовали концентрацию CHIR99021 1, 2, 3 или 5 мкМ. На фиг.6 представлено изменение процента положительных по экспрессии SOX10 клеток, когда использовали концентрации bFGF и EGF 40 нг/мл и использовали концентрацию CHIR99021 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мкМ. Когда концентрация CHIR99021 составляла 3-4,5 мкМ, было подтверждено 90% или более положительных по экспрессии SOX10 клеток в ходе длительного периода культивирования (на 121 сутки культивирования). Даже когда концентрация CHIR99021 составляла 2 мкМ, было подтверждено приблизительно 55% или более положительных по экспрессии SOX10 клеток в ходе относительно длительного периода культивирования (на 63 сутки культивирования). С другой стороны, когда концентрация CHIR99021 составляла 5 мкМ, приблизительно 55% или более положительных по экспрессии SOX10 клеток сохранялось в ходе культивирования в течение вплоть до 42 суток, в то время как процент положительных по экспрессии SOX10 клеток снижался до приблизительно 5% или менее на 63 сутки культивирования. Когда концентрация CHIR99021 составляла 1 мкМ наблюдали снижение процента положительных по экспрессии SOX10 клеток в течение короткого периода культивирования (на 21 сутки культивирования), процент положительных по экспрессии SOX10 клеток составлял приблизительно 25% или менее на 63 сутки культивирования. Концентрации bFGF и EGF1 не влияли на изменение процента положительных по экспрессии SOX10 клеток.

[0079]

[Пример 3: Исследование ингибитора GSK3β]

NCC подвергали культивированию с использованием экспансионной культуры аналогично тому, как в примере 1, за исключением того, что ингибитор GSK3β, использованный в экспансионной культуре NCC, заменяли с CHIR99021 на CP21R7. Использованная концентрация CP21R7 составляла 0,1, 0,5 или 1 мкМ.

[0080]

Изменение процента положительных по экспрессии SOX10 клеток представлено на фиг.7. При концентрации CP21R7 0,5 или 1 мкМ высокий процент положительных по экспрессии SOX10 клеток подтверждался даже на 84 сутки культивирования. С другой стороны, при концентрации CP21R7 0,1 мкМ процент положительных по экспрессии SOX10 клеток начинал снижаться в течение короткого периода времени (на 21 сутки культивирования).

[0081]

[Пример 4: Индукция дифференцировки клеток нервного гребня в нервные клетки]

Подтверждали способность к дифференцировке у NCC, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры согласно примеру 1, в нервные клетки.

Индукцию дифференцировки в нервные клетки проводили на основе способа, описанного в непатентном документе 4.

NCC, подвергнутые культивированию с использованием экспансионной культуры путем поддерживающего культивирования в течение 30 суток, инокулировали в количестве  $5 \times 10^5$  клеток на чашку и культивировали в течение 1 суток в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB431542 и 1 мкМ CHIR99021. Через одни сутки среду заменяли нейробазальной средой (21103-049, Gibco), дополненной добавкой B-27 Supplement (17504-044, Gibco), N-2 Supplement, L-глутамином (073-05391, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), пенициллином/стрептомицином (15140-122, Gibco), BDNF (028-16451, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), GDNF (074-06264, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), NT-3 (141-06643, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и NGF (141-07601, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), с последующим культивированием при 37°C в течение 35 суток с 5% CO<sub>2</sub>. В ходе этого периода культивирования среду заменяли каждые 3-4 суток.

[0082]

Клетки фиксировали добавлением 4% параформальдегида (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и инкубацией при 4°C в течение 1 часа. Клетки подвергали реакции с антителом против TUBB3 (845502, BioLegend, Inc.) и антителом против GFAP (ab7260, Abcam PLC) в качестве первичных антител, далее последовательно подвергали реакции с меченым 488 вторичным антителом (Invitrogen Corp.) и меченым Alexa 568 вторичным антителом в качестве вторичных антител, совместимых с видом животных, которых иммунизировали первичными антителами, а затем наблюдали под флуоресцентным микроскопом.

Начало дифференцировки в нервные клетки, экспрессирующие белок TUBB, и глиальные клетки, экспрессирующие белок GFAP, подтверждали для NCC, подвергаемых поддерживающему культивированию в течение 30 суток.

[0083]

Способность к дифференцировке в нервные клетки далее подтверждали аналогично тому, как описано выше, с использованием NCC, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры на основе поддерживающей культуры в течение 84 суток. В результате подтверждали дифференцировку в нервные клетки (периферин-положительные клетки) и глиальные клетки (GFAP-положительные клетки).

[0084]

[Пример 5: Индукция дифференцировки клеток нервного гребня в пигментные клетки]

Подтверждали способность к дифференцировке у NCC, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры согласно примеру 1, в нервные клетки.

Индукцию дифференцировки в меланоциты проводили на основе способа, описанного в непатентном документе 1.

NCC, подвергнутые культивированию с использованием экспансионной культуры посредством поддерживающей культуры в течение 84 суток, инокулировали в 6-ячеечный планшет, покрытый фибронектином, и культивировали в течение 1 суток в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB431542 и 1 мкМ CHIR99021. На следующие сутки среду заменяли средой CDM, дополненной BMP4 и эндотелином-3 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), с последующим культивированием при 37°C в течение 7 суток в 5% CO<sub>2</sub>. В ходе этого периода культивирования среду заменяли каждые 2 суток.

[0085]

Клетки фиксировали добавлением 4% параформальдегида (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и инкубацией при 4°C в течение 1 часа. Клетки подвергали реакции с антителом против MITF (Sigma-Aldrich Co. LLC) в качестве первичного антитела, а затем подвергали реакции с меченым 568 вторичным антителом (Invitrogen Corp.) в качестве вторичного антитела, совместимых с видом животных, которых иммунизировали первичными антителами, а затем наблюдали под флуоресцентным микроскопом. Подтверждали начало дифференцировки в меланоциты, экспрессирующие белок MITF, из NCC, подвергаемых поддерживающему культивированию в течение 84 суток.

[0086]

[Пример 6: Индукция дифференцировки клеток нервного гребня в мезенхимные стромальные клетки]

Подтверждали способность к дифференцировке у NCC, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры согласно примеру 1, в мезенхимные стромальные клетки.

Индукцию дифференцировки в мезенхимные стромальные клетки проводили на основе способа, описанного в непатентном документе 1.

NCC, подвергнутые культивированию с использованием экспансионной культуры на основе поддерживающей культуры в течение 84 суток, инокулировали на чашку для культивирования клеток диаметром 6 см, покрытую фибронектином, и культивировали в течение 1 суток в среде CDM, содержащей 10 мкМ SB431542 и 1 мкМ CHIR99021. На следующие сутки среду заменяли CTS StemPro MSC SFM (Gibco, A1033201). Клетки пассировали посредством диссоциации клеток посредством реагента StemPro Accutase Cell Dissociation Reagent (Invitrogen Corp.) и инокуляции с плотностью 1,0-2,0×10<sup>6</sup> клеток/чашка (для чашки размером 10 см).

[0087]

Через 14 суток после начала индукции дифференцировки в мезенхимные стромальные клетки, NCC подвергали иммунному окрашиванию антителом против CD73



(BD), антителом против CD44 (BD), антителом против CD45 (BD) и антителом против CD105 (eBioscience, Inc.), т.е. антителами против поверхностных антигенных маркеров мезенхимных стромальных клеток человека, а затем проводили FACS-анализ. Начало дифференцировки в мезенхимные стромальные клетки, экспрессирующие каждый из белков CD44, CD73 и CD105, и не экспрессирующие белок CD4, подтверждали для NCC, подвергнутых поддерживающему культивированию в течение 84 суток.

[0088]

[Пример 7: Индукция дифференцировки клеток нервного гребня в клетки костей, хондроциты или адипоциты]

Подтверждали способность к дифференцировке NCC, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры согласно примеру 1, в клетки костей, хондроциты или адипоциты.

Индукцию дифференцировки в клетки костей, хондроциты или адипоциты проводили на основе способа, описанного в непатентном документе 1.

Клеткам NCC, подвергнутым культивированию с использованием экспансионной культуры на основе поддерживающей культуры в течение 84 суток, позволяли дифференцироваться в мезенхимные стромальные клетки способом, описанным в примере 6. Мезенхимные стромальные клетки инокулировали в количестве  $4,0 \times 10^4$  клеток/лунка в 12-ячеечный планшет, покрытый фибронектином, и культивировали в течение 4 недель в  $\alpha$ MEM, содержащей 10% FBS, 0,1 мкМ дексаметазон, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты и 10 мМ  $\beta$ -глицерофосфат, для индукции дифференцировки в клетки костей. Среду заменяли один раз в двое-трое суток. Кальцифицированный узелок выявляли окрашиванием ализариновым красным для подтверждения дифференцировки в клетки костей.

[0089]

Индукцию дифференцировки в хондроциты проводили следующим образом: мезенхимные стромальные клетки, дифференцировку в которые индуцировали из NCC, подвергаемые культивированию с использованием экспансионной культуры посредством поддерживающей культуры в течение 84 суток, проводили путем суспендирования клеток в концентрации  $1,5 \times 10^5$  клеток/5 мкл в DMEM:F12 (Invitrogen Corp.), содержащей 1% (об./об.) ITS+ предварительная смесь (BD), 0,17 мМ AA2P, 0,35 мМ пролин (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,1 мМ дексаметазон (Sigma-Aldrich Co. LLC), 0,15% (об./об.) глюкозу (Sigma-Aldrich Co. LLC), 1 мМ Na-пируват (Invitrogen Corp.), 2 мМ GlutaMax, 0,05 мМ MTG, 40 нг/мл PDGF-BB и 1% (об./об.) FBS (Nichirei Corp.). Суспензию клеток наносили точками в количестве 5 мкл/лунка на 12-ячеечный планшет, покрытый фибронектином, и культивировали в течение 1 часа. Через один час среду далее дополняли 10 нг/мл TGF $\beta$ 3 (R&D Systems, Inc.), и к ней добавляли 100 нг/мл BMP7 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) в концентрации 1 мл/лунка. Клетки культивировали в течение 10 суток и подтверждали начало дифференцировки в хондроциты посредством окрашивания ализариновым синим.

[0090]

Индукцию дифференцировки в адипоциты проводили следующим образом: мезенхимные стромальные клетки, в которые индуцировали дифференцировку NCC, подвергнутых культивированию с использованием экспансионной культуры на основе поддерживающей культуры в течение 84 суток, проводили путем инокуляции в количестве  $4,0 \times 10^4$  клеток/лунка на 24-луночный планшет, покрытый фибронектином, и культивировали в течение 4 недель в среде прикрепленными к hMSC с использованием Human Mesenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium Bullet Kit (Lonza Japan Ltd.). Среду заменяли один раз в двое-трое суток. Проводили детекцию капель масла в клетках, окрашенных посредством окрашивания масляным красным O, для подтверждения дифференцировки в адипоциты.

[0091]

Окрашивание клеток кости с использованием ализаринового красного S проводили следующим образом: клетки фиксировали добавлением 100% этанола и инкубацией при комнатной температуре в течение 10 минут. Клетки подвергали реакции с раствором для окрашивания ализариновым красным (Merck Millipore), промывали водой, сушили, а затем наблюдали под микроскопом.

Окрашивание хондроцитов альциановым синим проводили следующим образом: клетки, фиксированные добавлением 4% параформальдегида (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) и инкубацией при комнатной температуре в течение 30 минут, подвергали реакции с 1% раствором для окрашивания альциановым синим (Muto Pure Chemicals Co., Ltd.), промывали водой и сушили.

Окрашивание адипоцитов масляным красным O проводили следующим образом: клетки фиксировали в 10% формалине при комнатной температуре в течение 1 часа, подвергали реакции со смесью 3:2 0,5% раствора масляного красного O с изопропанолом, и водой при комнатной температуре в течение 1 часа и промывали водой. Масляные капли наблюдали под микроскопом.

[0092]

[Пример 8: Исследование концентрации добавки в среду - 2]

bFGF исследовали в отношении влияния его концентрации на способность NCC к самопролиферации и их способность к дифференцировке в экспансионной культуре NCC. Далее проводили культивирование с использованием экспансионной культуры в тех же условиях, что и в примере 1, если нет иных указаний.

[0093]

На фиг.8 представлено изменение общего количества клеток, когда использовали концентрацию CHIR99021 1,5 мкМ и концентрацию bFGF 10, 12,5, 15,0 или 17,5 нг/мл. На фиг.9 представлено изменение процента положительных по экспрессии SOX10 клеток. Концентрация bFGF не имела влияния на процент положительности по экспрессии SOX10.

[0094]

Характер изменения общего количества клеток был по существу одинаковым в пределах диапазона концентраций bFGF, описанного выше, и уровень пролиферации клеток находился в диапазоне от 6 до 13-кратного в течение 1 недели. Уровень пролиферации клеток в течение 1 недели в примере 2 находился в более высоком диапазоне от 8- до 30-кратного при концентрации CHIR99021 1 мкМ или 2 мкМ и концентрации bFGF 20 нг/мл или 40 нг/мл (см. фиг.3), что указывает на то, что bFGF вносит вклад в способность NCC к самопролиферации и имеет подходящий диапазон концентраций от 20 до 40 нг/мл.

[0095]

[Пример 9: Измерение активности ингибирования GSK3 $\beta$ ]

Получали экспериментальную систему для оценки активности ингибитора GSK3 $\beta$  в отношении ингибирования GSK3 $\beta$ .

[0096]

В каскаде Wnt/ $\beta$ -катенин, GSK3 $\beta$  функционирует, фосфорилируя  $\beta$ -катенин в отсутствие Wnt-лиганда. Фосфорилированный  $\beta$ -катенин убиквитинилируется и деградируется в протеасоме. Таким образом, экспрессия гена ниже каскада Wnt- $\beta$ -катенин подавляется. Если GSK3 $\beta$  в этом каскаде ингибируется,  $\beta$ -катенин перемещается в ядро без деградации, индуцируя экспрессию гена ниже каскада Wnt- $\beta$ -катенин вместе с другими факторами транскрипции, такими как Т-клеточный фактор (TCF)/лимфоидный энхансерный фактор (LEF). Клеточная линия CellSensor LEF/TCF-bla HCT-116 Cell Line (Thermo Fisher Scientific Inc., K1676) стабильно включает LEF/TCF и включает репортерный ген (репортерный ген бета-лактамазы) для экспрессии репортерного гена под контролем LEF/TCF. Экспрессия репортерного гена в этой клеточной линии в отсутствие Wnt-лиганда служит в качестве показателя ингибирования функции (функция фосфорилирования  $\beta$ -катенина) GSK3 $\beta$ . Активность ингибитора GSK3 $\beta$  в отношении ингибирования GSK3 $\beta$  определяли посредством анализа с использованием этой клеточной линии.

[0097]

Анализ проводили в соответствии с протоколом Invitrogen Corp. (CellSensor(R) LEF/TCF-bla HCT 116 Cell-based Assay Protocol).

В частности, клетки LEF/TCF-bla HCT-116 Cells суспендировали в среде для анализа (OPTI-MEM, 0,5% подвергнутая диализу FBS, 0,1 мМ NEAA, 1 мМ пируват натрия, 100 Е/мл/100 мкг/мл Pen/Strep) (312500 клеток/мл). Суспензию клеток инокулировали в каждую лунку планшета для анализа (10000 клеток/лунка) и культивировали в течение от 16 до 24 часов.

Ингибитор GSK3 $\beta$  (в данном случае использовали CHIR99021) добавляли в каждую лунку (концентрация: 0,316, 1,00, 3,16, 10,0, 31,6, 100, 316, 1000, 3160 и 10000 нМ) и клетки культивировали в течение 5 часов.

В каждую лунку добавляли раствор субстрата бета-лактамазы (LiveBLAzer-FRET B/G (CCF4-AM) Substrate Mixture) (8 мкл/лунка) и инкубировали в течение 2 часов.

Величину флуоресценции определяли с использованием устройства для считывания планшетов. Измерение проводили в двух лунках на каждую концентрацию.

[0098]

Результаты представлены в "таблице 1". Активность ингибирования GSK3 $\beta$ , которую демонстрировал 1 мкМ CHIR99021, составляла 113,5 (среднее значение для двух лунок) в значениях величины флуоресценции.

Концентрацию, которая демонстрирует активность ингибирования GSK3 $\beta$ , эквивалентную активности ингибирования, которую демонстрирует 1 мкМ CHIR99021 (величина флуоресценции: 113,5) также можно определять для ингибиторов GSK3 $\beta$ , отличных от CHIR99021, путем измерения величин флуоресценции в условиях каждой концентрации с использованием этой экспериментальной системы и построения калибровочных кривых в соответствии со стандартным способом.

[0099]

[Таблица 1]

Соединение концентрация (нМ)	Величина флуоресценции	
	Лунка 1	Лунка 2
10000	88	73
3160	99	136
1000	114	113
316	101	96
100	75	60
31,6	21	45
10,0	12	23
3,16	0	14
1,00	0	0
0,316	6	0

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения клеток нервного гребня, включающий стадии:
  - (1) получения клеток нервного гребня; и
  - (2) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста, где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.
2. Способ получения по п.1, где среда дополнительно содержит ингибитор TGF $\beta$ .
3. Способ получения по п.1, где среда представляет собой среду CDM.
4. Способ получения по п.1, где среда дополнительно содержит эпидермальный фактор роста.
5. Способ получения по п.1, где ингибитор GSK3 $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из CHIR99021, CP21R7, CHIR98014, LY2090314, кенпауллона, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 и SB415286.
6. Способ получения по п.5, где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CHIR99021.
7. Способ получения по п.2, где ингибитор TGF $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 и SB505124.
8. Способ получения по п.1, где на стадии (2) клетки нервного гребня пассируют каждые 5-8 суток после инокуляции.
9. Способ получения по п.1, где стадия (1) представляет собой стадию индукции дифференцировки стволовых клеток в клетки нервного гребня.
10. Способ обеспечения пролиферации клеток нервного гребня, включающий стадию:
  - (I) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста, где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.
11. Среда, содержащая ингибитор GSK3 $\beta$ , основной фибробластный фактор роста и клетки нервного гребня, где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.
12. Среда по п.11, дополнительно содержащая ингибитор TGF $\beta$ .
13. Среда по п.11, где среда представляет собой среду CDM.
14. Среда по п.11, дополнительно содержащая эпидермальный фактор роста.
15. Среда по п.11, где ингибитор GSK3 $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из CHIR99021, CP21R7, CHIR98014,

LY2090314, кенпауллона, AR-AO144-18, TDZD-8, SB216763, BIO, TWS-119 и SB415286.

16. Среда по п.15, где ингибитор GSK3 $\beta$  представляет собой CHIR99021.

17. Среда по п.12, где ингибитор TGF $\beta$  является по меньшей мере одним представителем, выбранным из группы, состоящей из SB431542, A83-01, LDN193189, Wnt3a/BIO, BMP4, GW788388, SM16, IN-1130, GW6604 и SB505124.

18. Замороженная исходная культура, содержащая клетки нервного гребня, полученные способом получения по п.1.

19. Способ получения нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток костей, хондроцитов, клеток роговицы или пигментных клеток, включающий стадии:

(i) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста, где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ; и

(ii) дифференцировки клеток нервного гребня, полученных на стадии (i), в клетки по меньшей мере одного роста, выбранного из группы, состоящей из нервных клеток, глиальных клеток, мезенхимных стромальных клеток, клеток костей, хондроцитов, клеток роговицы и пигментных клеток.

20. Способ культивирования клеток нервного гребня, обладающих мультипотентностью, в течение длительного периода времени, включающий стадии:

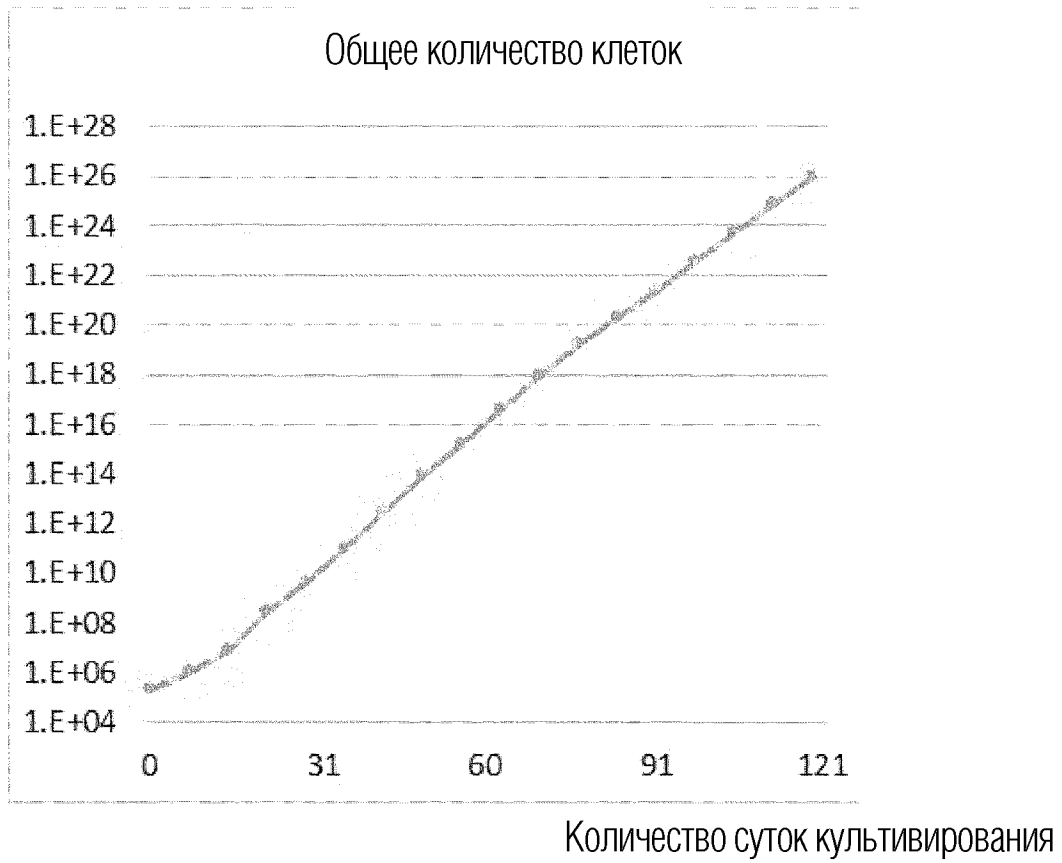
(1) получения клеток нервного гребня; и

(2) культивирования с использованием суспензионной культуры клеток нервного гребня в среде, содержащей ингибитор GSK3 $\beta$  и основной фибробластный фактор роста, где среда содержит ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ.

21. Применение среды, содержащей основной фибробластный фактор роста и ингибитор GSK3 $\beta$  в концентрации, которая демонстрирует эффект, эквивалентный эффекту, который демонстрирует CHIR99021 в концентрации выше 1 мкМ, для культивирования клеток нервного гребня, обладающих мультипотентностью, в течение длительного периода времени.

По доверенности

ФИГ. 1

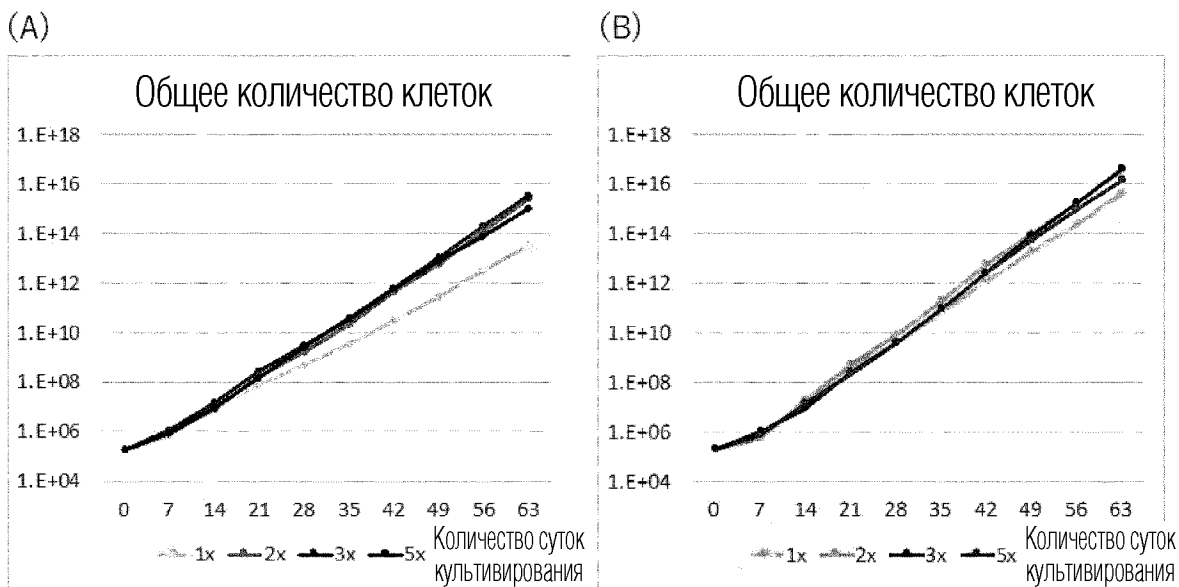


ФИГ. 2

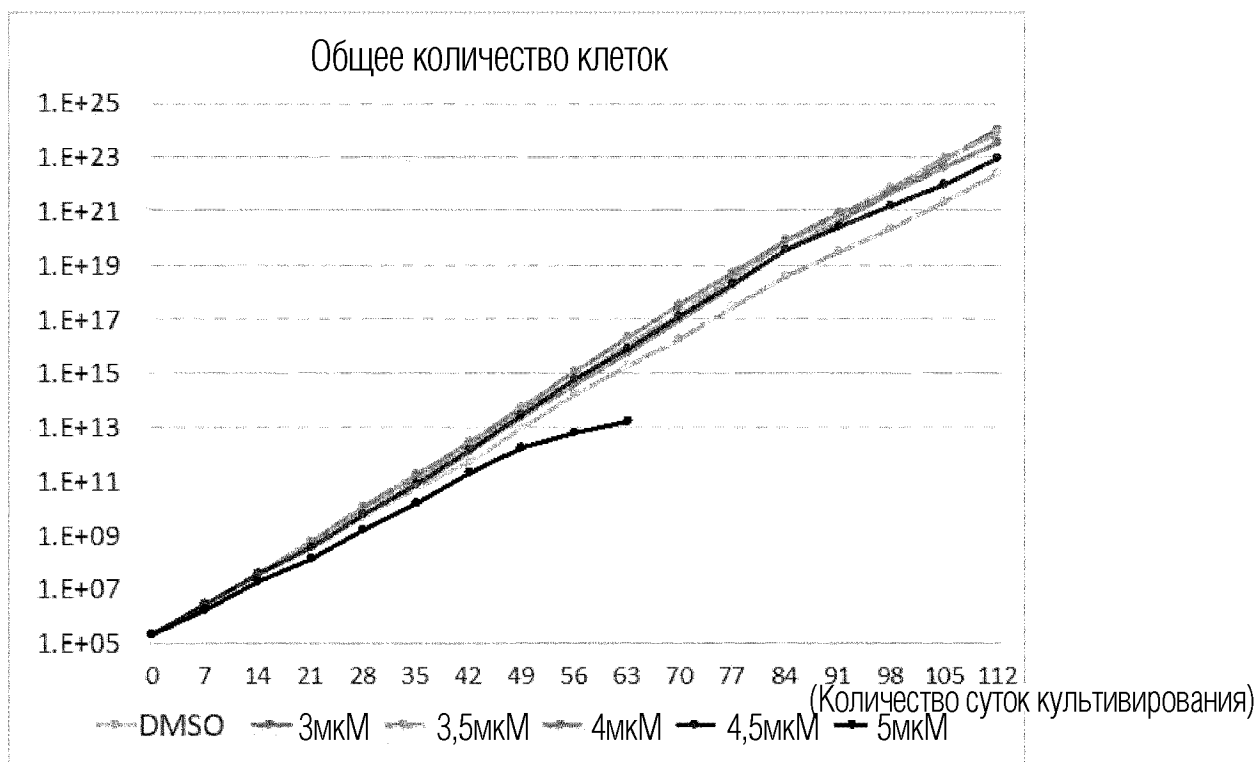




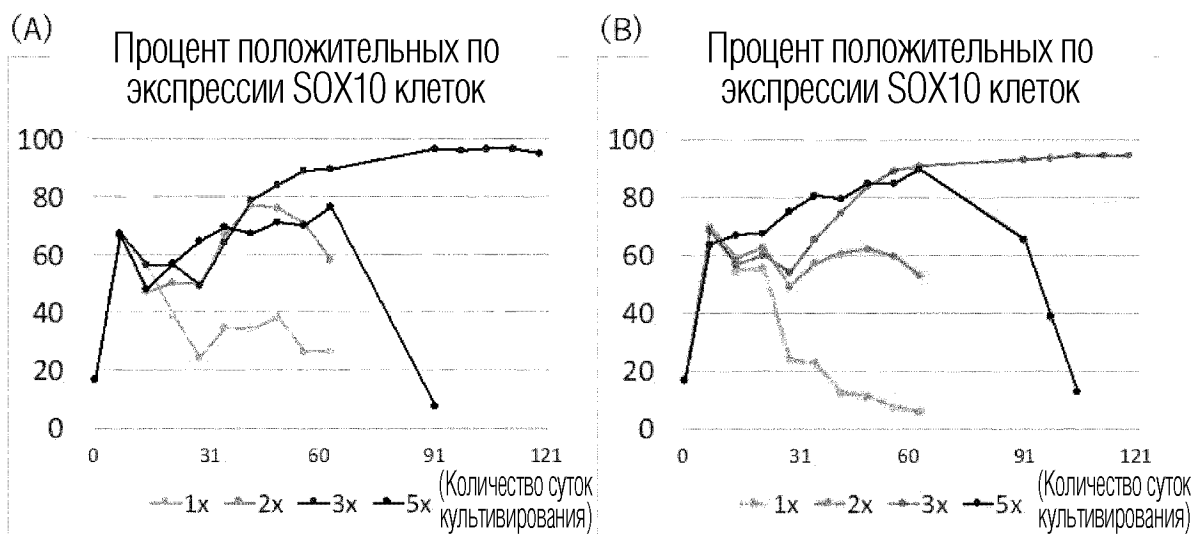
ФИГ. 3



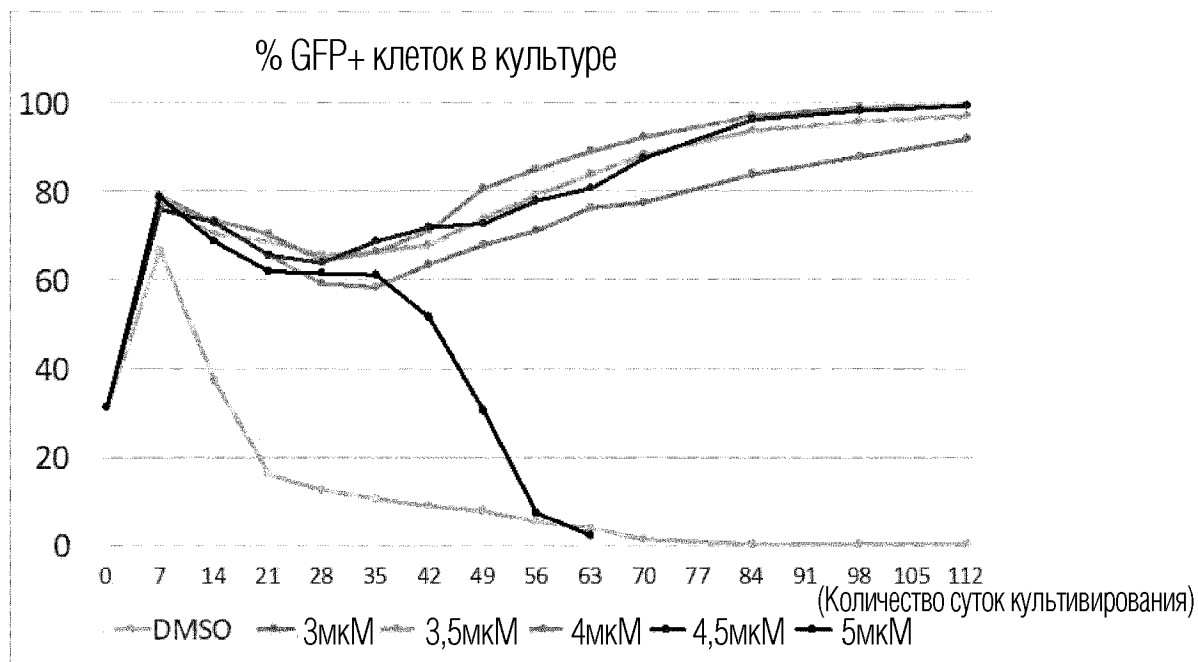
ФИГ. 4



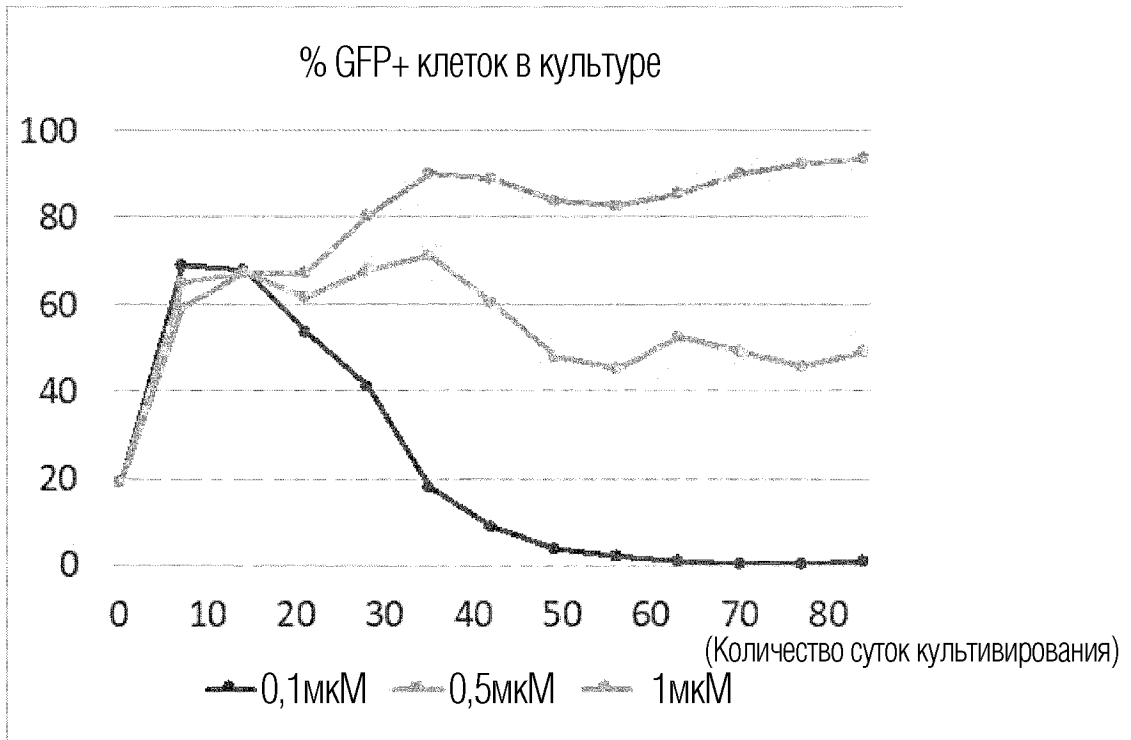
ФИГ. 5



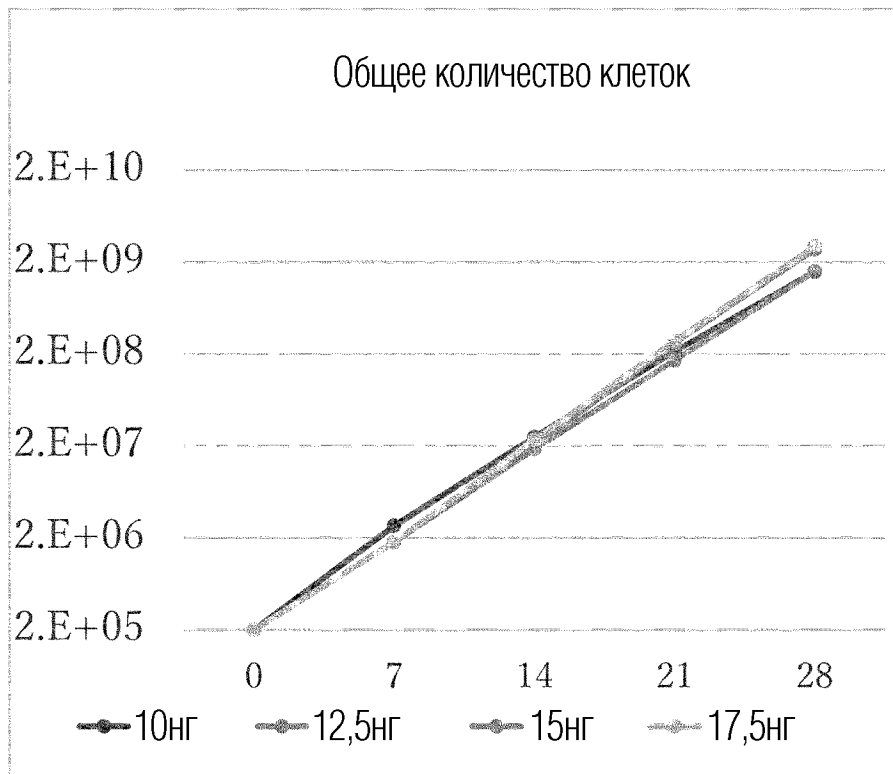
ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9

