

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190582** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.05.27

(51) Int. Cl. *C12N 5/0797* (2010.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.21

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭНТЕРАЛЬНЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ**

(31) **2018-155395**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.08.22**

**Икея Макото, Камия Яей, Камия
Даисукэ, Ямасита Теруйоси, Таке
Кадзуми (JP)**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2019/032543**

(87) **WO 2020/040166 2020.02.27**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

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

(57) Способ получения энтеральных нервных клеток-предшественников, включающий стадии (1) обеспечения энтеральных нервных клеток-предшественников; и (2) культивирования энтеральных нервных клеток-предшественников в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, предложен в качестве способа, позволяющего энтеральным нервным клеткам-предшественникам пролиферировать в культуре при сохранении их способности дифференцировки в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки.



A1

202190582

202190582

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566070EA/23

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭНТЕРАЛЬНЫХ НЕЙРАЛЬНЫХ КЛЕТОК- ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

[Область техники]

[0001]

Настоящее изобретение относится к способу получения энтеральных нейральных клеток-предшественников и способу наращивания культуры, и к среде для применения в этих способах.

[0002]

[Уровень техники]

Клетки нервного гребня (NCC) представляют собой клетки, которые развиваются между нейроэктодермой и эпидермальной эктодермой, когда нервная трубка формируется из нервной пластинки на раннем этапе развития. Энтеральные нейральные клетки-предшественники (ENP) представляют собой клетки, которые развились из этих NCC и дифференцировались в клеточную линию энтеральных нервных клеток. ENP обладают способностью дифференцироваться в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки.

[0003]

Болезнь Гиршпрунга, подавляющая моторику желудочно-кишечного тракта, представляет собой заболевание, вызванное врожденным аганглиозом кишечника. В последние годы описан фундаментальный подход, направленный на лечение болезни Гиршпрунга путем аутотрансплантации ENP, собранных у пациентов, и с возможностью клеток пролиферировать *ex vivo* (непатентная литература 1).

[0004]

Исследования по индукции NCC из плюрипотентных стволовых клеток, таких как индуцируемые плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), и дальнейшей индукции ENP из NCC были проведены для производства клеточных лекарственных средств, содержащих ENP.

[0005]

Например, в непатентной литературе 2 утверждается, что клетки-предшественники энтеральной нервной системы получали из плюрипотентных стволовых клеток человека. В непатентной литературе 2 не раскрыты PHOX2B-положительные энтеральные нервные клетки-предшественники и не описан нейрегулин-1 (NRG1).

В непатентной литературе 3 указано, что предшественники шванновских клеток были получены путем культивирования iPSC человека в среде, содержащей ингибитор TGF β , ингибитор GSK3 β и NRG1. В методе, описанном в непатентной литературе 3, не используют ретиноевую кислоту, и полученные предшественники шванновских клеток являются клетками, отличными от ENP (например, ENP положительны по отношению к экспрессии PHOX2B, тогда как предшественники шванновских клеток, описанные в литературе, отрицательны).

Список процитированной литературы

[Непатентная литература]

[0006]

[Непатентная литература 1] «Postnatal human enteric neuronal progenitors can migrate, differentiate, and proliferate in embryonic and postnatal aganglionic gut environments», *Pediatric Research*, 2017, 81, 5, 838-846

[Непатентная литература 2] «Deriving human ENS lineages for cell therapy and drug discovery in Hirschsprung disease», *Nature*, 2016, 531, 105-109

[Непатентная литература 3] «Schwann Cell Precursors from Human Pluripotent Stem Cells as a Potential Therapeutic Target for Myelin Repair», *Stem Cell Reports*, 2017, 8, 1714-1726

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[Техническая проблема]

[0007]

Для достижения клеточной терапии и т. д. с использованием ENP требуется методика, способная обеспечивать ENP в больших количествах. Хотя сообщалось о способе индукции предшественников энтеральной нервной системы из плюрипотентных стволовых клеток человека, как упомянуто выше (непатентная литература 2), при этом подход пролиферации и наращивания культуры индуцированных ENP еще не разработан.

[0008]

Основная цель настоящего изобретения - обеспечение способа, позволяющего ENP пролиферировать при сохранении их способности дифференцироваться в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки (мультипотентность).

[Решение проблемы]

[0009]

Для достижения цели настоящее изобретение предлагает следующие [1] - [27].

[1] Способ получения энтеральных нейральных клеток-предшественников, включающий следующие стадии:

(A1) обеспечение энтеральных нейральных клеток-предшественников;

(A2) культивирование энтеральных нейральных клеток-предшественников в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

[2] Способ получения по [1], отличающийся тем, что среда дополнительно содержит ингибитор TGF β и ингибитор GSK3 β .

[3] Способ получения по [1] или [2], отличающийся тем, что среда дополнительно содержит ретиноевую кислоту и/или ее производное.

[4] Способ получения по любому из [1] - [3], отличающийся тем, что среда дополнительно содержит GDNF.

[5] Способ получения по любому из [1] - [4], отличающийся тем, что носитель дополнительно содержит Матригель.

[6] Способ получения по любому из [1] - [5], отличающийся тем, что агонист

ERBB3 и/или агонист ERBB4 представляет собой NRG1.

[7] Энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные способом по любому из [1] - [6].

[0010]

[8] Замороженный продукт, содержащий энтеральные нейральные клетки-предшественники по [7].

[9] Клеточное лекарственное средство, содержащее энтеральные нейральные клетки-предшественники по [7].

[0011]

[10] Способ получения энтеральных нейральных клеток-предшественников, включающий следующие стадии:

(B1) обеспечение клеток нервного гребня;

(B2) культивирование клеток нервного гребня в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, а также ретиноевую кислоту и/или ее производное.

[11] Способ получения по [10], отличающийся тем, что клетки нервного гребня представляют собой клетки вагального нервного гребня.

[12] Способ получения по [11], отличающийся тем, что клетки вагального нервного гребня являются SOX10-положительными, HOXB5-положительными, HOXB9-отрицательными и PNOX2B-отрицательными и энтеральные нейральные клетки-предшественники являются SOX10-положительными и PNOX2B-положительными.

[12a] Способ получения по любому из [10] - [12], отличающийся тем, что среда дополнительно содержит ингибитор TGF β и/или ингибитор GSK3 β .

[12b] Способ получения по любому из [10] - [12a], отличающийся тем, что среда дополнительно содержит ретиноевую кислоту и/или ее производное.

[12c] Способ получения по любому из [10] - [12b], отличающийся тем, что среда дополнительно содержит GDNF.

[12d] Способ получения по любому из [10] - [12c], отличающийся тем, что среда дополнительно содержит матригель.

[12e] Способ получения по любому из [10] - [12d], отличающийся тем, что агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4 представляет собой NRG1.

[12f] Энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные способом получения по любому из [10] - [12e].

[0012]

[13] Энтеральные нейральные клетки-предшественники, содержащие агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

[14] Среда по [13], дополнительно содержащая ингибитор TGF β и/или ингибитор GSK3 β .

[15] Среда по [13] или [14], дополнительно содержащая ретиноевую кислоту и/или ее производное.

[16] Среда по любому из [13] - [15], дополнительно содержащая GDNF.

[17] Среда по любому из [13] - [16], дополнительно содержащая Матригель.

[18] Среда по любому из [13] - [17], отличающаяся тем, что агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4 представляет собой NRG1.

[0013]

[19] Способ наращивания культуры энтеральных нейральных клеток-предшественников, включающий следующие стадии:

(C1) обеспечение энтеральных нейральных клеток-предшественников; и

(C2) культивирование энтеральных нейральных клеток-предшественников в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

[0014]

[20] Способ получения кишечного органоида, включающий стадию совместного культивирования энтеральных нейральных клеток-предшественников и клеток задней кишки.

[21] Способ получения искусственного кишечного тракта, включающий следующие стадии: совместное культивирование энтеральных нейральных клеток-предшественников и клеток задней кишки с получением кишечного органоида; и трансплантацию кишечного органоида в живой организм с образованием искусственного кишечного тракта.

[21a] Способ получения искусственного кишечного тракта, включающий следующие стадии: совместное культивирование энтеральных нейральных клеток-предшественников и клеток задней кишки с получением кишечного органоида; и трансплантацию кишечного органоида в живой организм млекопитающего, не являющегося человеком, с образованием искусственного кишечного тракта.

[22] Способ получения по любому из [20] - [21a], отличающийся тем, что энтеральные нейральные клетки-предшественники представляют собой энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные способом получения по любому из [1] - [6].

[23] Кишечный органоид, полученный способом получения по [20] или [22].

[24] Искусственный кишечник, полученный способом получения по любому из [21] - [22].

[0015]

[25] Добавка для среды энтеральных нейральных клеток-предшественников, содержащая агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

[26] Применение агониста ERBB3 и/или агониста ERBB4 для культивирования энтеральных нейральных клеток-предшественников.

[27] Добавка по [25] или применение по [26], отличающиеся тем, что агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4 представляет собой NRG1.

[0016]

В настоящем изобретении «клетки нервного гребня (NCC)» представляют собой

клетки, которые развиваются между нейроэктодермой и эпидермальной эктодермой, когда нервная трубка формируется из нервной пластинки на ранней стадии развития. Эти клетки обладают мультипотентностью, чтобы дифференцироваться во многие типы клеток, такие как нервные клетки, глиальные клетки, мезенхимальные стромальные клетки, костные клетки, хондроциты, клетки роговицы и пигментные клетки, а также обладают способностью к самопролиферации. NCC являются SOX10-положительными.

[0017]

«Клетки краниального нервного гребня (краниальные NCC)» представляют собой популяцию клеток, которые во время развития появляются ближе к краниальной стороне, чем слуховой пузырек, и дифференцируются в лицевую кость, хрящ, нерв и т. д. Клетки краниального нервного гребня представляют собой клетки, положительные по отношению к маркеру клеток нервного гребня SOX10 и отрицательные по отношению к группе генов НОХВ (НОХВ1-10).

«Клетки вагального нервного гребня (вагальные NCC)» представляют собой популяцию клеток, которые возникают из участка, соответствующего 1-7-му сегментам во время развития, и дифференцируются в энтеральную нервную систему и т. д. Клетки вагального нервного гребня являются положительными в отношении маркера клеток нервного гребня SOX10 и являются НОХВ5-положительными, НОХВ9-отрицательными и РНОХ2В-отрицательными. Предпочтительно эти клетки являются SOX10-положительными и НОХВ1-7-положительными, НОХВ9-отрицательными, НОХВ10-отрицательными и РНОХ2В-отрицательными.

«Клетки нервного гребня туловищного отдела (NCC туловищного отдела)» представляют собой популяцию клеток, которые возникают из участка, соответствующего 8-му сегменту по отношению к каудальному концу во время развития и дифференцируются в клетки автономной нервной системы, сенсорный нерв, пигментные клетки и хромаффинные клетки коры надпочечников и т. д. Клетки нервного гребня туловищного отдела положительны в отношении маркера клеток нервного гребня SOX10 и являются НОХВ1-9-положительными, НОХВ10-отрицательными и РНОХ2В-отрицательными.

«Клетки крестцового нервного гребня (крестцовые НКС)» представляют собой популяцию клеток, которые возникают из участка, соответствующего крайнему каудальному концу время развития, и дифференцируются в частичную энтеральную нервную систему толстого кишечника и т. д. Клетки крестцового нервного гребня положительны в отношении маркера клеток нервного гребня SOX10, являются НОХВ1-10-положительными и РНОХ2В-отрицательными.

[0018]

«Энтеральные нейральные клетки-предшественники (ENP)» представляют собой клетки, которые появляются в результате дифференцировки клеток вагального нервного гребня и клеток крестцового нервного гребня и являются положительными по отношению к клеткам нервного гребня и маркерам глиальных клеток SOX10 и РНОХ2В. ENP

обладают способностью дифференцироваться в PNOX2B-положительные и SOX10-отрицательные энтеральные нервные клетки, а также в S100 β -положительные, PLP1-положительные и SOX10-положительные глиальные клетки.

«Энтеральные нервные клетки» происходят из энтеральных нейральных клеток-предшественников и являются PNOX2B-положительными и SOX10-отрицательными.

«Глиальные клетки» являются S100 β -положительными, PLP1-положительными и SOX10-положительными или GFAP-положительными. В контексте настоящего описания глиальные клетки также называют, в частности, «энтеральными глиальными клетками». Энтеральные глиальные клетки могут быть получены, например, при возможности дифференцировки энтеральных нейральных клеток-предшественников в глиальные клетки.

«Среда энтеральных нейральных клеток-предшественников» представляет собой среду, которая используется для получения ENP и/или для наращивания ENP. Получение ENP может включать дифференцировку стволовых клеток, таких как iPS-клетки, ES-клетки и NCC, в ENP.

[0019]

«Кишечный органоид» представляет собой тканевую структуру, полученную *in vitro*, и означает тканевую структуру, имеющую одну или более из множества функций, которыми обладает кишечник млекопитающих, таких как человек (например, функцию перистальтики, функцию секреции слизи и функцию абсорбции вещества), или аналогичные функции. Кишечный органоид состоит из клеточной популяции, включающей, например, клетки с происхождением из различных клеток, составляющих кишечный тракт, таких как клетки задней кишки и клетки передней кишки, и по меньшей мере одного типа клеток, выбранных из различных клеток, составляющих кишечный тракт, таких как клетки задней кишки, клетки передней кишки, энтеральные нервные клетки, энтеральные нейральные клетки-предшественники, кишечные стволовые клетки (LGR5-положительные), клетки Панета (LYZ-положительные), бокаловидные клетки (муцин-положительные) и секреторные клетки, а также клетки с происхождением из этих клеток.

«Искусственный кишечный тракт» представляет собой тканевую структуру, полученную путем трансплантации кишечного органоида в живое тело человека или млекопитающего, не являющегося человеком, и созревания кишечного органоида, и означает тканевую структуру, имеющую одну или более из множества функций, которыми обладает кишечник млекопитающих, таких как человек (например, функцию перистальтики, функцию секреции слизи и функцию абсорбции вещества) или аналогичные им функции. Искусственный кишечник получают, например, путем трансплантации кишечного органоида в организм (например, в брюшную полость) млекопитающего, такого как мышь, с последующим истечением данного периода. Искусственный кишечный тракт включает популяцию клеток, включающую, например, клетки с происхождением из различных клеток, составляющих кишечный тракт, такие как

клетки задней кишки и клетки передней кишки, и по меньшей мере один тип клеток, выбранных из различных клеток, составляющих кишечный тракт, таких как клетки задней кишки, клетки передней кишки, энтеральные нервные клетки, энтеральные нейральные клетки-предшественники, кишечные стволовые клетки (LGR5-положительные), клетки Панета (LYZ-положительные), бокаловидные клетки (муцин-положительные) и секреторные клетки, а также клетки с происхождением из этих клеток. Искусственный кишечник может дополнительно содержать, например, мышечные клетки и клетки пейсмекеров. В этом случае нервные клетки располагаются между мышечными клетками.

«Клетки задней кишки» представляют собой клетки, которые появляются в результате дифференцировки энтодермы в процессе развития и характеризуются как CDX2-положительные. Клеточная масса задней кишки может включать клетки задней кишки, а также эпителиальные клетки (E-кадгерин-положительные) и мезенхимальные клетки (виментин-положительные).

«Дефинитивная энтодерма» - это клетка, которая возникает в результате дифференцировки передней первичной полоски в ходе развития и характеризуется как SOX17-положительная и FOXA2-положительная.

[0020]

«ERBB3» представляет собой рецептор тирозинкиназы, кодируемый геном ERBB3, и является членом семейства рецепторов EGF. ERBB3 также называют HER3 (рецептор 3 эпидермального фактора роста человека). ERBB3 образует гетеродимер с ERBB2 и активирует сигнальные пути, участвующие в пролиферации или дифференцировке клеток. ERBB3, как известно, экспрессируется в энтеральных нейральных клетках-предшественниках. Известно, что ERBB3 имеет варианты сплайсинга. ERBB3 согласно настоящему изобретению охватывает эти варианты без особых ограничений.

«Агонист ERBB3» может быть любым веществом, обладающим способностью активировать нижележащий сигнальный путь (активность агониста ERBB3) путем связывания с ERBB3, и может включать белок, пептид, нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное соединение и их производные и т. д. Агонист ERBB3 представляет собой, например, такой белок, как NRG1, NRG2 и NRG6. Белок, такой как NRG1, NRG2 и NRG6, может быть полноразмерным белком или может быть его фрагментом, обладающим агонистической активностью ERBB3.

«ERBB4» представляет собой рецептор тирозинкиназы, кодируемый геном ERBB4, и является членом семейства рецепторов EGF. ERBB4 также называют HER4 (рецептор 4 эпидермального фактора роста человека). ERBB4 образует гетеродимер с ERBB2 и активирует сигнальные пути, участвующие в пролиферации или дифференцировке клеток. Известно, что ERBB4 имеет различные варианты сплайсинга. ERBB4 согласно настоящему изобретению охватывает эти варианты без особых ограничений.

«Агонист ERBB4» может быть любым веществом, обладающим способностью активировать нижележащий сигнальный путь (активность агониста ERBB4) путем связывания с ERBB4, и может включать белок, пептид, нуклеиновую кислоту,

низкомолекулярное соединение и их производные и т. д. Агонист ERBB4 представляет собой, например, белок, такой как NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, NRG5, BTC, EPR и HBEGF. Белок, такой как NRG1-5, BTC, EPR и HBEGF, может быть полноразмерным белком или может быть его фрагментом, обладающим агонистической активностью ERBB4.

«Нейрегулин-1 (NRG1)» представляет собой EGF-подобный фактор роста, кодируемый геном NRG1. NRG1 также называют херегулином. Известно, что NRG1 активирует нижележащий сигнальный путь путем связывания с ERBB3 и ERBB4.

«Нейротрофический фактор, полученный из линии глиальных клеток (GDNF)» представляет собой фактор, кодируемый геном GDNF, и действует как агонист GFR α 1 и RET. Известно, что GDNF связан с защитой нервных и глиальных клеток, а также с пролиферацией энтеральных нейральных клеток-предшественников.

[0021]

«Матригель» - это растворимый препарат базальной мембраны, экстрагированный из саркомы мышей Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), богатый белком внеклеточного матрикса. Матригель состоит в основном из ламинина, коллагена IV, протеогликана гепарансульфата и энтактина/нидогена 1 и 2. Матригель содержит, помимо этих основных компонентов, TGF β , фактор роста эпителиальных клеток (EGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), фактор роста фибробластов (FGF), тканевые активаторы плазминогена 3 и 4 и другие факторы роста, естественно продуцируемые в опухоли Engelbreth-Holm-Swarm (EHS).

[0022]

«Культура» относится к поддержанию, пролиферации (росту) и/или дифференцировке клеток в среде *in vitro*. «Культивирование» означает поддержание клеток и/или предоставление клеткам возможности пролиферировать (расти) и/или дифференцироваться вне ткани или тела, например, в чашке для культивирования клеток или колбе.

«Культура для наращивания» означает культуру с целью обеспечения возможности пролиферации желаемой популяции клеток и увеличения количества клеток. Увеличение количества клеток может быть достигнуто за счет увеличения количества клеток за счет пролиферации, превышающего уменьшение количества клеток за счет смерти, и это не требует пролиферации всех клеток в популяции клеток. Увеличение количества клеток может происходить в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз или в 30 или более раз по сравнению с количеством клеток до начала наращивания культуры.

«Поддерживающая культура» означает культуру желаемой популяции клеток с поддерживаемым количеством клеток. Поддержание количества клеток может быть достигнуто за счет выживания клеток без пролиферации или может быть достигнуто за счет баланса между увеличением числа клеток за счет пролиферации и уменьшением числа клеток за счет смерти. Поддержание количества клеток не требует, чтобы

количество клеток было полностью одинаковым. По существу, такое же количество клеток может поддерживаться в свете цели настоящего изобретения.

«Популяция клеток» означает две или более клеток одного или разных типов. «Популяция клеток» также означает массу клеток одного или разных типов.

[0023]

«Прикрепленная культура» означает культуру в состоянии, когда клетки прикреплены к контейнеру, например, в состоянии, когда клетки прикреплены к чашке для культивирования клеток или колбе, сделанной из стерилизованного пластика (или пластика с покрытием) в присутствии соответствующей среды.

«Суспензионная культура» означает культуру в состоянии, когда клетки диспергированы в подходящей среде без прикрепления к контейнеру.

[0024]

«Плюрипотентность» означает способность дифференцироваться в ткани и клетки, имеющие различные формы и функции, а также способность дифференцироваться в клетки любой линии трех зародышевых листков. «Плюрипотентность» отличается от «тотипотентности», которая представляет собой способность дифференцироваться в любую ткань живого организма, включая плаценту, тем, что плюрипотентные клетки не могут дифференцироваться в плаценту и, следовательно, не имеют способности к образованию индивидуума.

[0025]

«Мультипотентность» означает способность дифференцироваться во множество и ограниченные количества линий клеток. Например, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, нейральные стволовые клетки мультипотентны, но не плюрипотентны. ENP обладают мультипотентностью, чтобы дифференцироваться в нервные клетки и глиальные клетки.

[0026]

«Маркер» представляет собой «белок-маркер» или «маркерный ген» и означает белок, который специфически экспрессируется на поверхности клетки, в цитозоле и/или в ядре предварительно определенного типа клетки, или его ген. Маркер может быть маркером положительной селекции или маркером отрицательной селекции. Предпочтительно маркер представляет собой маркер клеточной поверхности. В частности, маркер селекции, положительный для клеточной поверхности, позволяет концентрировать, выделять и/или детектировать живые клетки.

Белок-маркер может быть детектирован с помощью иммунологического анализа, например, ИФА, иммуноокрашивания или проточной цитометрии с использованием антитела, специфического для маркерного белка. Антитело, которое связывается с определенной аминокислотной последовательностью белка-маркера или конкретной сахарной цепью, связанной с белком-маркером, и т. д., можно использовать в качестве антитела, специфического для белка-маркера. В случае внутриклеточно экспрессируемого белка-маркера, который не появляется на поверхности клеток (например, фактора

транскрипции или его субъединицы), представляющий интерес белок-маркер может быть детектирован путем экспрессии белка-маркера с помощью репортерного белка и детектирования репортерного белка (например, непатентная литература 4). Этот метод может быть предпочтительно использован, когда соответствующий маркер клеточной поверхности не найден. Маркерный ген может быть обнаружен с помощью метода амплификации и/или детектирования нуклеиновой кислоты, известного в данной области, например, RT-PCR, микроэррея, биочипа или RNAseq.

[0027]

«Экспрессия» определяется как транскрипция и/или трансляция определенной нуклеотидной последовательности, управляемая внутриклеточным промотором.

Термин «положительный» или «экспрессирующий» означает, что белок или ген экспрессируется в количестве, определяемом подходом, известным в данной области. Белок может быть детектирован с помощью иммунологического анализа, например ИФА, иммуноокрашивания или проточной цитометрии с использованием антитела. В случае внутриклеточно экспрессируемого белка, который не появляется на поверхности клеток (например, фактора транскрипции или его субъединицы), представляющий интерес белок может быть детектирован путем экспрессии белка с помощью репортерного белка и обнаружения репортерного белка. Ген может быть обнаружен с помощью метода амплификации и/или обнаружения нуклеиновой кислоты, например, RT-PCR, микроэррея, биочипа или RNAseq.

Термин «отрицательный» или «не экспрессированный» означает, что уровень экспрессии белка или гена меньше нижнего предела обнаружения на основе всех или любого из известных подходов, описанных выше. Нижний предел обнаружения экспрессии белка или гена может различаться в зависимости от каждого подхода.

[0028]

Было обнаружено, что «SOX10» экспрессируется во всех клетках нервного гребня, энтеральных нейральных клетках-предшественниках и полученных из них глиальных клетках. С другой стороны, SOX10 не экспрессируется в энтеральных нервных клетках.

«НОХВ5» экспрессируется в клетках вагального нервного гребня, клетках нервного гребня туловищного отдела и клетках крестцового нервного гребня и, как известно, необходим для нормального развития энтеральных нервных клеток. С другой стороны, НОХВ5 не экспрессируется в клетках краниального нервного гребня.

«НОХВ9» экспрессируется в клетках нервного гребня туловищного отдела и клетках крестцового нервного гребня. С другой стороны, НОХВ9 не экспрессируется в клетках краниального нервного гребня и клетках вагального нервного гребня.

Обнаружено, что «PHOX2B» экспрессируется в энтеральных нейральных клетках-предшественниках и происходящих из них энтеральных нервных клетках.

«GFAP (глиальный фибриллярный кислый белок)» экспрессируется в глиальных клетках. С другой стороны, GFAP не экспрессируется в энтеральных нейральных клетках-предшественниках и энтеральных нервных клетках.

[0029]

Термин «содержит» или «содержащий» относится к включению элемента (элементов), следующих за словом, без ограничений. Таким образом, это предполагает включение элемента (элементов), следующего за словом, но не предполагает исключения любого другого элемента.

[0030]

Термин «примерно» или «около» относится к значению, которое может варьироваться до плюс или минус 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 8%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% от эталонного значения. Предпочтительно термин «примерно» или «около» относится к диапазону от минус или плюс 15%, 10%, 5% или 1% от эталонного значения.

[Полезные эффекты изобретения]

[0031]

Настоящее изобретение относится к способу, позволяющему ENP пролиферировать при сохранении их способности к дифференцировке в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки.

[Краткое Описание Чертежей]

[0032]

[Фигура 1] Фигура 1 представляет собой схему, демонстрирующую способ получения ENP согласно второму варианту осуществления настоящего изобретения.

[Фигура 2] Фигура 2 представляет собой схему, демонстрирующую профиль экспрессии генов клеток вагального нервного гребня, полученных путем дифференцировки iPSC человека. На Фигуре 2 (А) представлены уровни экспрессии *NOXB2*, *NOXB3*, *NOXB4*, *NOXB5*, *NOXB7* и *NOXB9*. На Фигуре 2 (В) представлены уровни экспрессии *SOX10* и *EDNRB*. По оси ординат представлены уровни экспрессии (кратное изменение) по значениям отношения, указанным в \log_2 , с уровнями экспрессии в клетках краниального нервного гребня, определенными как 1.

[Фигура 3] Фигура 3 представляет собой схему, демонстрирующую зависящее от времени изменение количества аккумулялированных клеток, когда клетки вагального нервного гребня субкультивировали в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников.

[Фигура 4] Фигура 4 представляет собой схему, демонстрирующую результаты анализа проточной цитометрии на клетках, полученных путем культивирования клеток вагального нервного гребня в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников. На Фигуре 4 (А) представлена экспрессия *SOX10-tdTomato* и *RHOX2B-emGFP* в клетках вагального нервного гребня на 11-й день культивирования. На Фигуре 4 (В) представлена экспрессия *SOX10-tdTomato* и *RHOX2B-emGFP* в энтеральных нейральных клетках-предшественниках при количестве пассажей (от 1 до 6 пассажей).

[Фигура 5] Фигура 5 представляет собой схему, демонстрирующую флуоресцентные изображения клеток, полученных путем культивирования клеток вагального нервного гребня в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников

или в этой среде, за исключением NRG1 или GDNF, и результаты анализа экспрессии SOX10-tdTomato и PHOX2B-emGFP с помощью проточной цитометрии. На флуоресцентных изображениях красный цвет отображает флуоресценцию SOX10-tdTomato, а зеленый цвет - флуоресценцию PHOX2B-emGFP.

[Фигура 6] Фигура 6 представляет собой схему, демонстрирующую профиль экспрессии генов клеток, полученных путем культивирования клеток вагального нервного гребня в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников. EDNRB и RET представляют собой «рецептор эндотелина типа В» и «протоонкоген ret», соответственно.

[Фигура 7] Фигура 7 представляет изображения флуоресцентного иммуноокрашивания клеток, полученных культивированием энтеральных нейральных клеток-предшественников в среде для индукции энтеральных нервных клеток. На изображениях флуоресцентного иммуноокрашивания зеленый цвет отображает флуоресценцию PHOX2B-emGFP, а фиолетовый цвет отображает экспрессию ChAT, nNOS, GABA или 5-HT.

[Фигура 8] Фигура 8 представляет изображения флуоресцентного иммуноокрашивания искусственного кишечного тракта, образованного из кишечного органоида. Показаны PHOX2B-emGFP- и SOX10-tdTomato-положительные клетки, полученные из энтеральных нейральных клеток-предшественников. Верхнее правое изображение представляет собой частично увеличенный вид верхнего левого изображения, а нижнее правое изображение - частично увеличенное изображение нижнего левого изображения. На изображениях флуоресцентного иммуноокрашивания красный цвет отображает флуоресценцию SOX10-tdTomato, зеленый цвет отображает флуоресценцию PHOX2B-emGFP, а синий цвет отображает ядро.

[Фигура 9] На Фигуре 9 представлены изображения флуоресцентного иммуноокрашивания искусственного кишечного тракта, образованного из кишечного органоида. Показаны S100 β -положительные (А), GFAP-положительные (В) или TUBB3 (С)-положительные нервные клетки или глиальные клетки, полученные из энтеральных нейральных клеток-предшественников. На изображениях флуоресцентного иммуноокрашивания красный цвет отображает флуоресценцию SOX10-tdTomato, зеленый цвет отображает флуоресценцию PHOX2B-emGFP, желтый цвет отображает экспрессию S100 β , GFAP или TUBB3, а синий цвет отображает ядро.

[Фигура 10] Фигура 10 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения сократительной и релаксантной реакции на электрическую стимуляцию искусственного кишечного тракта, образованного из кишечного органоида.

[Фигура 11] Фигура 11 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения сократительной и релаксантной реакции на электрическую стимуляцию искусственного кишечного тракта, образованного из кишечного органоида.

[Фигура 12] Фигура 12 представляет собой график, демонстрирующий результаты измерения сократительной и релаксантной реакции на электрическую стимуляцию искусственного кишечного тракта, образованного из кишечного органоида.

[Фигура 13] Фигура 13 представляет результаты оценки пролиферативной способности и способности дифференцировки энтеральных нейральных клеток-предшественников, замороженных-размороженных после наращивания культуры. На Фигуре 13 (А) показано изменение количества клеток во время наращивания культуры (слева) и изменение соотношения энтеральных нейральных клеток-предшественников по отношению ко всем клеткам (справа) в зависимости от времени. На Фигуре 13 (В) показаны результаты анализа экспрессии PHOX2B и SOX10 с помощью проточной цитометрии в энтеральных нейральных клетках-предшественниках (ENP, слева) и энтеральных нервных клетках (ENS, справа), полученных путем их дифференцировки. На Фигуре 13 (С) показаны изображения флуоресцентного иммуноокрашивания энтеральных нервных клеток и глиальных клеток, полученные путем дифференцировки энтеральных нейральных клеток-предшественников. На изображениях флуоресцентного иммуноокрашивания зеленый цвет отображает флуоресценцию PHOX2B-emGFP или экспрессию GFAP, а фиолетовый цвет отображает экспрессию периферина, ChAT, nNOS, GABA, TH или SST.

[Фигура 14] Фигура 14 показывает изображение флуоресцентного иммуноокрашивания глиальных клеток, полученное дифференцировкой энтеральных нейральных клеток-предшественников после наращивания культуры.

[Фигура 15] Фигура 15 показывает изображения флуоресцентного иммуноокрашивания участка трансплантата по прошествии 1 недели после трансплантации энтеральных нейральных клеток-предшественников после наращивания культуры на стенку слепой кишки мыши. На изображениях флуоресцентного иммуноокрашивания синий цвет отображает ядро, зеленый цвет отображает флуоресценцию PHOX2B-emGFP, красный цвет отображает флуоресценцию SOX10-tdTomato, а фиолетовый цвет отображает экспрессию TUBB3. Фигура 15bis представляет собой частично увеличенный вид Фигуры 15a.

[0033]

[Подробное описание изобретения]

Далее будут описаны подходящие режимы для выполнения настоящего изобретения. Описанные ниже варианты осуществления приведены просто для иллюстрации типичных вариантов осуществления настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения не следует интерпретировать как ограниченный этими вариантами осуществления.

[0034]

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что энтеральные нейральные клетки-предшественники (ENP) могут пролиферировать путем культивирования ENP в присутствии агониста ERBB3 и/или агониста ERBB4, при этом при сохранении их способности к дифференцировке в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки.

На основе этого открытия первый вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу получения ENP, включающему следующие стадии (A1) и (A2):

(A1) обеспечение ENP; и

(A2) культивирование ENP в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

[0035]

ENP прлиферируют на стадии (A2). С этой точки зрения способ получения ENP согласно первому варианту осуществления является синонимом метода наращивания культуры для ENP.

[0036]

В способе получения ENP согласно настоящему изобретению, ENP могут быть получены путем дифференцировки клеток нервного гребня (NCC) и пролиферации. С этой точки зрения второй вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу получения ENP, включающему следующие стадии (B1) и (B2):

(B1) обеспечение NCC; и

(B2) культивирование NCC в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, а также ретиноевую кислоту и/или ее производное.

[0037]

Третий вариант осуществления настоящего изобретения относится к способу наращивания ENP, включающему следующие стадии (C1) и (C2):

(C1) обеспечение ENP; и

(C2) культивирование ENP в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

[0038]

В дальнейшем, стадии (A1) и (A2) способа получения ENP согласно первому варианту осуществления, стадии (B1) и (B2) способа получения ENP согласно второму варианту осуществления и стадии (C1) и (C2) способа наращивания ENP согласно третьему варианту осуществления будут описаны по порядку.

[0039]

[Способ получения согласно первому варианту осуществления (способ, включающий стадию пролиферации ENP)]

[Первый вариант; стадия (A1): стадия обеспечения энтеральных нейральных клеток-предшественников]

На этой стадии обеспечиваются ENP. На этой стадии могут быть обеспечены по меньшей мере ENP. Может быть обеспечена отдельная клетка ENP, популяция клеток ENP или популяция клеток, содержащая ENP.

ENP, которые должны быть обеспечены на этой стадии, могут представлять собой коммерчески приобретенные ENP, могут представлять собой ENP, отделенными от живого организма, или могут представлять собой ENP, индуцированные из NCC, и т. д. с помощью метода, упомянутого ниже. Коммерчески полученные ENP могут представлять собой ENP в культивированном состоянии или могут представлять собой ENP в замороженном состоянии. Когда ENP представляют собой ENP, индуцированные NCC и т.

д., ENP также могут находиться в культивированном состоянии или в замороженном состоянии.

[0040]

Например, способ разрезания ткани кишечного тракта на квадраты 1 мм, проведение ферментативной обработки (диспаза и коллагеназа типа XI, 37°C, 90 мин), а затем культивирование полученных клеток в среде, содержащей EGF и FGF, для разделения ENP в виде агрегированных клеток известен как метод отделения ENP из живого организма. Для разделения чистоту ENP можно повысить за счет комбинации с сортировкой клеток с использованием антитела против CD271.

[0041]

[Первый вариант; стадия (A2): стадия культивирования энтеральных нейтральных клеток-предшественников]

На этой стадии ENP культивируют в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

[0042]

Агонист ERBB3 может быть любым веществом, обладающим способностью активировать нижележащий сигнальный путь (активность агониста ERBB3) путем связывания с ERBB3, и может включать белок, пептид, нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное соединение и их производные и т. д. Агонист ERBB3 представляет собой, например, такой белок, как NRG1, NRG2 и NRG6. Белок, такой как NRG1, NRG2 и NRG6, может быть полноразмерным белком или может быть его фрагментом, обладающим агонистической активностью ERBB3.

Агонист ERBB4 может быть любым веществом, обладающим способностью активировать нижележащий сигнальный путь (активность агониста ERBB4) путем связывания с ERBB4, и может включать белок, пептид, нуклеиновую кислоту, низкомолекулярное соединение и их производные и т. д. Агонист ERBB4 представляет собой, например, белок, такой как NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, NRG5, BTC, EPR и HBEGF. Белок, такой как NRG1-5, BTC, EPR и HBEGF, может быть полноразмерным белком или может быть его фрагментом, обладающим агонистической активностью ERBB4.

Белок человеческого происхождения или белок, полученный из млекопитающего, не являющегося человеком, например обезьяны, свиньи, крупного рогатого скота, козы, овцы, мыши или крысы, подходящим образом используется в качестве белка, такого как NRG1, NRG2, NRG3, NRG4, NRG5, NRG6, BTC, EPR и HBEGF в зависимости от вида происхождения клеток, которые необходимо культивировать.

Эти белки могут быть получены как рекомбинантные белки с использованием обычного молекулярно-биологического подхода и могут быть получены в виде коммерчески доступных реагентов.

[0043]

Агонист ERBB3 и агонист ERBB4 предпочтительно представляют собой NRG1 или

его фрагмент, обладающий активностью агониста ERBB3 или активностью агониста ERBB4.

Полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого NRG1 представлена в SEQ ID NO: 1 (номер доступа NCBI: NP_039250).

Примеры фрагмента NRG1, обладающего активностью агониста ERBB3 или активностью агониста ERBB4, включают фрагменты от 10 до 300, от 20 до 150 или от 30 до 100 аминокислот, происходящие из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

Фрагмент NRG1 может быть, например, фрагментом, содержащим связывающий домен ERBB3 или ERBB4 (EGF-подобный домен). Сообщается, что связывающий домен расположен в положениях аминокислот от 190 до 220 в SEQ ID NO: 1.

NRG1 и его фрагмент могут быть получены в виде рекомбинантных белков с использованием обычного молекулярно-биологического подхода и могут быть получены в виде коммерчески доступных реагентов. Фрагмент NRG1, содержащий связывающий домен ERBB3 или ERBB4 (EGF-подобный домен), коммерчески доступен (например, Рекомбинантный человеческий Херегулин β -1, каталожный номер: 100-03, RegroTech, Inc.).

NRG1 или его фрагмент могут состоять из модифицированной аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, представленной SEQ ID NO: 1, или ее частичной последовательности путем делеции, замены, вставки или добавления одной или нескольких аминокислот, и имеют агонистическую активность ERBB3 или агонистическую активность ERBB4.

В этом контексте термин «несколько» означает 20 или меньше, предпочтительно 10 или меньше, более предпочтительно 5 или меньше, еще более предпочтительно 3 или меньше, наиболее предпочтительно 2.

Модифицированная аминокислотная последовательность может быть аминокислотной последовательностью, имеющей 80% или больше, предпочтительно 85% или больше, более предпочтительно 90% или больше, еще более предпочтительно 95% или больше, наиболее предпочтительно 98% или больше идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1. Идентичность аминокислотной последовательности можно вычислить с помощью универсального инструмента анализа. Например, можно использовать BLAST, предоставленный Национальным центром биотехнологической информации (NCBI).

NRG1 или его фрагмент могут быть слитым белком с другим белком или модифицированным белком, связанным с другой молекулой, при условии, что белок может сохранять агонистическую активность ERBB3 или агонистическую активность ERBB4.

[0044]

Агонистическую активность ERBB3 или агонистическую активность ERBB4 белкового фрагмента или т. п. можно оценить с использованием коммерчески доступного

набора. Например, используется функциональный анализ PathHunter® ERBB2-ERBB3 или функциональный анализ PathHunter® ERBB4 (оба от DiscoverX Corp.). Линия клеток, содержащаяся в наборе, культивируется в присутствии кандидата-агониста, имеющего различные концентрации, с последующим измерением активности β -галактозидазы. Кандидат, который демонстрирует высокое значение активности β -галактозидазы, обладает агонистической активностью.

[0045]

Концентрация агониста ERBB3 и/или агониста ERBB4 в среде на этой стадии соответствующим образом регулируется в зависимости от типа добавляемого агониста ERBB3 и/или агониста ERBB4. Концентрация может составлять, например, от 1 до 1000 нг/мл, предпочтительно от 50 до 200 нг/мл.

В случае использования NRG1 в качестве агониста ERBB3 и/или агониста ERBB4 его концентрация в среде может составлять, например, от 1 до 1000 нг/мл, предпочтительно от 50 до 200 нг/мл, особенно предпочтительно примерно 100 нг/мл. .

[0046]

Среда может содержать ингибитор TGF β и ингибитор GSK3 β .

«Ингибитор TGF β » представляет собой вещество, обладающее ингибирующей активностью в отношении TGF β (трансформирующего фактора роста β). TGF β представляет собой цитокин, связывающийся с двумя типами рецепторов серин/треониновых протеинкиназ, и контролирует пролиферацию клеток, дифференцировку клеток, клеточную смерть и т. д. посредством передачи сигнала, главным образом, для активации Smad (R-Smad). Примеры вещества, обладающего активностью ингибирования TGF β , включают вещества, ингибирующие связывание TGF β с его рецептором, и вещества, ингибирующие нисходящие сигналы после связывания TGF β с его рецептором. Примеры нисходящих сигналов включают фосфорилирование рецептора TGF β II рецептором TGF β II и фосфорилирование Smad фосфорилированным рецептором TGF β I. «Ингибитор TGF β », используемый в настоящем изобретении, особо не ограничивается при условии, что ингибитор TGF β обладает ингибирующей активностью TGF β .

[0047]

Примеры ингибитора TGF β включают SB431542 (4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]бензамид), A83-01(4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]бензамид), LDN193189 (4-[6-[4-(1-пиперазинил))фенил]пиразоло[1,5-а]пиримидин-3-ил]хинолин), GW788388 (4-[4-[3-(2-пиридинил)-1H-пиразол-4-ил]-2-пиридинил]-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-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-2-(1,1-диметилэтил)-1H-имидазол-5-ил]-6-метилпиридин). Два или более из этих ингибиторов

TGF β можно использовать в комбинации.

[0048]

Концентрация ингибитора TGF β в среде на этой стадии соответствующим образом регулируется в зависимости от типа добавляемого ингибитора TGF β . Концентрация может составлять, например, от 0,1 до 50 мкМ, предпочтительно от 1 до 20 мкМ.

В случае использования SB431542 (4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]бензамида) в качестве ингибитора TGF β его концентрация в среде может составлять, например, от 1 до 100 мкМ, предпочтительно от 5 до 20 мкМ, особенно предпочтительно примерно 10 мкМ.

[0049]

«Ингибитор GSK3 β » представляет собой вещество, обладающее ингибирующей активностью в отношении GSK3 β (киназы β гликогенсинтазы). GSK3 (киназа 3 гликогенсинтазы) представляет собой серин/треониновую протеинкиназу и участвует во многих сигнальных путях, связанных с производством гликогена, апоптозом, поддержанием стволовых клеток и т. д. GSK3 имеет 2 изоформы α и β . «Ингибитор GSK3 β », используемый в настоящем изобретении, особо не ограничивается при условии, что ингибитор GSK3 β обладает ингибирующей активностью GSK3 β . Ингибитор GSK3 β может быть веществом, обладающим как ингибирующей активностью GSK3 β , так и ингибирующей активностью GSK3 α .

[0050]

Примеры ингибитора GSK3 β включают CHIR98014 (N6-[2-[[4-(2,4-дихлорфенил)-5-(1H-имидазол-1-ил)-2-пиримидинил]амино]этил]-3-нитро-2,6-пиридиндиамин), CHIR99021 (6-{2-[4-(2,4-дихлорфенил)-5-(5-метил-1H-имидазол-2-ил)пиримидин-2-иламино]этиламино}никотинонитрил), CP21R7 (3-(3-аминофенил)-4-(1-метил-1H-индол-3-ил)-1H-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]пиримидин-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-ил]оксифенолдитрифторацетат), 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, ВЮ ((2'Z,3'E)-6-броминдирубин-3'-оксим), БИО-ацетоксим, комплексы пиридокарбазол-циклопентадиенил-рутений, OTDZT, альфа-4-дибромацетофенон и литий. Два или более из этих ингибиторов GSK3 β можно использовать в комбинациях.

Ингибитор GSK3 β не ограничивается этими веществами. Например, антисмысловый олигонуклеотид или миРНК против мРНК GSK3 β , антитело, связывающееся с GSK3 β , или доминантно-отрицательный мутант GSK3 β также можно использовать в качестве ингибитора GSK3 β . Эти ингибиторы GSK3 β коммерчески доступны или могут быть синтезированы в соответствии с известным методом.

[0051]

Концентрация ингибитора GSK3 β в среде на этой стадии соответствующим образом регулируется в зависимости от типа добавляемого ингибитора GSK3 β . Концентрация может составлять, например, от 0,1 до 10 мкМ, предпочтительно от 0,5 до 2 мкМ.

В случае использования CHIR99021 в качестве ингибитора GSK3 β , его концентрация в среде может составлять, например, от 0,1 до 10 мкМ, предпочтительно от 0,5 до 2 мкМ, особенно предпочтительно примерно 1 мкМ.

[0052]

Среда на этой стадии может дополнительно содержать любое одно или более вещество из ретиноевой кислоты (RA) и/или ее производных (далее также просто называемых «RA и т. д.»), Нейротрофического фактора, происходящего из линии глиальных клеток (GDNF), и Матригеля.

[0053]

Ретинол, ретиналь, ретиноин, изоретиноин, алитретиноин, этретинат, ацитретин, тазаротен, бексаротен или адапален могут использоваться в качестве производных ретиноевой кислоты (RA). Два или более из этих производных могут использоваться в комбинациях.

[0054]

Концентрация RA и т. д. в среде на этой стадии соответствующим образом регулируется в зависимости от типа добавляемой RA и т. д. Концентрация может составлять, например, от 0,1 до 50 мкМ, предпочтительно от 1 до 20 мкМ.

В случае использования RA в качестве RA и т. д. ее концентрация в среде может составлять, например, от 0,001 до 50 мкМ, предпочтительно от 0,1 до 10 мкМ, особенно предпочтительно примерно 1 мкМ.

[0055]

Концентрация GDNF в среде на этой стадии может составлять, например, от 1 до 1000 нг/мл, предпочтительно от 50 до 200 нг/мл.

[0056]

Концентрация матригеля в среде на этой стадии составляет, например, от 0,2 до 20% (об./об.), предпочтительно 1-4% (об./об.), особенно предпочтительно примерно 2% (об./об.).

[0057]

Базальная среда особо ничем не ограничивается. Например, подходящим образом используют смесь растворов А и В StemFit AK03 (Ajinomoto Healthy Supply Co., Inc.), среды TeSR1 и среды с определенным химическим составом (CDM). Кроме того, могут быть использованы, например, среда BME, среда BGJb, среда CMRL 1066, среда Glasgow MEM, улучшенная среда MEM (IMEM), улучшенная среда MDM (IMDM), среда 199 (Medium 199), среда Игла MEM, среда α MEM, среда DMEM (с высоким содержанием глюкозы или с низким содержанием глюкозы), среда DMEM/F12, среда Хэма, среда RPMI

1640, среда Фишера и их смешанные среды.

[0058]

Среда CDM особо ничем не ограничивается. Например, может быть использована среда, приготовленная из модифицированной Iscove среды Дульбекко (производства GE Healthcare Japan Corp.).

Базальная среда может быть дополнена веществом для использования в обычной культуре клеток, таким как апотрансферрин, монотиоглицерин, бычий сывороточный альбумин (BCA), инсулин и/или антибиотик.

[0059]

ENP можно культивировать для пролиферации с поддержанием их мультипотентности путем культивирования ENP в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, и предпочтительно дополнительно содержащей один или более из ингибитора TGF β , ингибитора GSK3 β , RA и т. д., GDNF и Матригель.

[0060]

Период культивирования на этой стадии может быть периодом, в течение которого ENP пролиферируют до достижения нужного количества клеток. Этот период культивирования ничем особо не ограничен и может составлять, например, 7 дней или дольше, 10 дней или дольше, 14 дней или дольше, 20 дней или дольше, 25 дней или дольше, 30 дней или дольше, 40 дней или дольше, 50. дней или дольше, 60 дней или дольше, 70 дней или дольше, 80 дней или дольше, 90 дней или дольше, от 7 до 100 дней или 100 дней или дольше.

Скорость пролиферации клеток в этот период достигает очень высокой скорости, составляющей примерно 75 часов с точки зрения времени удвоения клеток.

[0061]

Эта стадия предпочтительно выполняется с помощью прикрепленной культуры и может выполняться с помощью суспензионной культуры.

Для прикрепленной культуры используется контейнер для культивирования, например чашка, колба, микропланшет или подложка для культивирования клеток, такая как OptiCell (торговое название, Nunc).

Контейнер для использования в прикрепленной культуре может быть обработан для улучшения адгезии с клетками (гидрофильности) или покрыт субстратом для адгезии клеток, таким как коллаген, желатин, поли-L-лизин, поли-D-лизин, ламинин, фибронектин, матригель или витронектин. Более предпочтительно использовать контейнер без такой обработки поверхности или покрытия.

В суспензионной культуре клетки диспергируют в среде, и образуется агрегированная клеточная масса, в то время как компоненты среды и внутренняя концентрация кислорода в среде унифицируются путем перемешивания или встряхивания. Подходящая скорость перемешивания соответственно устанавливается в соответствии с плотностью клеток и размером культурального контейнера. Чрезмерное перемешивание или встряхивание создает физическую нагрузку на клетки и препятствует

образованию агрегированной клеточной массы. Таким образом, скорость перемешивания или встряхивания регулируется таким образом, чтобы можно было унифицировать компоненты среды и внутреннюю концентрацию кислорода в среде, а также не препятствовать образованию агрегированной клеточной массы. Суспензионное культивирование можно проводить в устойчивом положении без перемешивания или встряхивания.

Для суспензионной культуры предпочтительно использовать контейнер с покрытием с низкой адгезией, таким как Prime surface (торговое название, Sumitomo Bakelite Co., Ltd.).

Температура культивирования особо ничем не ограничивается и может составлять от 30 до 40 °C (например, 37 °C). Концентрация углекислого газа в культуральном контейнере может составлять, например, порядка 5%.

[0062]

[Способ получения согласно второму варианту осуществления (метод, предусматривающий дифференцировку NCC в ENP и пролиферацию ENP)]

[Второй вариант осуществления; стадия (B1): стадия обеспечения клеток нервного гребня]

На этой стадии обеспечиваются NCC. На этой стадии могут быть обеспечены по меньшей мере NCC. Может быть обеспечена одна клетка NCC, популяция клеток NCC или популяция клеток, содержащая NCC.

NCC, которые должны быть обеспечены на этой стадии, могут быть коммерчески приобретенными NCC, могут быть NCC, отделенными от живого организма, или могут быть NCC, полученными путем дифференцировки стволовых клеток и т. д. Коммерчески полученные NCC могут быть NCC в культивированном состоянии или могут быть NCC в замороженном состоянии. Когда NCC представляют собой NCC, полученные путем дифференцировки стволовых клеток и т. д., NCC также могут находиться в культивированном состоянии или в замороженном состоянии.

[0063]

Примеры коммерчески доступных NCC включают клетки оболочки наружного корня волосяного фолликула человека (производимые Cosmo Bio Co., Ltd.) и линию клеток краниального нервного гребня мышей O9-1 (производимые Merck Millipore).

Сообщается, что NCC существуют в живых организмах млекопитающих, например, нервной трубке эмбриона человека примерно через 30 дней после оплодотворения, нервной трубке эмбриона мыши примерно на 9-й день плода и в коже взрослых людей, свиней и грызунов (Betters et al., *Developmental biology*, 2010, стр. 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). NCC могут быть собраны с использованием известного метода (например, Motohashi et al., *Biology open*, 2016, 5: 311-322; и Pfaltzgraff et al., *Journal of Visualized Experiments*, 2012, 64: 4134) и подвергнуты этой стадии.

[0064]

Примеры стволовых клеток для использования при дифференцировке в НСС включают плюрипотентные стволовые клетки. «Плюрипотентные стволовые клетки», которые можно использовать в настоящем изобретении, относятся к стволовым клеткам, которые могут дифференцироваться в ткани и клетки, имеющие различные формы и функции, и обладают способностью дифференцироваться в клетки любой линии трех зародышевых листков (энтодермы, мезодермы и эктодермы). Их примеры включают, но не ограничиваются ими, эмбриональные стволовые клетки (ESC), эмбриональные стволовые клетки, полученные из клонированных эмбрионов, полученных путем ядерной трансплантации, сперматогониальные стволовые клетки, эмбриональные герминальные клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (здесь также называемые «iPSC»). «Мультипотентные стволовые клетки», которые можно использовать в настоящем изобретении, относятся к стволовым клеткам, обладающим способностью дифференцироваться во множество и в ограниченное количество линий клеток. Примеры «мультипотентных стволовых клеток», которые можно использовать в настоящем изобретении, включают стволовые клетки пульпы зуба, стволовые клетки слизистой оболочки полости рта, стволовые клетки волосяного фолликула и соматические стволовые клетки, полученные из культивируемых фибробластов или стволовых клеток костного мозга. Плюрипотентные стволовые клетки предпочтительно представляют собой ESC и iPSC.

[0065]

Доступные «ESC» включают мышинные ESC, такие как различные линии мышинных ESC, созданные в Genious Targeting Laboratory, Riken (Institute of Physical and Chemical Research) и т. п., а также человеческие ESC, такие как различные линии ESC человека, созданные University of Wisconsin, NIH, Riken, Kyoto University, National Center for Child Health and Development, Cellartis и другие. Например, линии CHB-1 - CHB-12, линия RUES1, линия RUES2 и линии HUES1 - HUES28, распространяемые ESI Bio, линия H1 и линия H9, распространяемая WiCell Research, и линия KhES-1, линия KhES-2, линия KhES-3, линия KhES-4, линия KhES-5, линия SSES1, линия SSES2 и линия SSES3, распространяемая Riken, могут быть использованы в качестве линий ESC человека.

[0066]

«Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки» относятся к клеткам, которые получают перепрограммированием соматических клеток млекопитающих или недифференцированных стволовых клеток путем введения определенных факторов (факторов перепрограммирования ядер). В настоящее время существуют различные «индуцированные плюрипотентные стволовые клетки» и iPSC, созданные Yamanaka et al. путем введения 4 факторов Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Мус в фибробласты мышей (Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676); также могут быть использованы iPSC, полученные из клеток человека, созданные путем введения аналогичных 4 факторов в фибробласты человека (Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872); Nanog-iPSC,

созданные путем сортировки клеток с использованием экспрессии Nanog в качестве индикатора после введения 4 факторов (Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). *Nature* 448, 313-317); iPSC, полученные способом без использования c-Мyc (Nakagawa M, Yamanaka S., et al. *Nature Biotechnology*, (2008) 26, 101-106); iPSC, созданные путем введения 6 факторов безвирусным методом (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. Кроме того, могут быть использованы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, созданные путем введения 4 факторов OCT3/4, SOX2, NANOG и LIN28, Thomson et al. (Yu J., Thomson JA. et al., *Science* (2007) 318: 1917-1920); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Daley et al. (Park IH, Daley GQ и др., *Nature* (2007) 451: 141-146); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные Sakurada et al. (Публикация нерассмотренной заявки на патент Японии № 2008-307007) и т. п.

Кроме того, могут быть использованы любые индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, известные в данной области техники, описанные 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 не прошедшей экспертизу заявки на патент Японии № 2008-307007, публикация не прошедшей экспертизу заявки на патент 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, а также линию 253G1, линию 201B7, линию 409B2, линию 454E2, линию 606A1, линию 610B1, линию 648A1, линию 1231A1 и линию 1231A3 от Kyoto University. Линия 1231A1 и линия 1231A3 предпочтительны, а линия 1231A3 более предпочтительна.

[0067]

Дифференцировка стволовых клеток в NCC может быть выполнена в соответствии с известным методом, описанным в литературе (например, в непатентной литературе 2). Примерные стадии, позволяющие iPSC человека дифференцироваться в NCC, показаны на Фигуре 1. Сначала iPSC высевают в чашку или что-то подобное, культивируют в прикрепленном состоянии, а затем культивируют в прикрепленном состоянии в среде, содержащей ингибитор TGFβ и ингибитор GSK3β (Фигура 1, стадия i), и тем самым позволяя дифференцироваться в NCC с помощью прикрепленной культуры в среде, дополнительно дополненной RA и/или ее производным (стадия ii).

[0068]

Концентрация ингибитора TGFβ в среде на этой стадии соответствующим образом регулируется в зависимости от типа добавляемого ингибитора TGFβ. Концентрация может

составлять, например, от 0,1 до 50 мкМ, предпочтительно от 1 до 20 мкМ.

В случае использования SB431542 (4-[4-(1,3-бензодиоксол-5-ил)-5-(2-пиридинил)-1H-имидазол-2-ил]бензамида) в качестве ингибитора TGF β его концентрация в среде может составлять, например, от 1 до 100 мкМ, предпочтительно от 5 до 20 мкМ, особенно предпочтительно примерно 10 мкМ.

[0069]

Концентрация ингибитора GSK3 β в среде на этой стадии соответствующим образом регулируется в зависимости от типа добавляемого ингибитора GSK3 β . Концентрация может составлять, например, от 0,1 до 10 мкМ, предпочтительно от 0,5 до 2 мкМ.

В случае использования CHIR99021 в качестве ингибитора GSK3 β , его концентрация в среде может составлять, например, от 0,1 до 10 мкМ, предпочтительно от 0,5 до 2 мкМ, особенно предпочтительно примерно 1 мкМ.

[0070]

Стволовым клеткам можно дать возможность дифференцироваться в клетки краниального нервного гребня (краниальные NCC), клетки вагального нервного гребня (вагальные NCC), клетки нервного гребня туловищного отдела (NCC туловищного отдела) или клетки крестцового нервного гребня (крестцовые NCC) в зависимости от концентрации RA и т. д. в среде на стадии ii.

[0071]

Например, в случае, когда iPSC человека дифференцируются в клетки краниального нервного гребня, RA и т. д. не добавляются.

В случае, если iPSC человека могут дифференцироваться в клетки вагального нервного гребня или клетки нервного гребня туловищного отдела, концентрация RA и т. д. в среде составляет, например, от 0,001 до 50 мкМ, предпочтительно от 0,1 до 10 мкМ.

Однако концентрация RA и т. д. в среде соответствующим образом регулируется в зависимости от типа добавляемой RA и т. д.

Для получения ENP, обладающих высокой способностью дифференцироваться в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки на следующей стадии (B2), предпочтительна дифференцировка в клетки вагального нервного гребня (вагальные NCC).

[0072]

Период культивирования в среде, содержащей ингибитор TGF β и ингибитор GSK3 β (Фигура 1, стадия i), может составлять, например, от 0 до 12 дней и может составлять, в частности, примерно 6 дней.

Период культивирования в среде, дополнительно содержащей RA и т. д. (стадия ii), может составлять, например, от 1 до 12 дней и может составлять, в частности, примерно 5 дней.

[0073]

Можно использовать упомянутую выше базальную среду.

[0074]

Упомянутый выше контейнер для культивирования можно использовать для прикрепленной культуры.

Контейнер для культивирования предпочтительно имеет поверхностную обработку, чтобы улучшить адгезию с клетками (гидрофильность), или покрыт субстратом для адгезии клеток, таким как коллаген, желатин, поли-L-лизин, поли-D-лизин, ламинин, фибронектин, матригель или витронектин.

Температура культивирования особо ничем не ограничивается и составляет от 30 до 40 °C (например, 37 °C). Концентрация диоксида углерода в контейнере для культивирования составляет, например, примерно 5%.

[0075]

[Второй вариант осуществления; стадия (B2): стадия культивирования клеток нервного гребня]

На этой стадии NCC культивируют в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, а также ретиноевую кислоту и/или ее производное (Фигура 1, стадия iii). Используемые в настоящем описании NCC предпочтительно представляют собой клетки вагального нервного гребня (вагальные NCC).

[0076]

Используемые агонист ERBB3, агонист ERBB4 и RA и т. д., и их концентрации в среде могут быть такими же, как на стадии (A2).

[0077]

Среда может дополнительно содержать ингибитор TGF β и/или ингибитор GSK3 β . Используемые ингибитор TGF β и ингибитор GSK3 β и их концентрации в среде могут быть такими же, как на стадии (A2).

[0078]

Среда может дополнительно содержать любой один или более из GDNF и матригеля.

Концентрации GDNF и матригеля в используемой среде и базальной среде также могут быть такими же, как на стадии (A2).

[0079]

Эта стадия предпочтительно выполняется с помощью прикрепленной культуры и может выполняться с помощью суспензионной культуры, как на стадии (A2).

[0080]

ENP могут пролиферировать с сохранением их мультипотентности путем культивирования ENP в среде, содержащей агонист ERBB3, агонист ERBB4 и RA и т. д., и предпочтительно дополнительно содержащей один или более из ингибитора TGF β , ингибитора GSK3 β , GDNF и матригеля.

[0081]

Период культивирования на этой стадии может быть периодом, в течение которого ENP пролиферируют до достижения нужного количества клеток. Этот период

культивирования ничем особо не ограничен и может составлять, например, 7 дней или дольше, 10 дней или дольше, 14 дней или дольше, 20 дней или дольше, 25 дней или дольше, 30 дней или дольше, 40 дней или дольше, 50. дней или дольше, 60 дней или дольше, 70 дней или дольше, 80 дней или дольше, 90 дней или дольше, от 7 до 100 дней или 100 дней или дольше.

Скорость пролиферации клеток в этот период достигает настолько высокого значения как примерно 75 часов с точки зрения времени удвоения клеток.

[0082]

[Способ наращивания культуры согласно третьему варианту осуществления]

[Третий вариант осуществления; стадия (C1): стадия предоставления энтеральных нейральных клеток-предшественников]

На этой стадии предоставляются ENP.

ENP, которые должны быть обеспечены на этой стадии, могут быть такими же, как и на стадии (A1).

[0083]

[Третий вариант осуществления; стадия (C2): стадия культивирования энтеральных нейральных клеток-предшественников]

На этой стадии ENP культивируют в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

[0084]

Используемый агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, и их концентрации в среде могут быть такими же, как на стадии (A2).

[0085]

Среда может дополнительно содержать ингибитор TGF β и ингибитор GSK3 β .

Используемые ингибитор TGF β и ингибитор GSK3 β и их концентрации в среде могут быть такими же, как на стадии (A2).

[0086]

Среда может дополнительно содержать любой один или более из RA и т. д., нейротрофического фактора линии глиальных клеток (GDNF) и матригеля.

Используемая RA и т. д. и концентрация добавляемой RA и т. д. могут быть такими же, как на стадии (A2).

[0087]

Концентрации GDNF и матригеля в используемой среде и базальной среде также могут быть такими же, как на стадии (A2).

[0088]

Эта стадия предпочтительно выполняется с помощью прикрепленной культуры и может выполняться с помощью суспензионной культуры, как на стадии (A2).

[0089]

ENP можно культивировать для пролиферации с их мультипотентностью, поддерживаемой путем культивирования ENP в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или

агонист ERBB4 и RA и т. д. и предпочтительно дополнительно содержащей один или более из ингибитора TGF β , ингибитора GSK3 β , GDNF и Матригеля.

[0090]

Период культивирования на этой стадии может быть периодом, в течение которого ENP пролиферируют до достижения нужного количества клеток. Этот период культивирования ничем особо не ограничен и может составлять, например, 7 дней или дольше, 10 дней или дольше, 14 дней или дольше, 20 дней или дольше, 25 дней или дольше, 30 дней или дольше, 40 дней или дольше, 50. дней или дольше, 60 дней или дольше, 70 дней или дольше, 80 дней или дольше, 90 дней или дольше, от 7 до 100 дней или 100 дней или дольше.

Скорость пролиферации клеток в этот период достигает настолько высокого значения как примерно 75 часов с точки зрения времени удвоения клеток.

[0091]

[Среда энтеральных нейральных клеток-предшественников]

Настоящее изобретение также относится к среде ENP для применения в способе получения ENP или способе наращивания культуры, упомянутом выше. Предпочтительный состав среды такой, как указано выше. Получение ENP может включать дифференцировку стволовых клеток, таких как iPSC, ESC и NCC, в ENP.

В одном из аспектов настоящего изобретения среда энтеральных нейральных клеток-предшественников содержит агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4. В другом аспекте настоящего изобретения среда энтеральных нейральных клеток-предшественников может содержать агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, а также ингибитор TGF β и/или ингибитор GSK3 β и предпочтительно содержит ингибитор TGF β и ингибитор GSK3 β . В альтернативном аспекте настоящего изобретения среда энтеральных нейральных клеток-предшественников может содержать агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, а также GDNF. В альтернативном аспекте настоящего изобретения среда энтеральных нейральных клеток-предшественников может содержать агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, а также матригель. В альтернативном аспекте настоящего изобретения среда энтеральных нейральных клеток-предшественников может содержать агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, а также GDNF и матригель. В альтернативном аспекте настоящего изобретения среда энтеральных нейральных клеток-предшественников может содержать агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, а также ингибитор TGF β , ингибитор GSK3 β , GDNF и матригель. Эти среды энтеральных нейральных клеток-предшественников могут дополнительно содержать RA и т. д. Концентрации агониста ERBB3 и/или агониста ERBB4, ингибитора TGF β , ингибитора GSK3 β , GDNF, матригеля и RA и т. д. в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников могут быть такими же, как на стадии (A2).

В альтернативном аспекте настоящее изобретение также относится к добавке к среде ENP, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, и к применению агониста ERBB3 и/или агониста ERBB4 для наращивания культуры ENP.

[0092]

[Энтеральные нейральные клетки-предшественники]

Способ получения ENP или способ наращивания культуры согласно настоящему изобретению может продуцировать большие количества ENP, которые сохраняют свою способность к дифференцировке в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки (мультипотентность).

[0093]

«ENP, которые сохраняют мультипотентность», могут быть оценены множеством методов. Примеры методов включают, но не ограничиваются ими, способ, вызывающий дифференцировку ENP, которые подлежат оценке, в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки. При условии, что ENP, которые подлежат оценке, могут быть действительно дифференцированы в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки, оцениваемые ENP могут быть определены как «ENP, которые сохраняют мультипотентность».

Другой пример метода включает способ измерения экспрессии маркерного белка или гена. При условии, что факторы транскрипции SOX10 и PNOX2B экспрессируются в оцениваемых ENP, оцениваемые ENP могут быть определены как «ENP, которые сохраняют мультипотентность».

[0094]

SOX10 и PNOX2B могут быть детектированы с помощью иммунологического анализа, например, ИФА, иммуноокрашивания или проточной цитометрии с использованием антитела, специфического для маркерного белка. Маркерный ген может быть обнаружен с помощью метода амплификации и/или детектирования нуклеиновой кислоты, известного в данной области, например, RT-PCR, микроэрея или биочипа. Когда клетки содержат 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)) в 3'-области генов SOX10 и PNOX2B и экспрессируют репортерный белок или его слитый белок SOX10 и т. д. под контролем промотора SOX10 или тому подобного, может быть использован метод обнаружения репортерного белка (например, измерение интенсивности флуоресценции).

[0095]

[Клеточные лекарственные средства и замороженные продукты]

ENP, полученные способом получения или способом наращивания культуры согласно настоящему изобретению, можно применять к клеточному лекарственному средству для предотвращения или лечения заболевания, вызванного дефицитом или аномалией в энтеральных нервных клетках. Примеры такого заболевания включают болезнь Гиршпрунга, ахалазию пищевода, гастропарез, врожденный гипертрофический пилорический стеноз, хроническую идиопатическую кишечную псевдообструкцию, невропатический запор и болезнь Шагаса.

[0096]

ENP, содержащиеся в клеточном лекарственном средстве, могут быть, например, клетками, выделенными путем отделения клеток во время культивирования, или могут быть клетками, замороженными в растворе для криоконсервации. Клетки из одной партии, полученные с помощью наращивания культуры, предпочтительно криоконсервировать небольшими порциями и использовать, например, потому, что аналогичные рабочие эффекты стабильно достигаются и потому что они чрезвычайно удобны в обращении.

[0097]

Клеточное лекарственное средство может содержать другие компоненты, такие как фармацевтически приемлемый носитель или добавку, подходящие для цели, или форму в соответствии с обычным методом. Примеры носителя или добавки включают тонизирующие агенты, загустители, сахара, сахарные спирты, антисептики (консерванты), гермициды или противомикробные агенты, регуляторы pH, стабилизаторы, хелатирующие агенты, масляные основы, гелевые основы, поверхностно-активные вещества, суспендирующие агенты, флюидизаторы, диспергаторы, буферы и антиоксиданты.

[0098]

Клеточное лекарственное средство обеспечивает способ лечения заболевания, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества клеточного лекарственного средства.

Терапевтически эффективное количество - это количество ENP, которое может оказывать терапевтический эффект на заболевание при введении ENP пациенту по сравнению с контролем без введения. В частности, терапевтически эффективное количество может быть соответствующим образом установлено в зависимости от лекарственной формы ENP, способа введения, цели применения и возраста, массы тела, симптомов пациента и т. д. Эффективное количество на курс лечения для человека (например, взрослого человека) составляет, например, от 200000 до 100000000 клеток/кг массы тела. Эти клетки могут быть сосредоточены в состоянии отдельных клеток, могут представлять собой клеточную массу (сферу), в которой собрано множество клеток, или могут быть их смесью.

[0099]

Примеры способа введения клеточного лекарственного средства включают внутрибрюшинную инъекцию, подкожную инъекцию, инъекцию в лимфатический узел, внутривенную инъекцию, интраторакальную инъекцию, прямую инъекцию местно в орган желудочно-кишечного тракта (например, пищевод, желудок, двенадцатиперстную кишку, малый кишечник, тощую кишку, подвздошную, толстую и прямую кишку) путем вскрытия брюшной полости и введения в ректальную полость.

[0100]

Настоящее изобретение также относится к замороженному продукту, содержащему ENP, полученные способом получения или способом наращивания культуры, упомянутым выше.

[0101]

Замороженный продукт может быть получен путем отделения полученных ENP от среды центрифугированием и суспендирования ENP в растворе для криоконсервации для замораживания. В качестве раствора для криоконсервации можно использовать обычный реагент для криоконсервации клеток. Например, коммерчески доступны Cryostem Freezing Medium (торговое название) и Stemcell Banker GMP Grade (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.).

[0102]

Замороженный продукт можно использовать в качестве исходного материала для индукции дифференцировки ENP для получения энтеральных нервных клеток и глиальных клеток. Кроме того, замороженный продукт можно использовать для приготовления моделей ткани, содержащих ENP в качестве составной части.

[0103]

[Индукция энтеральных нейральных клеток-предшественников в энтеральные нервные клетки или глиальные клетки]

Полученные ENP и нервные клетки и глиальные клетки, полученные путем их дифференцировки с помощью известного подхода, описанного в литературе, могут быть полезны в качестве клеточного препарата для регенеративной медицины, а также могут быть подходящим образом использованы при создании различных систем скрининга.

[0104]

Для индукции ENP в энтеральные нервные клетки см., например, непатентную литературу 2. Кроме того, общеизвестный подход (например, «A novel bidirectional interaction between endothelin-3 and retinoic acid in rat enteric nervous system precursors», Gisser, JM et al., PLoSOne 2013) может быть применен для индукции ENP в глиальных клетки.

[0105]

[Способ получения кишечного органоида или искусственного кишечного тракта]

Способ получения кишечного органоида согласно настоящему изобретению включает стадию совместного культивирования ENP и клеток задней кишки.

[0106]

ENP могут быть получены с помощью метода получения ENP или метода наращивания культуры, упомянутого выше.

[0107]

Клетки задней кишки можно получить путем дифференцировки стволовых клеток в соответствии с общеизвестным подходом. Примерный подход включает культивирование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в среде, содержащей активин А, BMP4 и bFGF, для получения дефинитивной энтодермы, и культивирование дефинитивной энтодермы в среде, содержащей FGF4 и ингибитор GSK3 β , для получения клеток задней кишки.

Вышеупомянутая базальная среда также может быть использована в качестве

базальной среды для индукции дефинитивной энтодермы и для индукции клеток задней кишки.

Концентрация активина А в среде для индукции дефинитивной энтодермы может составлять, например, от 10 до 1000 нг/мл, предпочтительно от 50 до 500 нг/мл, более предпочтительно примерно 100 нг/мл. Концентрация BMP4 в среде может составлять, например, от 1 до 100 нг/мл, предпочтительно от 5 до 50 нг/мл, более предпочтительно примерно 10 нг/мл. Концентрация bFGF в среде может составлять, например, от 1 до 200 нг/мл, предпочтительно от 5 до 100 нг/мл, более предпочтительно примерно 20 нг/мл. Период культивирования может составлять, например, от 1 до 10 дней, предпочтительно от 2 до 6 дней, более предпочтительно примерно 4 дней.

Концентрация FGF4 в среде для индукции клеток задней кишки может составлять, например, от 10 до 1000 нг/мл, предпочтительно от 50 до 500 нг/мл, более предпочтительно примерно 100 нг/мл. В случае использования, например, CHIR99021, концентрация ингибитора GSK3 β в среде может составлять, например, от 1 до 30 мкМ, предпочтительно от 4 до 10 мкМ, более предпочтительно примерно 6 мкМ. Период культивирования может составлять до например, от 4 до 12 дней, предпочтительно от 6 до 10 дней, более предпочтительно примерно 8 дней.

[0108]

Традиционно известный подход получения кишечного органоида путем совместного культивирования NCC и клеток задней кишки может быть соответствующим образом модифицирован и применен к совместному культивированию ENP и клеток задней кишки.

Иллюстративный подход включает инокуляцию клеток задней кишки и ENP, суспендированных в растворе Матригеля, на планшет для гелеобразования и добавление к нему среды, содержащей R-спондин-1, ноггин, Wnt3a, EGF, простагландин-E2 и ингибитор ROCK, с последующим культивированием. Кишечный органоид, полученный при совместном культивировании, можно ресуспендировать в растворе матригеля, а затем, при необходимости, повторно использовать аналогичный подход.

Другой иллюстративный подход включает инокуляцию клеток задней кишки, суспендированных в растворе матригеля, на планшет для гелеобразования, добавление к нему среды, содержащей R-спондин-1, ноггин, Wnt3a, EGF, простагландин-E2 и ингибитор ROCK, с последующим культивированием для получения кишечного органоид, затем временное диспергирование кишечного органоида, смешивание дисперсии с клеточной суспензией ENP, центрифугирование смешанного раствора и культивирование полученных клеточных осадков в среде, содержащей R-спондин-1, ноггин, Wnt3a, EGF, простагландин-E2 и ингибитор РОК. В этом случае также при необходимости может созревать кишечный органоид, полученный путем совместного культивирования.

Упомянутая выше базальная среда также может использоваться в качестве базальной среды для совместного культивирования ENP и клеток задней кишки.

Концентрация R-спондина-1 в среде может составлять, например, от 100 до 10000

нг/мл, предпочтительно от 500 до 5000 нг/мл, более предпочтительно примерно 1000 нг/мл.

Концентрация ноггина в среде может составлять, например, от 10 до 1000 нг/мл, предпочтительно от 50 до 500 нг/мл, более предпочтительно примерно 100 нг/мл.

Концентрация Wnt3a в среде может составлять, например, от 10 до 1000 нг/мл, предпочтительно от 50 до 500 нг/мл, более предпочтительно примерно 100 нг/мл.

Концентрация EGF в среде может составлять, например, от 10 до 1000 нг/мл, предпочтительно от 50 до 500 нг/мл, более предпочтительно примерно 100 нг/мл.

Концентрация простагландина-E2 в среде может составлять, например, от 0,5 до 10 мкМ, предпочтительно от 1 до 5 мкМ, более предпочтительно примерно 2,5 мкМ.

В случае использования, например, Y27632, концентрация ингибитора ROCK может составлять от 1 до 100 мкМ, предпочтительно от 5 до 50 мкМ, более предпочтительно примерно 10 мкМ.

Период культивирования может составлять, например, от 15 до 40 дней, предпочтительно от 20 до 30 дней, более предпочтительно от 24 до 25 дней.

[0109]

Способ изготовления искусственного кишечного тракта согласно настоящему изобретению включает стадию трансплантации кишечного органоида, полученного таким образом, в живой организм с образованием искусственного кишечного тракта.

[0110]

Трансплантация в живой организм конкретно ничем не ограничивается и может выполняться, например, центрифугированием дисперсии кишечного органоида, прикреплением полученных осажденных клеток к подходящему материалу каркаса и имплантацией каркаса на жир кишечной мембраны. Могут использоваться различные коммерчески доступные материалы для каркасов. Например, можно использовать подложку Neoveil Sheet (Gunze Ltd.) или поли-L-лактид (DURECT Corp.).

Животным-реципиентом может быть не относящееся к человеку млекопитающее, такое как мышь, крыса, кролик, собака, свинья, крупный рогатый скот, лошадь и обезьяна, или человек. Предпочтительно выбирают млекопитающее, не являющееся человеком. Также предпочтительно использовать животное с иммунодефицитом.

[0111]

Трансплантированный таким образом кишечный органоид дифференцируется и созревает в живом организме, образуя искусственный кишечный тракт. Период, необходимый для дифференцировки и созревания, может различаться в зависимости от количества клеток для трансплантации, используемого материала каркаса, животного-реципиента и участка и составляет, например, 5 недель или дольше, предпочтительно 10 недель или дольше, более предпочтительно примерно от 13 до 20 недель.

Полученный искусственный кишечный тракт содержит нервные клетки и глиальные клетки, полученные из ENP, и может проявлять сократительную и релаксантную реакцию на электрическую стимуляцию.

Нервные клетки в искусственном кишечном тракте выполняют функции сокращения мышц, производя ацетилхолин и адреналин, расслабления мышц путем производства монооксида азота и расслабления мышц в ответ на электрическую стимуляцию.

[Примеры]

[0112]

[Тестовый пример 1: Поддерживающая культура iPSC человека]

Используемые iPSC человека представляли собой линию 1231A3 (см. Scientific Reports, 2014, 4, 3594).

iPSC культивировали поддерживающим образом с использованием планшета, покрытого iMatrix 511 Silk (Nippi Inc.), без использования фидерных клеток. Культивирование проводили при 37°C и 5% CO₂. Среда, используемая для поддерживающей культуры, представляла собой смесь растворов A, B и C StemFit AK03N (Ajinomoto Healthy Supply Co., Inc.).

Среду меняли каждый день, а клетки пассировали каждые 6-7 дней. Пассажи выполняли путем приготовления iPSC в виде отдельных клеток с использованием TrypLE Select CTS (Life Technologies Corp.), разбавленной в 2 раза фосфатно-солевым буфером (в дальнейшем именуемым «PBS») с добавлением 0,5 мМ EDTA, открепляя клетки от планшета, а затем путем инокуляции открепленных iPSC на свежий планшет, покрытый iMatrix 511 Silk. Среда, используемая для инокуляции, представляла собой смесь растворов A, B и C StemFit AK03N с добавлением 10 мкМ Y27632 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.).

[0113]

[Тестовый Пример 2: Создание репортерной линии iPSC человека SOX10::tdTomato-PHOX2B::emGFP]

iPSC человека, полученные в виде отдельных клеток, котрансфицировали плазмидой экспрессии никазы SpCas9 D10A, плазмидой экспрессии sgRNA SOX10, донорной плазмидой SOX10-F2A-tdTomato и плазмидой экспрессии гена устойчивости к пурамицину (FUJIFILM Wako Pure Chemical Transfection) с использованием системы трансфекции Neon (Life Technologies Corp.).

Полученные клетки были подвергнуты селекции по лекарственному средству путем обработки пурамицином, затем сбора колоний и путем наращивания культуры. Среди полученных колоний в качестве линии SOX10::tdTomato использовали колонию, в которой с помощью ПЦР была подтверждена вставка представляющей интерес последовательности.

[0114]

iPSC человека (линия SOX10::tdTomato), полученные в виде отдельных клеток, дополнительно котрансфицировали белком никазы SpCas9 D10A, гРНК PHOX2B (Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT)), донорной плазмиды PHOX2B-F2A-emGFP и плазмиды экспрессии гена устойчивости к пурамицину (FUJIFILM Wako Pure Chemical

Corp.) с использованием системы трансфекции Neon (Life Technologies Corp.).

Полученные клетки были подвергнуты селекции по лекарственному средству путем обработки пуромицином, затем сбора колоний и путем наращивания культуры. Среди полученных колоний в качестве линии SOX10::tdTomato-PHOX2B::emGFP использовали колонию, в которой с помощью ПЦР была подтверждена вставка интересующей последовательности.

[0115]

[Тестовый Пример 3: Дифференцировка iPSC человека в клетки вагального нервного гребня]

(1) Прекультура iPSC

iPSC человека (линия SOX10::tdTomato-PHOX2B::emGFP), культивировали в виде поддерживающей культуры методом, описанным в тестовом примере 1, высевали с плотностью от 2 до 4×10^4 или от 2,4 до $4,9 \times 10^5$ клеток /на лунку или чашку, соответственно, в 6-луночный планшет или 10-см чашку, покрытую iMatrix 511 Silk, и культивировали при 37°C в течение 3-4 дней в атмосфере 5% CO₂ (прекультура). Культуральный раствор, используемый для инокуляции, представлял собой смесь растворов А, В и С StemFit AK03N с добавлением 10 мкМ Y27632 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.).

[0116]

(2) Дифференцировка iPSC в клетки вагального нервного гребня

После предварительного культивирования среду заменяли средой, содержащей 10 мкМ SB431542 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) и 1 мкМ CHIR99021 (Axon MedChem) (0 дней культивирования), и клетки культивировали при 37°C в течение 6 дней при 5% CO₂. Затем среду заменяли средой, дополнительно содержащей 1 мкМ ретиноевую кислоту (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), и клетки культивировали при 37°C в течение 5 дней в атмосфере 5% CO₂ (всего 11 дней). Используемая среда представляла собой смесь растворов А и В StemFit AK03N. В течение этих периодов культивирования среду заменяли каждый день.

[0117]

Клетки вагального нервного гребня получали через 11 дней культивирования.

Клетки краниального нервного гребня были индуцированы культивированием iPSC в тех же условиях, что и выше, за исключением того, что не добавляли ретиноевую кислоту.

Чтобы изучить экспрессию маркеров дифференцировки клеток вагального нервного гребня, клетки на 11-й день культивирования были выделены, и фракция тотальной РНК была очищена с использованием RNeasy (Qiagen N.V.). кДНК синтезировали с использованием набора реагентов Prime Script RT (Takara Bio Inc.). Затем была проведена количественная ОТ-ПЦР для измерения уровней экспрессии маркеров клеток вагального нервного гребня SOX10 и рецептора эндотелина типа В (EDNRB) и генов NOXB2, NOXB3, NOXB4, NOXB5, NOXB7 и NOXB9 среди группы генов NOX,

определяющих позиционную информацию о переднезадней оси. Уровни экспрессии генов определяли как отношения к уровню экспрессии внутреннего контроля GAPDH.

Уровень экспрессии каждого гена показан на Фигуре 2. На чертеже по оси ординат показано кратное изменение (значения отношения, указанные в \log_2 , с уровнями экспрессии в клетках краниального нервного гребня, определенными как 1). SOX10, EDNRB, HOXB2, HOXB3, HOXB4, HOXB5 и HOXB7 экспрессировались, тогда как HOXB9 не экспрессировался. Таким образом, можно было подтвердить дифференцировку в клетки вагального нервного гребня.

[0118]

[Тестовый Пример 4: Дифференцировка клеток вагального нервного гребня в энтеральные нейральные клетки-предшественники и наращивание культуры]

Клетки (клетки вагального нервного гребня) на 11-й день культивирования, полученные способом из тестового примера 3, диссоциировали ферментативной обработкой и выделяли. Ферментативную обработку проводили следующим образом.

Среду аспирировали и заменяли PBS. Затем клетки открепляли с помощью скребка для клеток. Открепленную клеточную массу диссоциировали пипетированием в Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc.). Затем к ним добавляли буфер MACS (MiltenyiBiotec), и клетки готовили в виде отдельных клеток с помощью 40 мкм клеточного фильтра. Полученную суспензию клеток центрифугировали при 300xg в течение 3 минут. Затем супернатант удаляли и клетки суспендировали в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников. Используемая среда энтеральных нейральных клеток-предшественников представляла собой смесь растворов А и В StemFit AK03N, содержащих 10 мкМ SB431542 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 1 мкМ CHIR99021 (Axon MedChem), 1 мкМ ретиноевую кислоту (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 100 нг/мл нейрегулина 1 (NRG1) (PeproTech, Inc.) и 50 мг/мл нейротрофического фактора глиальных клеток (GDNF) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.). Для прикрепленной культуры к суспензии клеток добавляли 2% Матригель (Corning Inc.), которую затем культивировали с использованием многолуночного планшета (Corning Inc.). Для суспензионной культуры использовали многолуночный планшет (Corning Inc.), обработанный для снижения адгезии клеток. Культивирование в обоих случаях проводили при 37°C и 5% CO₂.

[0119]

Ниже будет приведен метод пассажа прикрепленной культуры.

Среду аспирировали и заменяли PBS. Затем аспирировали PBS. TrypLE Select CTS (Life Technologies Corp.) добавляли к клеткам, которые затем оставляли стоять при 37°C в течение 10 минут. Затем TrypLE Select CTS аспирировали. К клеткам добавляли среду энтеральных нейральных клеток-предшественников, которые затем диссоциировали с помощью пипетки.

Диссоциированные таким образом клетки высевали с плотностью от 2 до 10×10^4 клеток/см². К засеянными таким образом клеткам добавляли матригель в количестве 2%

(мас./об.).

Полученные клетки пассировали один раз в 1-2 недели. Для каждого пассажа подсчитывали накопленное количество клеток, количество живых клеток и количество мертвых клеток, используя автоматический счетчик клеток. Накопленное количество клеток рассчитывали на основе количества живых клеток, засеянных для каждого пассажа, и количества живых клеток, полученных при следующем пассаже.

Зависимое от времени изменение количества накопленных клеток показано на Фигуре 3. Клетки были способны к пассированию по меньшей мере 7 раз и демонстрировали линейную пролиферацию клеток.

[0120]

[Тестовый Пример 5: Анализ проточной цитометрии энтеральных нейральных клеток-предшественников]

Экспрессию SOX10-tdTomato и PHOX2B-emGFP в клетках, культивируемых в тестовом примере 4, анализировали для каждого пассажа с использованием проточной цитометрии.

Дисперсию клеток, полученную при каждом пассаже, центрифугировали при 300xg в течение 3 минут. После удаления супернатанта клетки суспендировали в HBSS, содержащем DAPI и 1% бычий сывороточный альбумин, и анализировали с использованием FACS Aria Fusion (Becton Dickinson Japan).

Результаты анализа экспрессии SOX10-tdTomato и PHOX2B-emGFP показаны на Фигуре 4. На чертежах P1 - P6 означают количество пассажей (от 1 до 6). Доля энтеральных нейральных клеток-предшественников, коэкспрессирующих SOX10-tdTomato и PHOX2B-emGFP, повышалась с увеличением числа пассажей. Доля энтеральных нейральных клеток-предшественников составляла 80% или более на 5-м или более позднем пассаже.

[0121]

[Тестовый Пример 6: Исследование состава среды энтеральных нейральных клеток-предшественников]

Клетки вагального нервного гребня культивировали в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников в тех же условиях, что и в тестовом примере 4, за исключением того, что NRG1 и/или GDNF не добавляли в среду энтеральных нейральных клеток-предшественников. Клетки наблюдали под флуоресцентным микроскопом (BZ-X700, Keyence Corp.). Кроме того, анализ проточной цитометрии был проведен тем же методом, что и в тестовом примере 5.

Флуоресцентные изображения клеток и результаты анализа экспрессии SOX10-tdTomato и PHOX2B-emGFP показаны на Фигуре 5. В условиях отсутствия NRG1 пролиферация клеток была очень медленной, и количество клеток, необходимое для проведения проточной цитометрии, не было получено. В условиях отсутствия GDNF пролиферация клеток была медленнее, чем в условиях с участием GDNF, хотя были получены энтеральные нейральные клетки-предшественники, коэкспрессирующие

SOX10-tdTomato и PHOX2B-emGFP.

[0122]

[Тестовый Пример 7: Анализ экспрессии генов на энтеральных нейральных клетках-предшественниках]

Тотальную РНК экстрагировали из клеток, полученных пассажами в тестовом примере 4, и подтверждали экспрессию генов маркеров энтеральных нейральных клеток-предшественников SOX10, PHOX2B, HOXB5, EDNRB и протоонкогена *ret* (RET). Анализ экспрессии генов проводился таким же образом, как и вышеупомянутый метод.

Результаты показаны на Фигуре 6. На чертеже по оси ординат показаны уровни экспрессии (отношения к уровню экспрессии эндогенного контрольного GAPDH) или кратное изменение (значения отношения, указанные в \log_2 , с уровнями экспрессии в iPSC, определенными как 1). Клетки, культивированные в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников, экспрессировали SOX10, PHOX2B, HOXB5, EDNRB и RET даже после пассажей.

[0123]

[Тестовый Пример 8: Дифференцировка энтеральных нейральных клеток-предшественников в клетки энтеральной нервной системы]

Энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные таким же способом, как в тестовом примере 4, культивировали в среде для дифференцировки в энтеральный нерв и тем самым позволяли дифференцироваться в энтеральный нерв. Среда, используемая для дифференцировки в энтеральный нерв, представляла собой нейробазальную среду (Life Technologies Corp.) с добавлением B27 (Life Technologies Corp.), добавлением N2 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), L-глутамина (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), пенициллина/стрептомицина (Life Technologies Corp.), 100 мкМ аскорбиновой кислоты (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) и 25 нг/мл GDNF.

[0124]

Клетки через 40 дней культивирования фиксировали при комнатной температуре путем добавления 4% PFA и подвергали флуоресцентному иммуноокрашиванию, чтобы оценить способность к дифференцировке в различные подтипы энтеральных нервов. Клетки последовательно реагировали с антителом против холинацетилтрансферазы (ChAT) (ab224267, Abcam plc), антителом против нейрональной синтазы оксида азота (nNOS) (ab76067, Abcam plc), антителом против гамма-аминомасляной кислоты (GABA) (A2052, Sigma-Aldrich Co. LLC) или антителом против 5-гидрокситриптамина (5-HT) (S5545, Sigma-Aldrich Co. LLC) в качестве первичного антитела, а затем с меченым Alexa 647 вторичным антителом, подходящим для иммунизированного животного первичным антителом в качестве вторичного антитела, а затем наблюдали под флуоресцентным микроскопом.

Изображения флуоресцентного иммуноокрашивания показаны на Фигуре 7. ChAT-, nNOS-, GABA- и 5-HT-положительные нервы были подтверждены и показали наличие холинергических нейронов, тормозных нейронов, GABA-ергических нейронов и

серотонинергических нейронов, соответственно. Таким образом, было показано, что энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные этим методом культивирования, сохраняют способность дифференцироваться в различные подтипы энтеральных нервных клеток.

[0125]

[Тестовый Пример 9: Поддерживающая культура iPSC человека]

Используемые iPSC человека представляли собой линию 253G1 (см. Nature Biotechnology, 2008, 26, (1): 101-106).

iPSC культивировали поддерживающим образом с использованием планшета, покрытого укороченным рекомбинантным белком человека Витронектин (VN-N) (производство Thermo Fisher Scientific, Inc.), без использования фидерных клеток. Культивирование проводили при 37°C и 5% CO₂.

Среда, используемая для поддерживающей культуры, представляла собой смесь базальной среды и дополнения в виде Essential 8 Flex Medium Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Среду заменяли каждый день, а клетки пассировали каждые 6-7 дней.

Пассаж выполняли путем приготовления iPSC в виде отдельных клеток с использованием PBS с добавлением 0,5 mM ЭДТА, открепления клеток от планшета и последующего высевания открепленных iPSC на свежий планшет, покрытый укороченным рекомбинантным белком человека Витронектин (VN-N).

Среда, используемая для инокуляции, представляла собой смесь базальной среды и набора Supplement of Essential 8 Flex Medium, дополненного 10 мкМ Y27632 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.).

[0126]

[Тестовый пример 10: Создание репортерной линии iPSC человека LGR5::emGFP]

iPSC человека, полученные в виде отдельных клеток в тестовом примере 9, котрансфицировали плазмидой экспрессии SpCas9, плазмидой экспрессии sgRNA LGR5 и донорной плазмидой LGR5::emGFP (конструкция, способная к нокину «химерный интрон+emGFP+SV40polyA» на N-конце LGR5) с использованием NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd).

Полученные клетки были подвергнуты селекции по лекарственному средству путем обработки пурамицином, затем сбора колоний и путем наращивания культуры. Среди полученных колоний в качестве линии LGR5::emGFP использовали колонию с подтвержденной моноаллельной вставкой интересующей последовательности с помощью ПЦР.

[0127]

[Тестовый Пример 11: Дифференцировка iPSC человека в кишечный органоид]

(1) Прекультура iPSC

Линию LGR5::emGFP из тестового примера 10 высевали с плотностью 4×10^5 клеток/на лунку на 12-луночный планшет, покрытый Матригелем (Corning Inc.), и культивировали при 37°C в течение 2 дней в атмосфере 5% CO₂ (предварительное

культивирование). Культуральный раствор, используемый для инокуляции, представлял собой смесь базальной среды и дополнения Essential 8 Flex Medium Kit с добавлением 10 мкМ Y27632.

[0128]

(2) Дифференцировка iPSC человека в дефинитивную энтодерму

После предварительного культивирования среду заменяли средой, содержащей 100 нг/мл активина А (PeproTech, Inc.), 10 нг/мл BMP4 (R&D Systems, Inc.), 20 нг/мл bFGF (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) (0 дней культивирования), и клетки культивировали при 37°C в течение 4 дней в атмосфере 5% CO₂. Используемая среда представляла собой смесь RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с добавкой B-27 за вычетом инсулина (Thermo Fisher Scientific, Inc.) и с пенициллин-стрептомицином (Thermo Fisher Scientific, Inc.). В течение этих периодов культивирования среду заменяли каждый день.

Чтобы подтвердить дифференцировку в дефинитивную энтодерму, клетки выделяли через 4 дня после начала культивирования и подтверждали количественной RT-PCR экспрессию маркеров дефинитивной энтодермы SOX17 и FOXA2.

[0129]

(3) Дифференцировка дефинитивной энтодермы в заднюю кишку.

После дифференцировки в дефинитивную энтодерму среду заменяли средой, содержащей 100 нг/мл FGF4 (PeproTech, Inc.) и 6 мкМ CHIR99021 (Axon MedChem) (4 дня культивирования), и клетки культивировали при 37°C в течение 4 дней при 5% CO₂ (всего 8 дней). Используемая среда представляла собой смесь RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с добавкой B-27 без витамина А (Thermo Fisher Scientific, Inc.) и пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Все количество среды заменяли на 4 день культивирования, а половину количества среды заменяли в период от 5 до 7 дней культивирования. Для подтверждения дифференцировки в заднюю кишку клетки извлекали через 8 дней после начала культивирования и подтверждали количественной RT-PCR экспрессию маркера задней кишки CDX2.

[0130]

(4) Дифференцировка в кишечный органоид - 1

Клеточную массу задней кишки, образовавшуюся в каждой лунке, собирали вместе с супернатантом культуры. Суспензию клеток, содержащую энтеральные нейральные клетки-предшественники, приготовленные в тестовом примере 4, добавляли к раствору, содержащему массу клеток задней кишки, и центрифугировали с последующим удалением супернатанта культуры. Клеточную массу задней кишки и энтеральные нейральные клетки-предшественники, ресуспендированные в растворе матригеля, высевали при концентрации 50 мкл/лунку на 24-луночный планшет и культивировали при 37°C в течение 30 минут в атмосфере 5% CO₂ для гелеобразования матригеля. Среда, содержащая 1000 нг/мл R-спондина-1 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 100 нг/мл ноггина (PeproTech, Inc.), 100 нг/мл Wnt3a (R&D Systems, Inc.), 100 нг/мл EGF и 2,5 мкМ простагландин-E2 добавляли к гелю Матригель с последующим культивированием при

37°C в атмосфере 5% CO₂. Используемая среда представляла собой смесь улучшенной DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с добавкой B-27 за вычетом витамина A (Thermo Fisher Scientific, Inc.), добавкой N-2 (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 10 мкМ Y27632, 10 мМ HEPES (Thermo Fisher Scientific, Inc.) и с пенициллином-стрептомицином (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

D-PBS (-) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) 4°C добавляли к матригелю, содержащему кишечный органоид, полученный дифференцировкой клеточной массы задней кишки и энтеральных нейральных клеток-предшественников, культивируемых таким образом в течение примерно 2 недель, для растворения матригеля. Супернатант культуры удаляли центрифугированием. Кишечный органоид, ресуспендированный в растворе матригеля, высевали из расчета 50 мкл/на лунку на 24-луночный планшет и культивировали при 37°C в течение 30 минут в атмосфере 5% CO₂ для гелеобразования матригеля. Среду, содержащую 1000 нг/мл R-спондина-1, 100 нг/мл ноггина, 100 нг/мл Wnt3a, 100 нг/мл EGF, 2,5 мкМ простагландина-E2 и Y27632, добавляли к гелю Матригеля с последующим культивированием при 37°C и при 5% CO₂ (период культивирования кишечных органоидов: всего от 24 до 25 дней).

[0131]

(5) Дифференцировка в кишечный органоид - 2

Клеточную массу задней кишки, образовавшуюся в каждой лунке, собирали вместе с супернатантом культуры. Супернатант культуры удаляли центрифугированием. Клеточную массу, ресуспендированную в растворе матригеля, высевали из расчета 50 мкл/на лунку на 24-луночный планшет и культивировали при 37°C в течение 30 минут в атмосфере 5% CO₂ для гелеобразования матригеля. Среду, содержащую 1000 нг/мл R-спондина-1, 100 нг/мл ноггина, 100 нг/мл Wnt3a, 100 нг/мл EGF и 2,5 мкМ простагландина-E2, добавляли к гелю матригеля с последующим культивированием при 37°C при 5% CO₂. Используемая среда представляла собой смесь улучшенной DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) с добавкой B-27 за вычетом витамина A (Thermo Fisher Scientific, Inc.), добавкой N-2 (Thermo Fisher Scientific, Inc.), 10 мкМ Y27632, 10 мМ HEPES (Thermo Fisher Scientific, Inc.) и с пенициллином-стрептомицином (Thermo Fisher Scientific, Inc.).

D-PBS (-) 4°C добавляли к матригелю, содержащему кишечный органоид, полученный дифференцировкой клеточной массы задней кишки, культивированной таким образом в течение примерно 2 недель, для растворения матригеля. Суспензию клеток, содержащую энтеральные нейральные клетки-предшественники, приготовленные в тестовом примере 4, добавляли к раствору, содержащему кишечный органоид, и центрифугировали с последующим удалением супернатанта культуры. После удаления супернатанта добавляли среду, содержащую 1000 нг/мл R-спондина-1, 100 нг/мл ноггина, 100 нг/мл Wnt3a, 100 нг/мл EGF, 2,5 мкМ простагландина-E2 и 10 мкМ Y27632. к осадку клеток с последующим культивированием при 37°C в течение 2 дней в атмосфере 5% CO₂. Кишечный органоид, ресуспендированный в растворе матригеля, после

культивирования высевали из расчета 50 мкл/на лунку на 24-луночный планшет и культивировали при 37°C в течение 30 минут в атмосфере 5% CO₂ для гелеобразования матригеля. Среду, содержащую 1000 нг/мл R-спондина-1, 100 нг/мл ноггина, 100 нг/мл Wnt3a, 100 нг/мл EGF, 2,5 мкМ простагландина-E2 и Y27632, добавляли к гелю Матригеля с последующим культивированием при 37°C и при 5% CO₂ (период культивирования кишечных органоидов: всего от 24 до 25 дней).

[0132]

[Тестовый Пример 12: Создание искусственного кишечного тракта из кишечного органоида *in vivo*]

(1) Трансплантация кишечного органоида мыши

Матригель, содержащий кишечный органоид, полученный в тестовом примере 11, растворяли путем добавления D-PBS (-) 4°C. Раствор, содержащий кишечный органоид, центрифугировали с последующим удалением супернатанта культуры. После удаления супернатанта культуры к осадку клеток добавляли коллаген I (Corning Inc.). Раствор, содержащий клеточный осадок и коллаген I, добавляли к каркасу, полученному с использованием Neoveil Sheet (Gunze Ltd.) и поли-L-лактида (DURECT Corp.), так что осадок клеток прикреплялся к каркасу.

Брюшную полость 6-недельной мыши с иммунодефицитом (самцы мышей NOG, Центральный институт экспериментальных животных) вскрывали под анестезией изофлураном. Каркас, прикрепленный к клеточному осадку, имплантировали на жир кишечной мембраны, и отверстие зашивали. Мышь выращивали в течение 13 недель после трансплантации.

[0133]

(2) Сбор трансплантированных кишечных органоидов.

Брюшную полость мыши вскрывали под анестезией изофлураном. Искусственный кишечный тракт, сформированный на жире кишечной мембраны, отделяли от жира кишечной мембраны и собирали.

[0134]

(3) Гистологический анализ искусственного кишечника.

Собранный искусственный кишечный тракт фиксировали в 4% параформальдегидном/фосфатно-солевом буфере (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) и подвергали флуоресцентному иммуноокрашиванию. Искусственный кишечный тракт последовательно реагировал с антителом против TUBB3 (Abcam plc), антителом против S100 β (Abcam plc) или антителом против GFAP (Abcam plc) в качестве первичного антитела и, кроме того, с флуоресцентно меченным вторичным антителом, подходящим для животного, иммунизированного первичным антителом, в качестве вторичного антитела, а затем наблюдали под флуоресцентным микроскопом.

Изображения флуоресцентного иммуноокрашивания показаны на Фигурах 8 и 9. Как показано на Фигуре 8, присутствовали PHOX2B-emGFP- и SOX10-td Tomato-положительные клетки (нервные клетки и глиальные клетки), полученные из энтеральных

нейральных клеток-предшественников. Как показано на Фигуре 9, наблюдалось S100 β (A)-, GFAP (B)- или TUBB3 (C)-положительное изображение, идентичное или похожее на PNOX2B-emGFP- или SOX10-td-положительное изображение, что подтверждает, что клетки произошли из энтеральных нейральных клеток-предшественников, дифференцированных в нервные клетки и глиальные клетки. Было показано, что энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные в Примере 4, обладают способностью дифференцироваться в энтеральные нервные клетки и составляют искусственный кишечный тракт.

[0135]

(4) Анализ двигательной функции на искусственном кишечнике.

Собранный искусственный кишечный тракт разрезали на полоски ткани. Один конец полоски подвешивали в камере анализатора ванночки для органов (Panlab, S.L.U.). Другой конец был подсоединен к датчику давления (изготовленному Bio Research Center Co., Ltd.), чтобы можно было количественно контролировать сократительную и релаксантную реакции среза ткани. Камера была заполнена раствором Кребса (NaCl: 120,7 мМ, KCl: 5,9 мМ, NaHCO₃: 15,5 мМ, NaH₂PO₄: 1,2 мМ, MgCl₂: 1,2 мМ, CaCl₂: 2,5 мМ, глюкоза: 11,5 мМ) и 95% O₂ экспонировался в раствор. Срез ткани в камере электрически стимулировали, и измеряли его сократительную и релаксантную реакции.

[0136]

Результаты показаны на Фигурах 10 и 12. Подтверждены сократительные и релаксантные реакции на электрическую стимуляцию (см. Фигуру 10). Сократительная реакция была частично отменена добавлением 1 мкМ ингибитора мускариновых ацетилхолиновых рецепторов моногидрата сульфата атропина (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.), 10 мкМ α -адреноблокирующего препарата феноксбензамина гидрохлорида (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) или 10 мкМ β -адреноблокирующего препарата пропранолола гидрохлорид (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.) (см. Фигуру 11). Это предполагает, что энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные в Примере 4, образуют мышцу, сокращающую нерв, путем продуцирования ацетилхолина и адреналина в искусственном кишечном тракте.

[0137]

С другой стороны, релаксантная реакция, зависящая от электростимуляции, сохранилась. Релаксантная реакция исчезла при добавлении гидрохлорида метилового эфира NG-нитро-L-аргинина ингибитора синтазы монооксида азота (см. Фигуру 11). Это свидетельствует о том, что энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные в Примере 4, формируют мышцы, расслабляющие нервы, путем производства монооксида азота в искусственном кишечном тракте.

[0138]

Отмена сократительной реакции при добавлении 1 мкМ моногидрата сульфата атропина, 10 мкМ гидрохлорида феноксбензамина или 10 мкМ гидрохлорида пропранолола исчезла при добавлении 3 мкМ тетродотоксина (FUJIFILM Wako Pure

Chemical Corp.). Это также свидетельствует о том, что нервные клетки, полученные в результате дифференцировки энтеральных нейральных клеток-предшественников, обладают функцией релаксации мышц в ответ на электрическую стимуляцию.

[0139]

[Тестовый Пример 13: Приготовление замороженной массы культивируемых для наращивания энтеральных нейральных клеток-предшественников и определение характеристик после оттаивания замороженной массы]

Замороженную массу готовили с использованием энтеральных нейральных клеток-предшественников, полученных таким же способом, как в тестовом примере 4. Кроме того, была подтверждена пролиферативная способность и способность к дифференцировке энтеральных нейральных клеток-предшественников после оттаивания замороженной массы.

Клеточную суспензию энтеральных нейральных клеток-предшественников на 76-й день дифференцировки центрифугировали при 300xg в течение 3 минут с последующим удалением супернатанта. Затем клетки суспендировали при концентрации 200000 клеток/200 мкл в Stemcell Banker GMP Grade (Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.) и криоконсервировали при -80 °C.

Замороженную массу размораживали при 37 °C. Клетки суспендировали в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников и затем центрифугировали при 300xg в течение 3 минут с последующим удалением супернатанта. Затем клетки ресуспендировали в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников. Клетки культивировали способом, описанным в тестовом примере 4. Кроме того, пассажи и анализ проточной цитометрии выполняли методами, описанными в тестовых примерах 4 и 5. Кроме того, способность к дифференцировке в энтеральные нервные клетки и глиальные клетки подтверждали способами, описанными в тестовых примерах 8 и 14.

[0140]

Результаты показаны на Фигуре 13. На Фигуре 13 (А) показано изменение количества клеток во время культивирования с наращиванием и изменение соотношения энтеральных нейральных клеток-предшественников ко всем клеткам во время культивирования с наращиванием. На Фигуре 13 (В) показаны результаты анализа экспрессии PNOX2B и SOX10 с помощью проточной цитометрии в энтеральных нейральных клетках-предшественниках (ENP) и в энтеральных нервных клетках (ENS), полученных путем их дифференцировки. На Фигуре 13 (С) показаны изображения флуоресцентного иммуноокрашивания энтеральных нервных клеток и глиальных клеток, полученные путем дифференцировки энтеральных нейральных клеток-предшественников. Было подтверждено, что энтеральные нейральные клетки-предшественники, таким образом замороженные-размороженные, сохраняют отличную пролиферативную способность. Кроме того, было подтверждено, что замороженные-размороженные энтеральные нейральные клетки-предшественники сохраняют способность к дифференцировке в энтеральные нервные клетки (PNOX2B- и периферин-положительные

и SOX10-отрицательные) и глиальные клетки (GFAP-положительные). Энтеральные нервные клетки включали различные подтипы, экспрессирующие nNOS (нейрональная синтаза оксида азота), TH (тирозингидроксилаза), ChAT (холинацетилтрансфераза), GABA (гамма-аминомасляная кислота) или SST (соматостатин).

[0141]

[Тестовый Пример 14: Дифференцировка энтеральных нейральных клеток-предшественников в глиальные клетки]

Дифференцировку в глиальные клетки проводили с использованием энтеральных нейральных клеток-предшественников, полученных таким же образом, как в тестовом примере 4.

В качестве среды для дифференцировки в глиальные клетки использовали набор для созревания астроцитов (STEMCELL Technologies Inc.), дополненный пенициллином-стрептомицином (Life Technologies Corp.).

Клетки на 46 день культивирования фиксировали в забуференном параформальдегидом/фосфатом физиологическом растворе и подвергали флуоресцентному иммуноокрашиванию. Клетки последовательно реагировали с антителом против GFAP (CST # 3670, Cell Signaling Technology, Inc.) в качестве первичного антитела, а затем с флуоресцентно меченым вторичным антителом, подходящим для иммунизированного животного первичного антитела в качестве вторичного антитела, и затем наблюдали под флуоресцентным микроскопом.

Изображение флуоресцентного иммуноокрашивания показано на Фигуре 14. Были подтверждены GFAP-положительные глиальные клетки. Таким образом, было показано, что энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные этим методом культивирования, сохраняют способность к дифференцировке в глиальные клетки.

[0142]

[Тестовый пример 15: Подтверждение выживания трансплантата энтеральных нейральных клеток-предшественников в кишечном тракте мыши с иммунодефицитом]

Выживаемость трансплантата в кишечном тракте мышей с иммунодефицитом подтверждали с использованием энтеральных нейральных клеток-предшественников, полученных таким же способом, как в тестовом примере 4.

[0143]

(1) Подготовка клеточной массы энтеральных нейральных клеток-предшественников к трансплантации.

Энтеральные нейральные клетки-предшественники суспендировали в среде энтеральных нейральных клеток-предшественников, высевали из расчета 320000 клеток на лунку в сферический культуральный планшет (RB500 400 NA 24, Kuragay Co., Ltd.) и культивировали в течение 3 дней для создания клеточной массы (сфера).

[0144]

(2) Трансплантация энтеральных нейральных клеток-предшественников мыши

Полученную клеточную массу (сферу) собирали и трансплантировали в количестве

580 сфер/сайт/мышь на стенки слепой кишки мышей с иммунодефицитом (NOD. CB17-Prkdc <scid>/J, самец, 6 недель, Charles River Laboratories Japan, Inc.), брюшную полость которого вскрыли под анестезией с помощью иглы для шприца (размер 30). Среда, используемая для трансплантации, представляла собой смесь матригеля и среды энтеральных нейральных клеток-предшественников в соотношении 1:1 (об./об.). Через неделю животных умерщвляли, ткани вокруг участков трансплантата собирали и фиксировали в 4% параформальдегидном/фосфатно-солевом буферном растворе.

[0145]

(3) Гистологический анализ образца после трансплантации

Фиксированные образцы подвергали флуоресцентному иммуноокрашиванию. Образцы последовательно реагировали с антителом против TUBB3 (Abcam plc) в качестве первичного антитела, а затем с флуоресцентно меченным вторичным антителом, подходящим для иммунизированного животного первичным антителом в качестве вторичного антитела, а затем наблюдали под флуоресцентным микроскопом.

[0146]

Изображения флуоресцентного иммуноокрашивания показаны на Фигуре 15. PNOX2B-emGFP- и SOX10-tdTomato-положительные клетки (клетки, которые, как считается, находятся в процессе дифференцировки в нервные клетки и глиальные клетки), полученные из энтеральных нейральных клеток-предшественников, присутствовали на участке, соответствующем подслизистому слою мышечного слоя кишечного тракта мыши (а и б). Было подтверждено, что энтеральные нейральные клетки-предшественники трансплантированы в кишечный тракт мыши. Наблюдалось TUBB3-положительное изображение (с), идентичное или похожее на PNOX2B-emGFP- или SOX10-tdTomato-положительное изображение, подтверждающее, что клетки, полученные из энтеральных нейральных клеток-предшественников, находились в процессе дифференцировки в нервные клетки.

[Свободный текст списка последовательностей]

[0147]

SEQ ID NO: 1: полноразмерная аминокислотная последовательность человеческого NRG1.

[Список последовательностей]

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения энтеральных нервных клеток-предшественников, включающий следующие стадии:

(A1) обеспечение энтеральных нервных клеток-предшественников; и

(A2) культивирование энтеральных нервных клеток-предшественников в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

2. Способ получения по п. 1, где среда дополнительно содержит ингибитор TGF β и ингибитор GSK3 β .

3. Способ получения по п.1 или 2, где среда дополнительно содержит ретиноевую кислоту и/или ее производное.

4. Способ получения по любому из пп.1-3, где среда дополнительно содержит GDNF.

5. Способ получения по любому из пп. 1-4, где среда дополнительно содержит матригель.

6. Способ получения по любому из пп. 1-5, где агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4 представляет собой NRG1.

7. Энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные способом по любому из пп. 1-6.

8. Замороженный продукт, содержащий энтеральные нейральные клетки-предшественники по п. 7.

9. Клеточное лекарственное средство, содержащее энтеральные нейральные клетки-предшественники по п.7.

10. Способ получения энтеральных нейральных клеток-предшественников, включающий следующие стадии:

(B1) обеспечение клеток нервного гребня; и

(B2) культивирование клеток нервного гребня в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4, и ретиноевую кислоту и/или ее производное.

11. Способ получения по п.10, где клетки нервного гребня представляют собой клетки вагального нервного гребня.

12. Способ получения по п. 11, где клетки вагального нервного гребня являются SOX10-положительными, NOXB5-положительными, NOXB9-отрицательными и PNOX2B-отрицательными, и энтеральные нейральные клетки-предшественники являются SOX10-положительными и PNOX2B-положительными.

13. Среда энтеральных нейральных клеток-предшественников, содержащая агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.

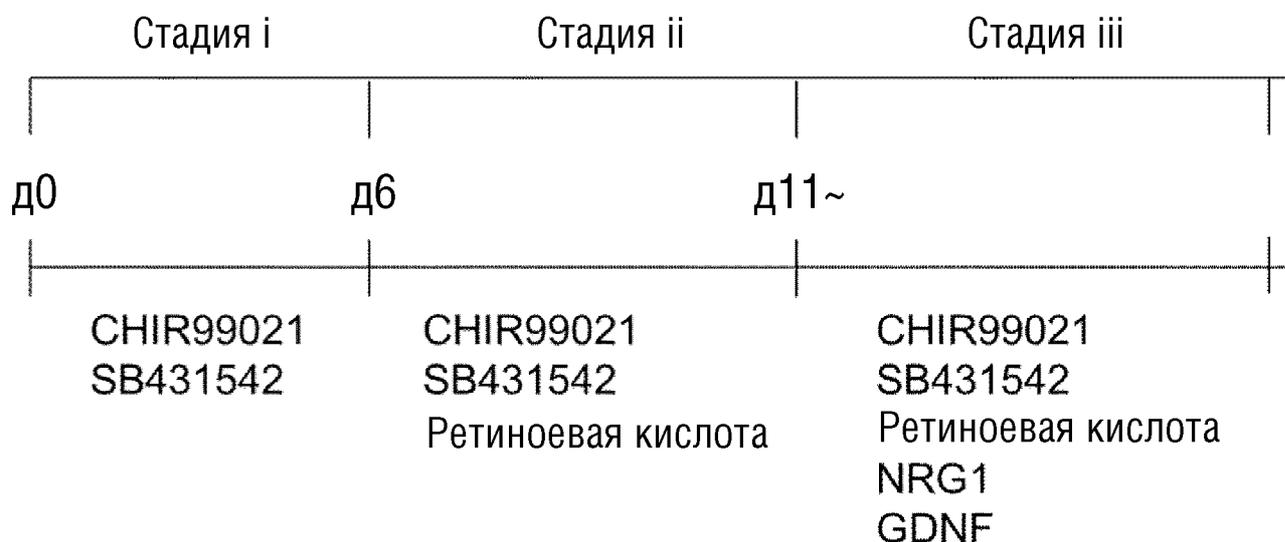
14. Среда по п. 13, дополнительно содержащая ингибитор TGF β и/или ингибитор GSK3 β .

15. Среда по п. 13 или 14, дополнительно содержащая ретиноевую кислоту и/или ее производное.

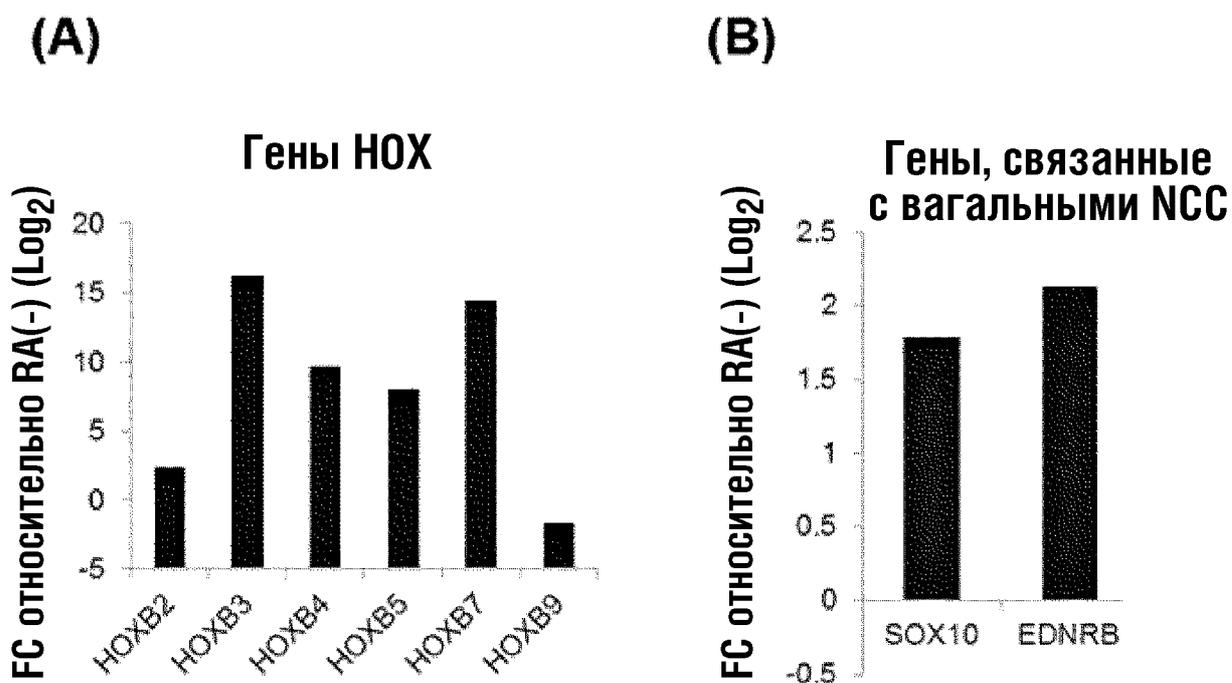
16. Среда по любому из пп. 13-15, дополнительно содержащая GDNF.
17. Среда по любому из пп. 13-16, дополнительно содержащая матригель.
18. Среда по любому из пп. 13-17, где агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4 представляет собой NRG1.
19. Способ наращивания культуры энтеральных нейральных клеток-предшественников, включающий следующие стадии:
 - (C1) обеспечение энтеральных нейральных клеток-предшественников; и
 - (C2) культивирование энтеральных нейральных клеток-предшественников в среде, содержащей агонист ERBB3 и/или агонист ERBB4.
20. Способ получения кишечного органоида, включающий стадию совместного культивирования энтеральных нейральных клеток-предшественников и клеток задней кишки.
21. Способ получения искусственного кишечного тракта, включающий следующие стадии:
 - совместное культивирование энтеральных нейральных клеток-предшественников и клеток задней кишки с получением кишечного органоида; и
 - трансплантация кишечного органоида в живой организм с целью создания искусственного кишечного тракта.
22. Способ получения по п. 20 или 21, где энтеральные нейральные клетки-предшественники представляют собой энтеральные нейральные клетки-предшественники, полученные способом получения по любому из пп. 1-6.

По доверенности

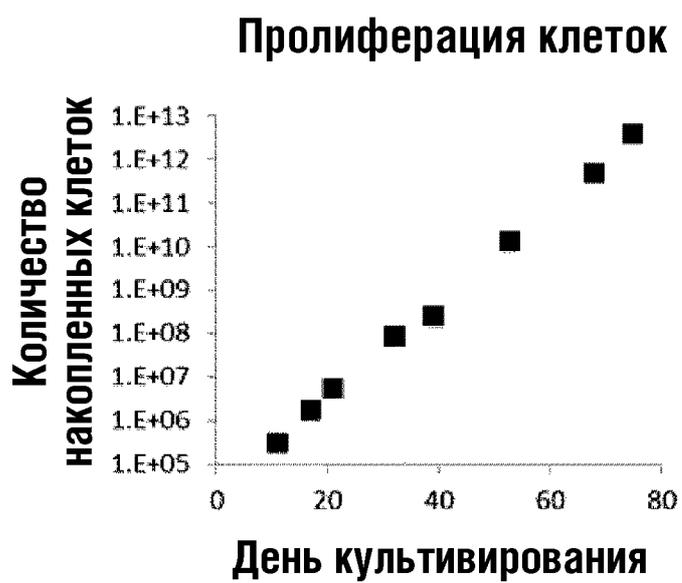
ФИГ.1



ФИГ.2



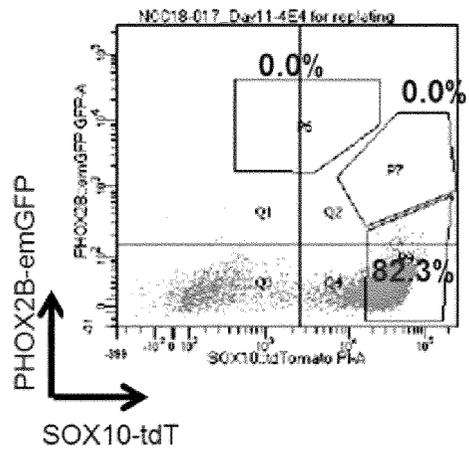
ФИГ.3



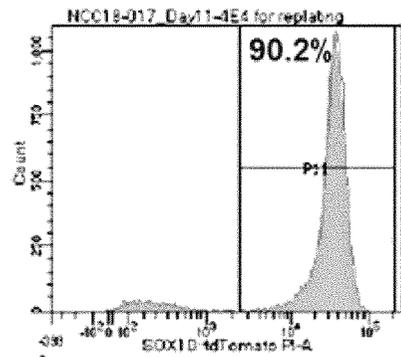
ФИГ.4

(A)

Вагальные NCC

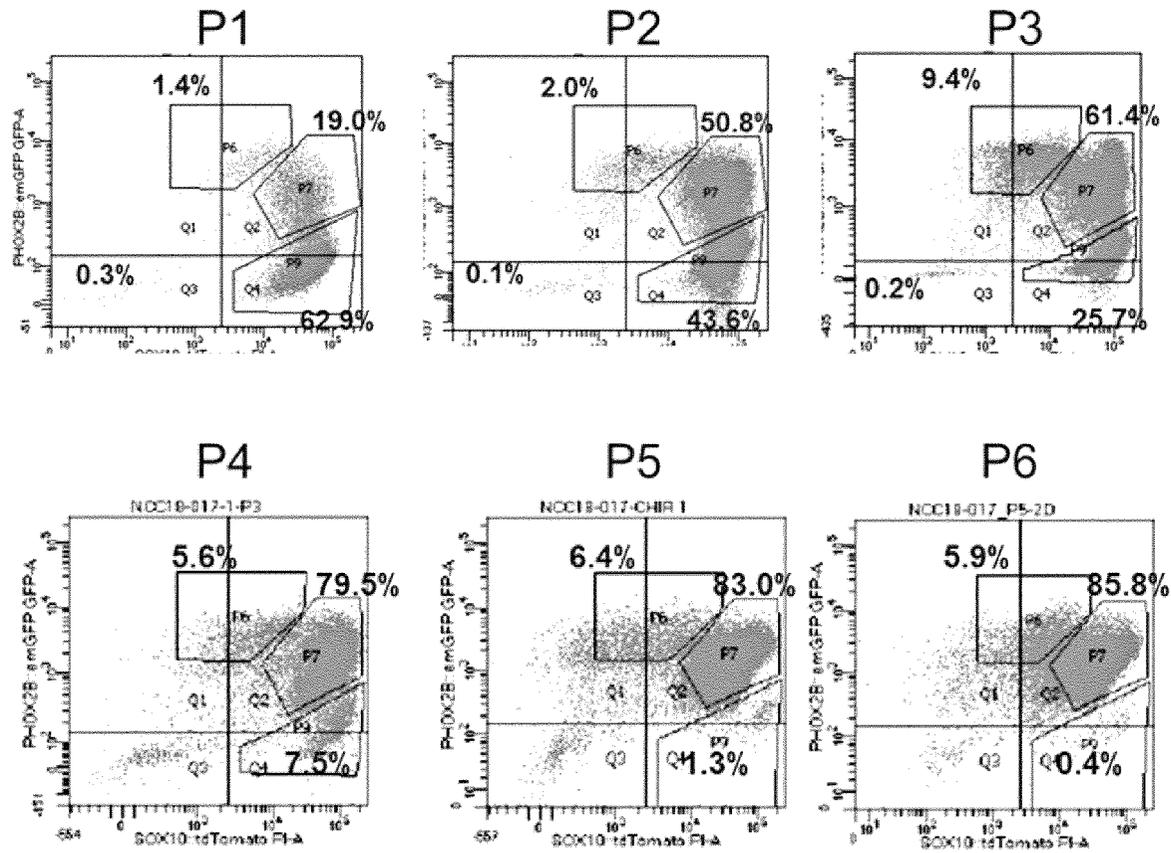


SOX10-tdT

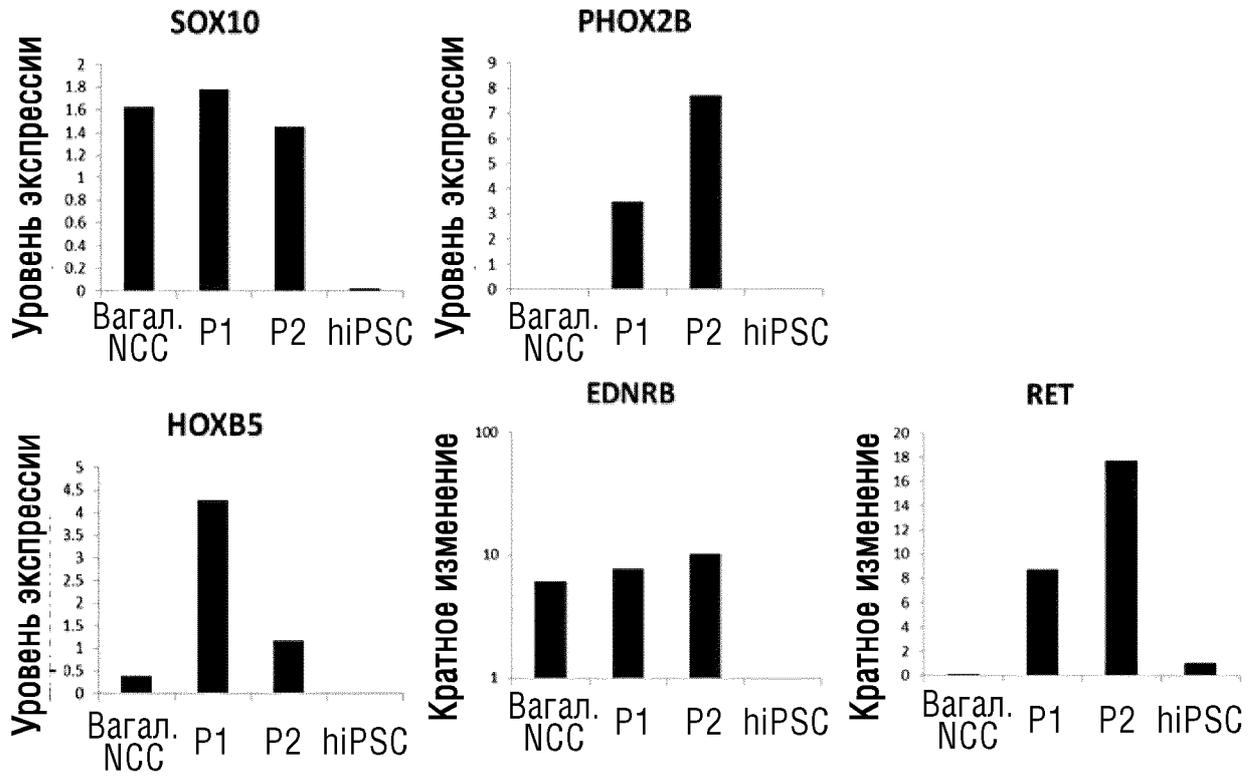


SOX10-tdT

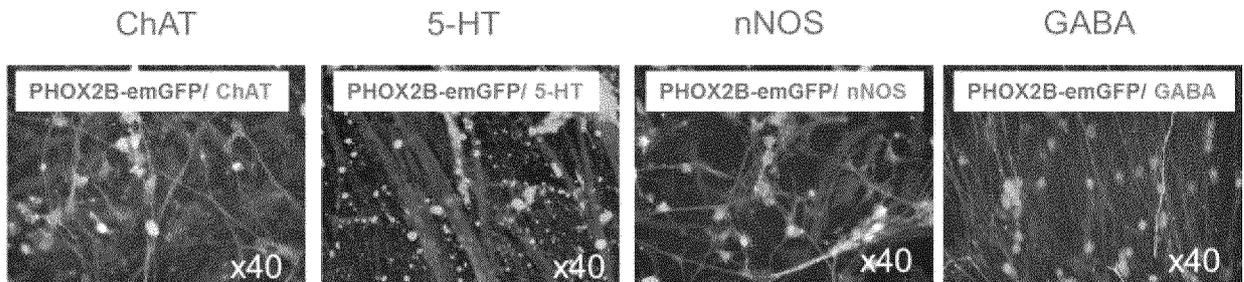
(B)



ФИГ.6

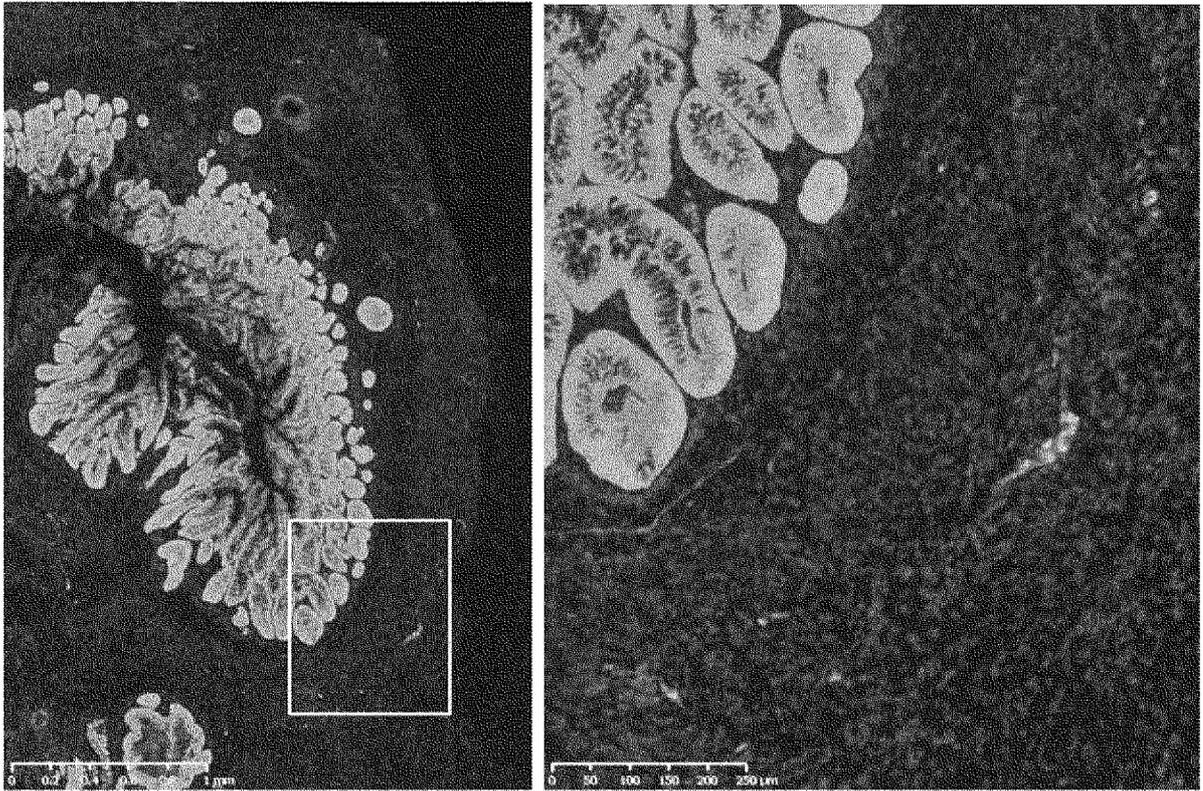


ФИГ.7

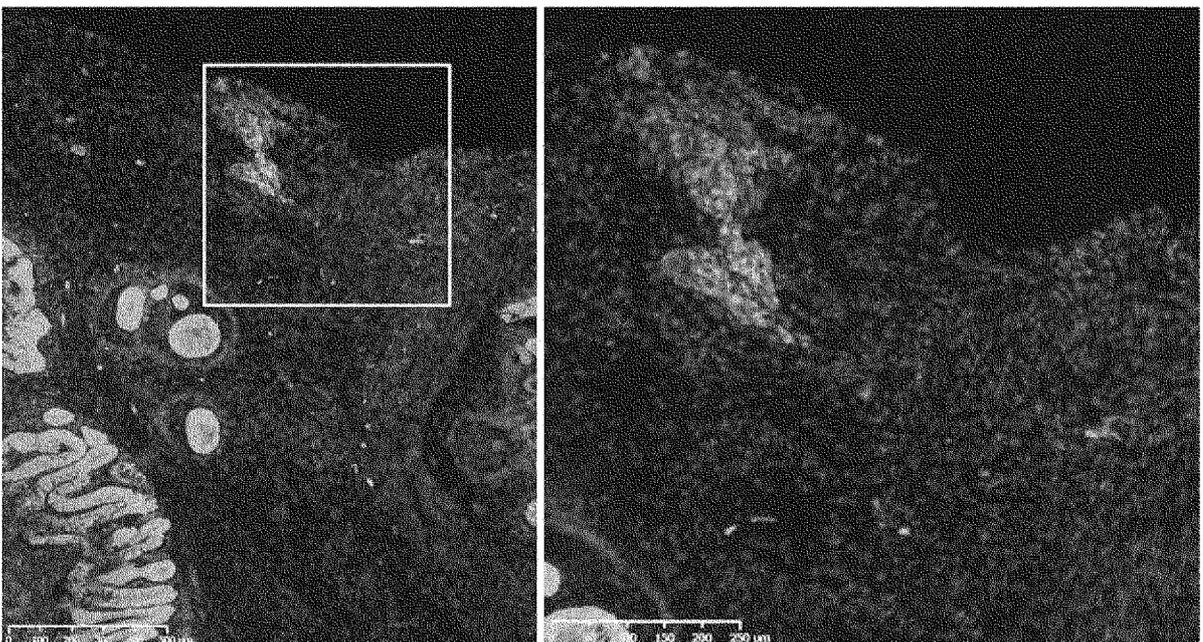


ФИГ.8

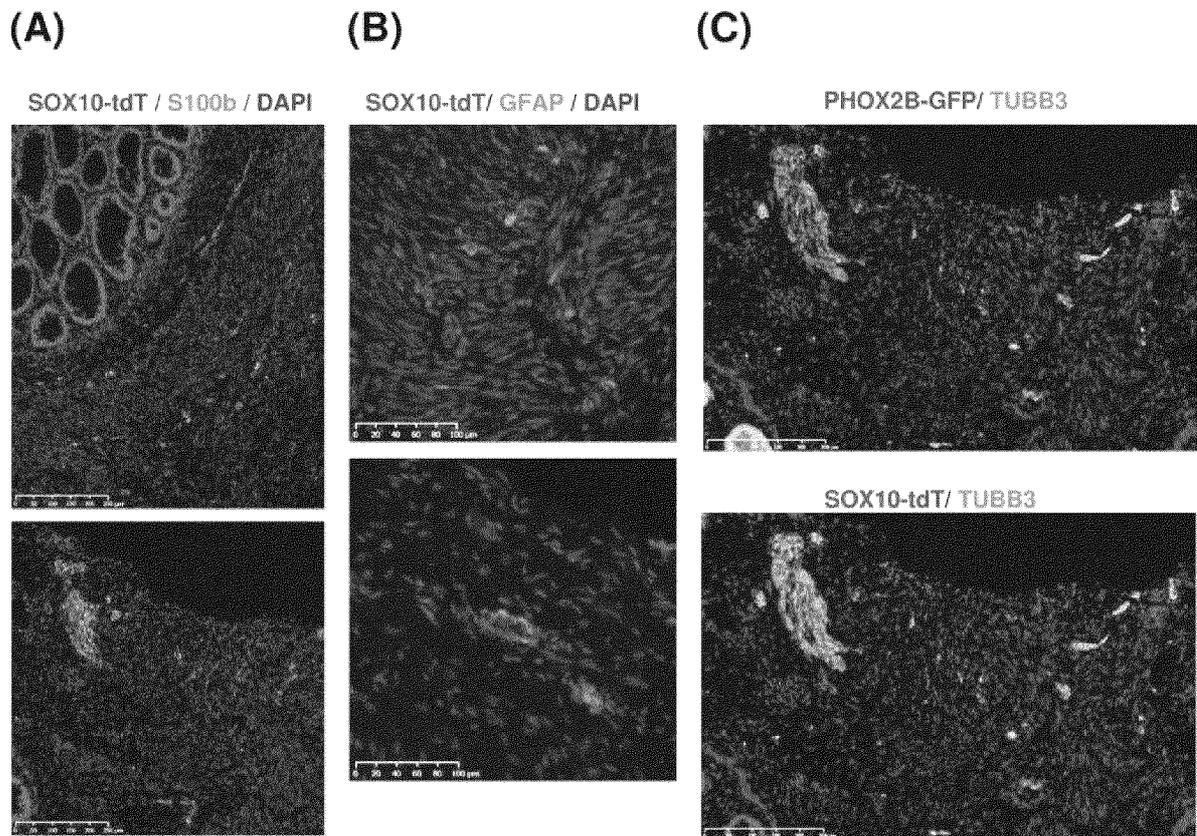
SOX10-tdT/ LGR5-GFP, PHOX2B-GFP/ DAPI



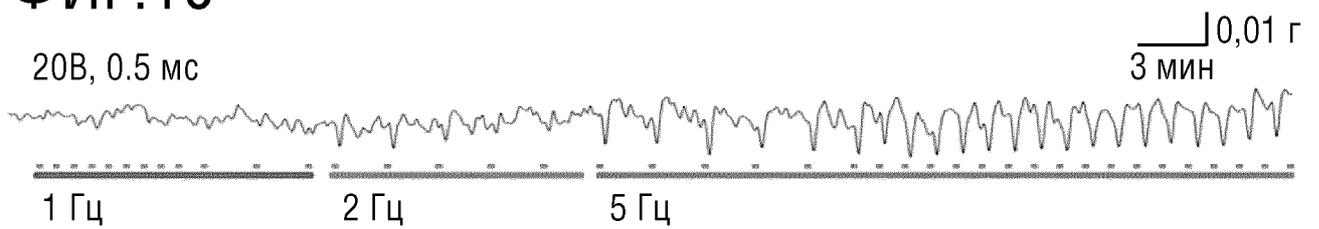
SOX10-tdT/ LGR5-GFP, PHOX2B-GFP/ DAPI



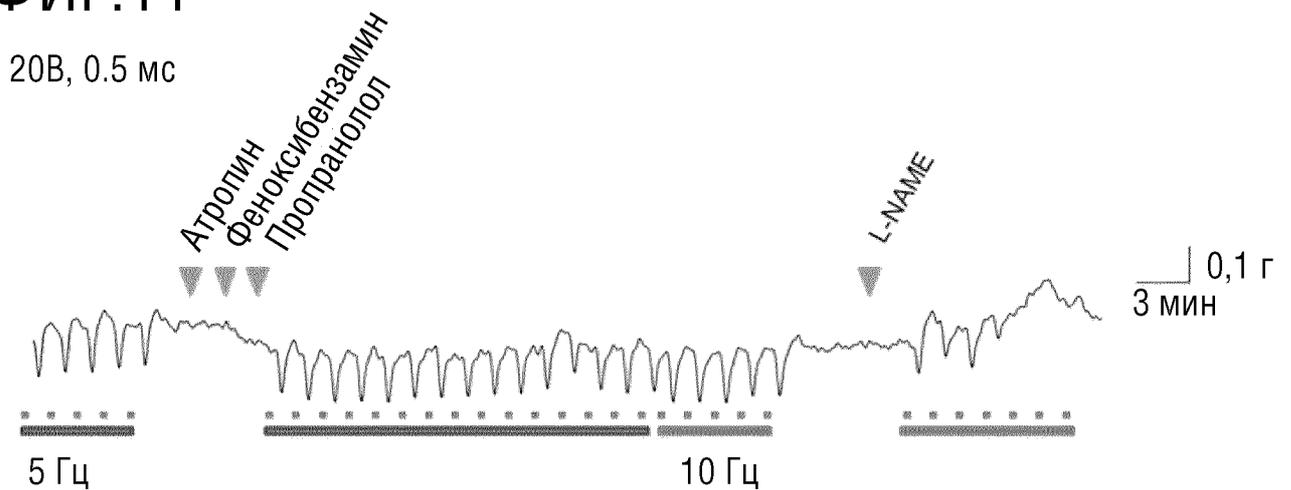
ФИГ.9



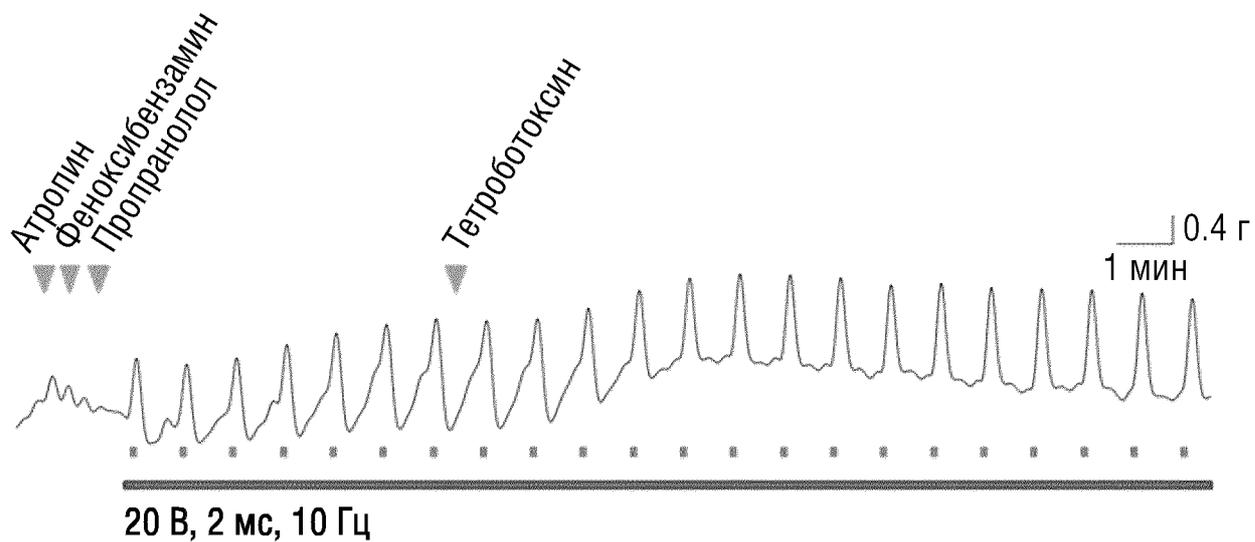
ФИГ.10



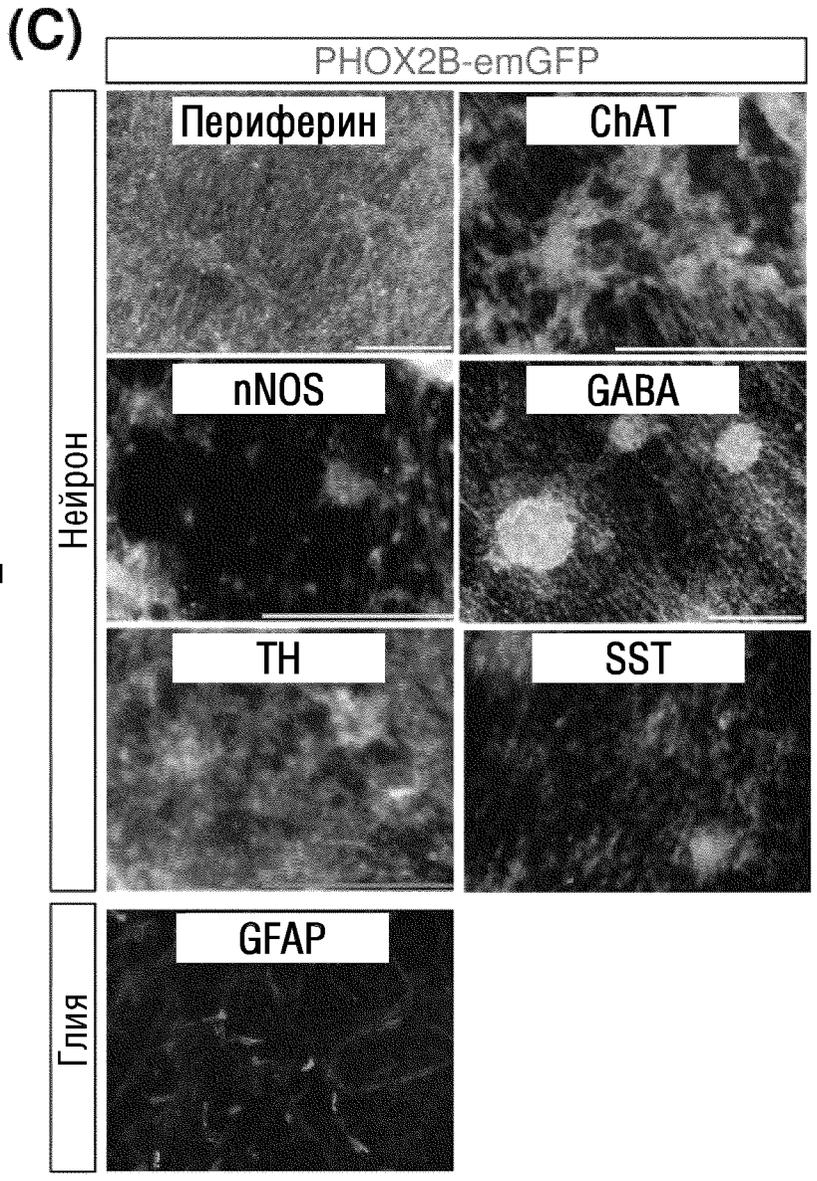
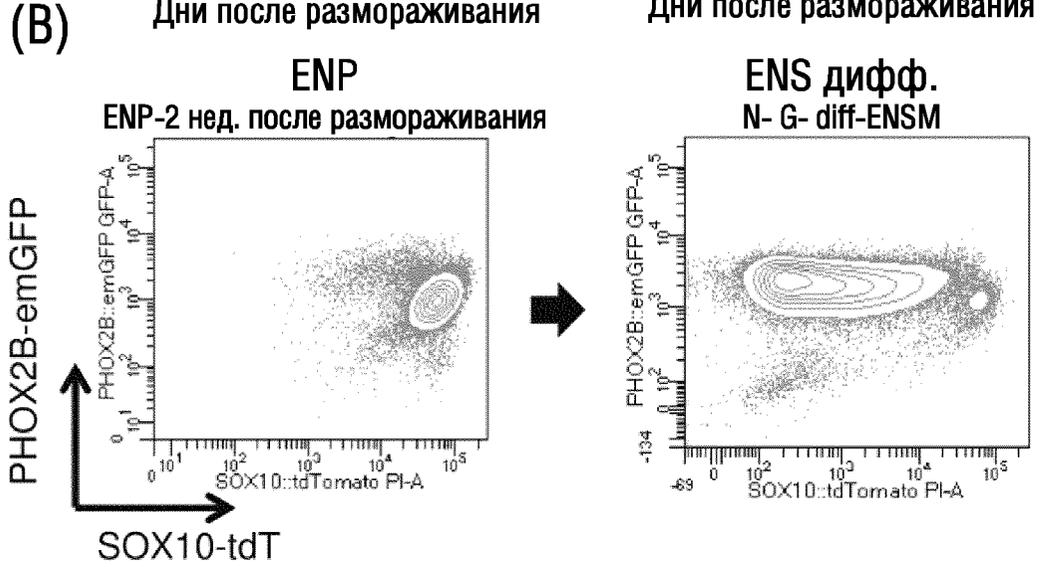
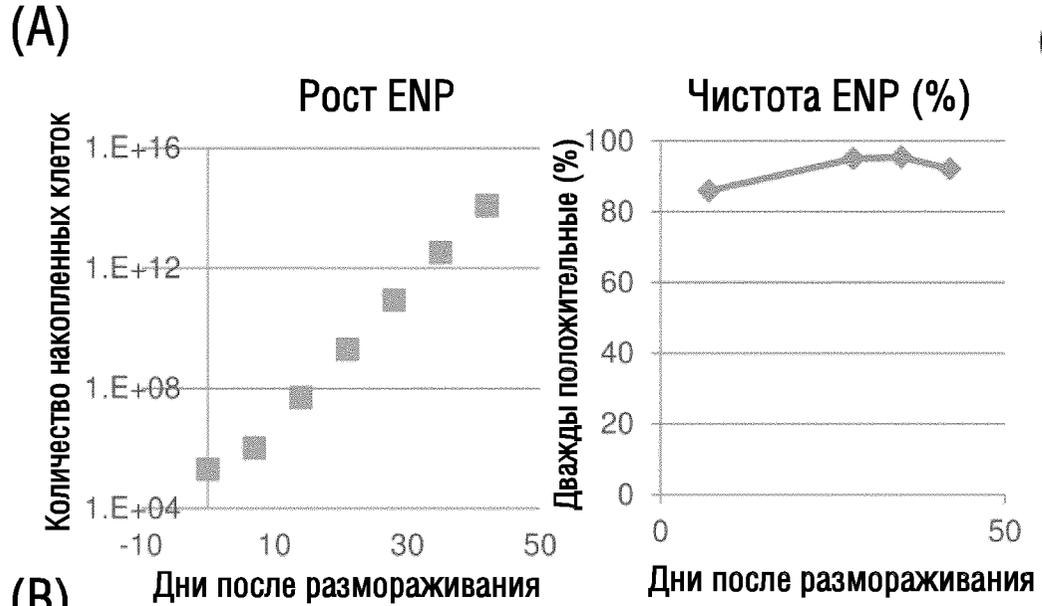
ФИГ.11



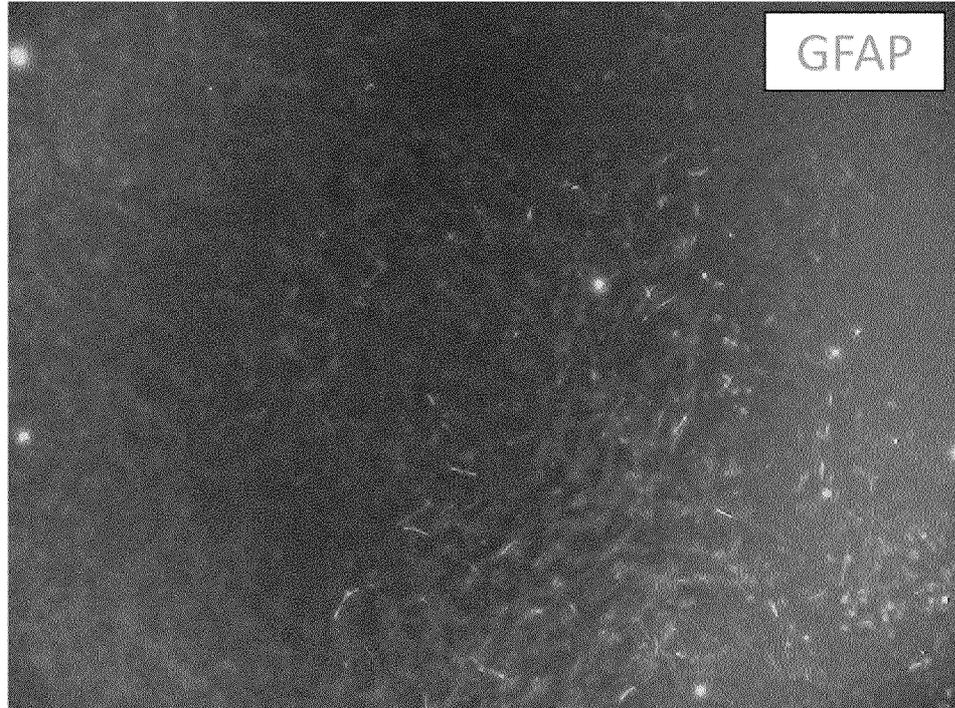
ФИГ.12



ФИГ.13



ФИГ.14



ФИГ.15

