



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.03.05

(21) Номер заявки
201891913

(22) Дата подачи заявки
2017.03.02

(51) Int. Cl. **C12N 5/071** (2010.01)
A61K 35/407 (2015.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(54) УЛУЧШЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ВЗРОСЛОЙ ПЕЧЕНИ

(31) **16158327.3**

(32) **2016.03.02**

(33) **EP**

(43) **2019.02.28**

(86) **PCT/EP2017/054859**

(87) **WO 2017/149059 2017.09.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**УНИВЕРСИТЕ КАТОЛИК ДЕ
ЛУВЭН (BE)**

(72) Изобретатель:
**Ломбар Катрин, Долле Пьерр-Эдуард,
Сокаль Этьенн, Наджими Мустафа
(BE)**

(74) Представитель:
**Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина
Е.М., Глухарёва А.О., Строкова О.В.,
Христофоров А.А. (RU)**

(56) NAJIMI MUSTAPHA ET AL.: "Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes?", CELL TRANSPLANTATION, COGNIZANT COMMUNICATION CORPORATION, US, vol. 16, no. 7, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 717-728, XP008130765, ISSN: 0963-6897, figures 2-4

HODA EL-KEHDY ET AL.: "Hepatocytic Differentiation Potential of Human Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells: In Vitro and In Vivo

Evaluation", STEM CELLS INTERNATIONAL, vol. 2016, 1 January 2016 (2016-01-01), pages 1-12, XP055368389, US ISSN: 1687-966X, DOI: 10.1155/2016/6323486, figure 1

PAN QIUWEI ET AL.: "Mobilization of hepatic mesenchymal stem cells from human liver grafts.", LIVER TRANSPLANTATION : OFFICIAL PUBLICATION OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES AND THE INTERNATIONAL LIVER TRANSPLANTATION SOCIETY MAY 2011, vol. 17, no. 5, May 2011 (2011-05), pages 596-609, XP002769757, ISSN: 1527-6473, figures 1, 6

WO-A1-2015001124

US-A1-2011274664

PIERRE-EDOUARD DOLLET ET AL.: "Comprehensive Screening of Cell Surface Markers Expressed by Adult-Derived Human Liver Stem/Progenitor Cells Harvested at Passage 5: Potential Implications for Engraftment", STEM CELLS INTERNATIONAL, vol. 2016, 1 December 2016 (2016-12-01), pages 1-12, XP055368454, US ISSN: 1687-966X, DOI: 10.1155/2016/9302537, figure 1

SILVIA BERARDIS ET AL.: "Gene Expression Profiling and Secretome Analysis Differentiate Adult-Derived Human Liver Stem/Progenitor Cells and Human Hepatic Stellate Cells", PLOS ONE, vol. 9, no. 1, 21 January 2014 (2014-01-21), page e86137, XP055225466, DOI: 10.1371/journal.pone.0086137 the whole document

WO-A1-2013110354

(57) Препараты клеток-предшественников взрослой печени (называемые HNALPC) получали от разных доноров-людей и характеризовали с использованием маркеров клеточной поверхности, которые позволяют идентифицировать препараты HNALPC и/или способы их получения, которые наиболее подходят для клеточной терапии, в частности для лечения заболеваний печени или наследственных нарушений свертываемости крови.

Область техники

Настоящее изобретение относится к клеткам-предшественникам взрослой печени, которые получают с использованием первичных клеток печени, и их применению для лечения заболеваний печени, наследственных нарушений свертываемости крови или для скрининга представляющих медицинский интерес соединений.

Уровень техники

Печень представляет собой ключевой орган в регуляции гомеостаза организма и место многих жизненных метаболических путей. Нарушение только одного белка в сложном метаболическом пути может быть очень пагубным. Широкое присутствие важных ферментов печени существенно увеличивает риск возникновения различных заболеваний печени. Современные способы лечения и долгосрочного контроля недостаточно эффективны. Ортопическая трансплантация печени (OLT) очень инвазивна, неоперативна, ограничена нехваткой донорских трансплантатов и требует современного уровня хирургии. Трансплантация клеток печени (LCT) может оказывать только краткосрочную и среднесрочную эффективность из-за качества препаратов гепатоцитов. Дальнейшее улучшение толерантности к криоконсервированию, перманентному приживлению, регенерации печени и высокой функциональности инфузированных клеток было бы серьезным прорывом (Christ B. et al., 2015; Berardis S. et al., 2015; Forbes S. et al., 2015, Ibars E. et al., 2016).

Это улучшение может быть достигнуто за счет применения стволовых клеток или клеток-предшественников, в частности клеток-предшественников печени, которые, по литературным данным, были идентифицированы с использованием тканей печени различных организмов, а также в тканях печени плода или взрослого организма (Schmelzer E. et al., 2007; Sahin M.B. et al., 2008; Azuma H. et al., 2003; Herrera M.B. et al., 2006; Najimi M. et al., 2007; Darwiche H. and Petersen B.E., 2010; Shiojiri N. and Nitou M., 2012; Tanaka M. and Miyajima A., 2012). Такие клетки могут обеспечить после воздействия *in vitro* гепатогенных стимулов и/или после введения *in vivo* клетки с морфологическими и функциональными особенностями, как правило, связанными с дифференциацией печени, такой как ферментативная активность фазы I/II.

Эти клетки-предшественники печени или гепатоцитоподобные клетки, которые образуются из них, могут быть использованы в клеточной трансплантации, а также для исследования лекарственных средств при разработке новых лекарственных средств, поскольку они представляют собой суррогат для первичных человеческих гепатоцитов в метаболизме лекарственных средств и фармакологического или токсикологического скрининга *in vitro* (Dan Y.Y., 2012; Hook L.A., 2012). Однако в настоящее время невозможно определить, какие из ранее идентифицированных клеток-предшественников печени являются более подходящими для терапии данного заболевания или применения, главным образом из-за изменчивости способов, используемых для получения и характеристики таких клеток для оценки их потенциальных терапевтических эффектов *in vivo* и последующих фармацевтических применений.

Активность, размножение, миграция, приживление, иммуногенность и дифференциация мезенхимальных стволовых клеток в целом, таких как клетки-предшественники взрослой печени, имеющие мезенхимальные особенности, зависят от специфических поверхностных белков и их иммунологического профиля (Berardis S. et al., 2014; Sana G. et al., 2014; Najjar M. et al., 2013; Raicevic G. et al., 2015), в частности, путем получения конкретных субпопуляций клеток, полученных от разных доноров, и/или производственного процесса.

Однако специфические комбинации печеночных маркеров, мезенхимальных маркеров, тетраспанинов, маркеров адгезии, рецепторов клеточной поверхности и других категорий маркеров не использовались для идентификации клеток-предшественников взрослой печени (или мезенхимальных стромальных клеток печеночного происхождения) от разных доноров-людей, которые получают в клеточной культуре для фармацевтических целей, т.е. в условиях GMP (Правила производства и контроля качества лекарственных средств). Действительно, промышленное производство клеток-предшественников печени для клинического применения требует выявления дополнительных, надежных критериев, которые позволяют характеризовать их качество на протяжении всего процесса отбора доноров, производства и составления клеток и/или отбора пациентов и, следовательно, их эффективного фармацевтического получения и применения.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на наблюдении, что конкретные условия культивирования клеток позволяют получать новые популяции клеток-предшественников взрослой печени с конкретным маркерным профилем и улучшенными биологическими характеристиками от разных доноров. Такие клеточные популяции могут быть использованы для получения фармацевтических композиций на основе клеток (или кондиционированных сред из соответствующих культур клеток) в условиях GMP, которые могут быть использованы в композициях, таких как фармацевтические композиции, в частности, для лечения заболеваний печени, наследственных нарушений свертываемости крови и других заболеваний человека.

Эти клеточные препараты представляют собой популяцию клеток, которые имеют профиль маркеров (в частности, экспрессию и подвешивание белков клеточной поверхности), которые характеризуют их как отличающиеся от тех, которые были идентифицированы в ранее описанных популяциях клеток-

предшественников взрослой печени, выделенных или иным образом полученных от доноров-людей в условиях не-GMP, такие как клетки-предшественники взрослой печени, идентифицированные в литературе, например клетки ADHLSC (Najimi M. et al., 2007; Khuu D.N. et al., 2011; Scheers I. et al., 2012; Bergardis S. et al., 2014; Maerckx C. et al., 2014). Такие дополнительные поверхностные маркеры могут обеспечивать соответствующие критерии для получения фармацевтических препаратов с улучшенной жизнеспособностью, пролиферацией, хранением и/или функциональными особенностями, особенно когда их определение сочетается с оценкой биологической активности, в том числе относящейся к конкретным фармацевтическим композициям, и применения этих клеток.

Кроме того, некоторые из этих маркеров клеточной поверхности могут обеспечить соответствующие критерии для определения характеристик клеток печени доноров, которые предназначены для применения при получении желательных популяций клеток в условиях GMP (до или во время производства) или выборе пациентов, которые могут подвергаться лечению такими клеточными препаратами.

Основной вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает клетки-предшественники взрослой печени (называемые HNALPC), которые могут быть предусмотрены в виде клеточной популяции посредством фармацевтического производственного процесса по требованиям GMP, а также клеточных препаратов и содержащих их фармацевтических композиций. Эти клетки и клеточные популяции презентуют комбинацию белковых маркеров, которые могут быть идентифицированы на их поверхности, в частности, указанная клетка при измерении положительна по отношению к

- (a) мезенхимальным или плюрипотентным маркерам CD13, CD73, CD90 и CD105;
- (b) маркерам адгезии CD29, CD44, CD47, CD49b, CD49c, CD49e и CD147;
- (c) тетраспанинам CD9, CD63, CD81 и CD151, а также
- (d) CD98, CD140b и β 2-микроглобулину.

Эти популяции клеток могут быть дополнительно определены путем измерения того, положительны ли они в отношении

- (a) по меньшей мере одного маркера, выбранного из маркеров адгезии CD54, CD164, CD165 и CD166; и/или
- (b) по меньшей мере одного маркера, выбранного из CD46, CD55, CD59 и CD95.

Эта популяция клеток и родственных клеток может быть охарактеризована в пределах доноров и/или производственных процессов посредством серии клеточных маркеров, которые могут быть положительными или отрицательными. Например, клетка при измерении положительна по меньшей мере в отношении одного маркера, выбранного из CD26, CD49a, CD49d, CD58, CD61, CD71, CD142, CD146, CD201, CD340 и HLA-A/-B/-C.

Альтернативно, клетка при измерении отрицательна, по меньшей мере, в отношении одного маркера, выбранного из

- (a) CD26, CD49a, CD49d, CD58, CD61, CD71, CD142, CD146, CD201, CD340 и HLA-A/-B/-C, и/или
- (b) одного или нескольких CD45, CD117, CD34 и HLA-DR.

Затем HNALPC могут быть дополнительно измерены, положительны ли они в отношении ряда других маркеров и активностей, которые определяются как секретируемые на поверхности клеток, внутриклеточно или иначе экспрессируются HNALPC, включая в себя

- (a) положительны в отношении по меньшей мере одного печеночного маркера, выбранного из альбумина, HNF-4 и CYP3A4;
- (b) положительны в отношении, по меньшей мере, мезенхимального маркера, выбранного из виментина, α -гладкомышечного актина (ASMA);
- (c) отрицательны в отношении цитокератина-19 (СК-19).

HNALPC могут быть охарактеризованы согласно любой функциональной и технической комбинации вышеуказанных вариантов осуществления в отношении положительных и отрицательных маркеров, таких как клетка и клеточные популяции, которые

- (a) положительны в отношении CD13, CD73, CD90, CD105, CD29, CD44, CD47, CD49b, CD49c, CD49e, CD147, CD9, CD63, CD81, CD151, CD98, CD140b, β 2-микроглобулина, CD54, CD164, CD165, CD166, CD46, CD55, CD59, CD95, альбумина и виментина, а также
- (b) отрицательны в отношении CD45, CD117, CD34 и HLA-DR и цитокератина-19.

Клетки и клеточные популяции включают в себя клетки, которые перед дифференциацией *in vitro* и/или после нее (а также после введения в животные модели и/или субъектам-людям) проявляют специфические особенности клеточного типа, в частности функциональные особенности и особенности экспрессии клеток печени, предпочтительно гепатоцитов. Такие специфические для печени активности включают в себя биологическую активность, связанную с ферментами CYP450 человека, детоксикацию, конъюгирование с билирубином, секрецию α -1-антитрипсина, секрецию альбумина, секрецию факторов свертывания крови, образование желчи, продукцию тромбopoэтина, производство ангиотензиногена, превращение аммиака в мочевины, синтез холестерина, гликогенолиз, гликогенез и/или липогенез.

HNALPC могут быть предусмотрены в виде выделенных клеточных популяций, которые содержат клетки, характеризующиеся биологической активностью, маркерами и/или перечисленные выше функ-

циональными особенностями в подавляющем большинстве (например, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%). Согласно предпочтительному варианту осуществления потомство ННАЛРС представляет собой популяцию клеток, которая содержит по меньшей мере 60%, или от 60 до 99%, или от 70 до 90% клеток, которые при измерении положительны и, необязательно, отрицательны в отношении указанных выше маркеров, и это может быть связано с особенностями, которые могут быть применимы для производства и/или применения ННАЛРС.

ННАЛРС по любому из вышеуказанных вариантов осуществления могут быть использованы для обеспечения дополнительных выделенных клеточных популяций, коллективно сгруппированных под названием потомство ННАЛРС, содержащих определенные выше ННАЛРС, которые получают путем пассирования их в условиях культивирования клеток GMP. В частности, потомство ННАЛРС представляет собой результат поддержания, пролиферации и/или дифференциации ННАЛРС в условиях культивирования клеток (или после имплантации у людей или на животной модели), что необходимо для желаемого применения. Потомство ННАЛРС может быть предусмотрено в виде адгезивных клеток или образующих трехмерные клеточные кластеры (в суспензии, внутри каркасов или в составе других структур, которые могут позволить обеспечить клетки, обеспечивающие улучшенное хранение, составы и/или активности), которые пассируются не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4 или не более чем 5 раз в культуре. Более того, такую клеточную популяцию можно дополнительно дифференцировать в клетки, представляющие специфическую для печени биологическую активность *in vitro* и/или *in vivo*.

ННАЛРС и потомство ННАЛРС можно также модифицировать с помощью одного или нескольких химических средств, клеточной культуральной среды, факторов роста и/или векторов нуклеиновых кислот для любого применения *in vivo* или *in vitro*, что требует надлежащего добавления или устранения любых свойств таких клеток.

Способы получения ННАЛРС и потомства ННАЛРС устанавливаются с использованием первичных клеток печени человеческого происхождения (свежих или криоконсервированных) в условиях GMP, т.е. с оборудованием, контейнерами для культивирования клеток и биологическими материалами, которые требуются для клеточной терапии у людей. Разработка способов получения ННАЛРС предусматривает измерение положительности (и, необязательно, также отрицательности) в отношении конкретных комбинаций маркеров, как определено выше. Затем, в зависимости от желаемого применения ННАЛРС и потомства ННАЛРС, клетки, которые получают или которые можно получить этим способом, можно поддерживать в условиях культивирования клеток, что позволяет их пролиферацию в качестве адгезивных клеток, клеточных суспензий или, применяя конкретные условия для их поддержания, в качестве гепатоцитоподобных или гепатоактивных клеток, с использованием коммерчески доступного контейнера с низкой адгезией (в форме пластин или U-образных лунок), в стопках клеточных культур, микроносителях или в биореакторе, и характеризовать в соответствии с их определенными выше функциональными и/или антигенными признаками.

Биологические материалы, которые получают при получении ННАЛРС или потомства ННАЛРС, могут быть дополнительно использованы для идентификации биологических объектов, которые могут иметь конкретные применения, в частности различные медицинские применения для лечения состояния, при котором может принести пользу приживление ННАЛРС в ткани человека. Эти биологические материалы включают в себя не только ННАЛРС в целом, но и субпопуляции, клеточные линии и их фракцию, которые обладают специфическими особенностями (например, маркеры на основе белка или нуклеиновой кислоты, биологическая активность и/или морфология), но также и любой другой объект, который получают при производстве ННАЛРС или потомства ННАЛРС. Биологические материалы по настоящему изобретению включают в себя, например, кондиционированные клеточные культуральные среды (например, в форме супернатанта клеточной культуры) и фракции этих сред, которые могут содержать белки, метаболиты, мембранные везикулы, антигены и/или нуклеиновые кислоты, вместе с другими особенностями, характеризующими сами клетки (например, клеточный поверхностный антиген или ферментативная активность) или без них, могут быть идентифицированы и использованы в качестве маркеров для обнаружения представляющих медицинский интерес клеток или как соединения или биологические продукты, которые характеризуются активностями или представляют собой область медицинских интересов, в частности, при заболеваниях печени.

ННАЛРС, потомство ННАЛРС, биологические материалы, которые получают при получении ННАЛРС или потомства ННАЛРС, и композиции, содержащие такие клетки или биологические материалы ("продукты ННАЛРС" вместе), могут быть применимы в большом количестве способов и применений, либо *in vivo* или *in vitro*. Предпочтительно ННАЛРС могут быть использованы в соответствии с раскрытием публикации международной заявки WO 2007071339 и литературы по клеткам ADHLSC в отношении предшественников/стволовых клеток взрослой печени вообще или в примерах.

Продукт ННАЛРС можно применять для лечения заболеваний (например, заболеваний печени), а также для создания способов и биологических анализов, которые требуют, чтобы клетки, характеризующиеся биологическими особенностями (такими как метаболические или ферментативные активности или антигенный профиль), были как можно более похожими на те, которые наблюдались для первичных ге-

патоцитов в течение требуемого периода времени, как только они дифференцируются либо *in vivo*, либо *in vitro*. Предпочтительными продуктами ННАЛРС являются потомство ННАЛРС, биологический материал, который получается при получении потомства ННАЛРС, и композиция, содержащая либо потомство ННАЛРС, либо такой биологический материал. Более предпочтительно продукт ННАЛРС представляет собой потомство ННАЛРС или композицию, содержащую потомство ННАЛРС, который составлен для медицинского применения (т.е. в качестве продукта для клеточной терапии для введения в печень, в селезенку, внутривенно или внутрисуставно).

В частности, продукт ННАЛРС можно использовать для введения *in vivo* (у людей или животных, например, на животных моделях), например, в форме фармацевтической композиции, содержащей такие клетки, для лечения наследственного нарушения свертываемости крови или заболеваний печени (например, врожденная ошибка метаболизма печени, прогрессирующий семейный внутривенный холестаз типа 1/2/3, дефицит α -1-антитрипсина, дефект транспортеров клеток печени, порфирия, жировое перерождение печени или другое фиброзное заболевание печени, первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, дегенеративное заболевание печени, безалкогольный стеатогепатит, фиброз печени и острая хроническая печеночная недостаточность). Продукты ННАЛРС могут быть представлены в виде содержащей их фармацевтической композиции для лечения заболеваний человека, в частности заболеваний, которые требуют ферментативного, иммуномодулирующего или других эффектов в печени или других тканях в отношении функций, связанных с белками, которые секретируются клетками печени и оказывают влияние на печень или другие ткани и органы (например, в крови, суставах, костном мозге, селезенке или кишечнике).

Эти фармацевтические композиции могут быть предусмотрены в виде продуктов ННАЛРС, которые объединены с подложкой (например, матрицей, капсулой, каркасом или устройством) и/или раствором (например, клеточной культуральной средой или буфером), который подходит для желаемого способа лечения, введения, применения и/или хранения, а также согласно предпочтительному способу для обеспечения таких фармацевтических композиций (например, в наборе). Другие средства биологического (например, антитела или фактора роста) или химического происхождения (например, лекарственные средства, консервирующие или маркирующие соединения), которые могут оказывать любое дополнительное влияние, могут также объединяться в таких композициях.

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

Введение или терапевтическое применение продукта ННАЛРС может предусматривать введение или применение другого продукта (который может представлять собой, например, лекарственное средство, терапевтическое средство, другой тип клеток или другой биологический материал). Продукт ННАЛРС может применяться (или быть предусмотрен для применения) в описанном в настоящем документе способе лечения, при котором пациенту также вводят такой другой продукт, как часть способа. Другой продукт можно вводить в сочетании с продуктом ННАЛРС, например, как часть одного и того же состава или отделено, одновременно или последовательно (и в любом порядке). Другой продукт может характеризоваться эффектами, которые являются совместимыми, аддитивными или даже синергетическими с эффектами (в частности, с терапевтическими эффектами) продукта ННАЛРС, например, потомство ННАЛРС или кондиционированные клеточные культуральные среды, полученные из потомства ННАЛРС.

Продукт ННАЛРС можно также применять для исследований *in vitro*, в частности для фармакологических исследований, для оценки эффективности, метаболизма, стабильности и/или токсичности одного или нескольких экзогенных компонентов, таких как биологический продукт (такой как белок, нуклеиновая кислота, липиды или сахар), или химическое соединение (органическое или неорганическое, включая в себя соли или металлы). Этот подход может быть использован также для изучения влияния других клеток (таких как бактериальные или другие клетки, предпочтительно человеческого происхождения) на продукт ННАЛРС, а также для оценки инфекции и/или репликации специфических для печени вирусов (например, вирусов гепатита) или паразитов (таких как виды *Plasmodium*, в связи с изучением малярии и противомалярийных препаратов), которые могут быть позже очищены или обнаружены иным образом.

Таким образом, в настоящем изобретении также предусмотрены способы оценки эффективности, метаболизма, стабильности и/или токсичности одного или нескольких экзогенных компонентов (т.е. органического или неорганического соединения), либо *in vitro*, либо *in vivo*, причем указанный способ предусматривает

- (a) предоставление продукта ННАЛРС;
- (b) подвергание указанного продукта ННАЛРС действию одного или нескольких соединений (выбранных из химических соединений, белков, нуклеиновых кислот, липидов, сахаров, металлов, солей, вирусов, бактерий и клеток), а также
- (c) обнаружение влияния указанного одного или нескольких соединений на указанный продукт

ННАЛРС и/или обнаружение присутствия, локализации или модификации указанного одного или нескольких соединений после воздействия на указанный продукт ННАЛРС.

Этот общий способ может предусматривать некоторые варианты осуществления дополнительных стадий и особенностей, которые применяются к конкретным видам применения и/или технологиям. Например, определенная выше стадия (с) может предусматривать обнаружение влияния на морфологию клеток, на жизнеспособность клеток, на активацию или подавление специфических для печени или неспецифических белков и/или на деградацию, агрегацию, секрецию, интернализацию, активацию или ингибирование белков в продукте ННАЛРС. Кроме того, определенная выше стадия (с) может предусматривать обнаружение интернализации такого одного или нескольких соединений в продукт ННАЛРС в физическую связь с ним. Продукт ННАЛРС также может быть предоставлен животному, например, отличному от человека животному на стадии (а), а затем одно или несколько соединений вводят указанному животному на стадии (б). Наконец, стадия (с) предусматривает обнаружение влияния указанного одного или нескольких соединений на указанный продукт ННАЛРС или на указанное животное и/или обнаружение присутствия, локализации или модификации указанного одного или нескольких соединений после воздействия на указанный продукт ННАЛРС в животном.

Способы применения продуктов ННАЛРС могут также предусматривать одновременное или последовательное воздействие на клеточную популяцию, композицию или биологический материал на стадии (б), одновременно или последовательно в любом порядке, (i) одного или нескольких соединений, которые влияют на морфологию клеток, жизнеспособность клеток, активацию или пониженную регуляцию специфических к печени или неспецифических белков и/или разрушение, агрегацию, активацию или ингибирование белков в продукте ННАЛРС; и (ii) одного или нескольких соединений, которые предназначены для блокирования или предотвращения таких эффектов в продукте ННАЛРС.

Согласно некоторым вариантам осуществления этот способ предназначен для применения любого продукта ННАЛРС и, в частности, потомства ННАЛРС, в качестве модели печеночных клеток для определения того, подвергается ли вещество, являющееся патогеном, воздействию дополнительного соединения, которое является потенциальным лекарственным средством, специально нацеленным на патоген, и/или обладают ли эффекты терапевтическими свойствами, поскольку оно предотвращает или блокирует нежелательный эффект патогена (например, вирусная инфекция, апоптоз, онкогенная трансформация, снижение активности, специфичной для печени, и т.д.). В частности, соединение (i) выше, которое является патогеном, содержит инфекционное, онкогенное, цитотоксическое или генотоксическое средство, а также дополнительные соединения (ii) выше, которые представляют собой потенциальные лекарственные средства, нацеленные на патоген и/или их эффекты, содержат белок, нуклеиновую кислоту, клетку, вирус или химическое соединение.

Продукт ННАЛРС также может быть предусмотрен в наборе, например, для применений и описанных выше способов применений, включая в себя для передачи продукта ННАЛРС в клиническое учреждение и предоставления средств для его введения пациенту. Этот набор может содержать продукт ННАЛРС и, необязательно, дополнительные элементы, которые позволяют использовать и/или обнаруживать продукт ННАЛРС и активности, а также для применения и/или обнаружения любого соответствующего дополнительного соединения. Этот набор может содержать один или несколько флаконов, содержащих продукт ННАЛРС (например, потомство ННАЛРС или композицию, содержащую потомство ННАЛРС) и один или несколько из следующих элементов, которые должны быть выбраны в соответствии с конкретным применением: устройства, одноразовые материалы, растворы, химические продукты, биологические продукты и/или инструкции по применению элементов указанного набора.

Подробное описание и примеры предоставляют дополнительную информацию о клетках, популяциях клеток, способах и других вариантах осуществления настоящего изобретения, которые связаны с ННАЛРС и потомством ННАЛРС.

Описание чертежей

Фиг. 1 - обнаружение белков клеточной поверхности для характеристики ННАЛРС во время производства GMP. Белки клеточной поверхности, такие как CD44, VLA-2 (комплекс, содержащий CD29 и CD49b), VLA-3 (содержащий CD29 и CD49c) и VLA-5 (комплекс, содержащий CD29 и CD49e), подвергаются воздействию на поверхности ННАЛРС (А; пик при 0 на каждой панели соответствует сигналу антитела изотипического контроля). В противном случае CXCR4 (CD184) обнаруживается во время пассажей клеточной культуры посредством проточной цитометрии только после клеточной пермеабиллизации, что указывает на экспрессию, но быструю интернализацию ННАЛРС.

Фиг. 2 - образование мочевины *in vivo* измеряется в плазме разных пациентов, получавших ННАЛРС (каждый из которых идентифицирован с другим символом), страдающих различными нарушениями цикла обмена мочевины перед (исходный уровень) и в 2 более поздних момента времени (3 и 6 месяцев) после инфузий ННАЛРС.

Фиг. 3 - обнаружение и терапевтическая активность ННАЛРС у пациента, страдающего гемофилией А. Доля ННАЛРС была помечена перед внутривенным введением с помощью ¹¹¹In-DTPA, а за биологическим распределением следили посредством визуализации с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (SPECT). Меченые ННАЛРС, которые вводятся внутривенно, концентриру-

ются в печени и селезенке (А). Интенсивность сигнала для относительного распределения ННАЛРС в разных местах была снижена в легких и одновременно увеличивалась в печени при сравнении изображений, полученных через 24, 48, 72 ч и 6 дней после инфузий (В). Когда анализируется расход фактора VIII, базовое требование в факторе VIII пациента составляло приблизительно 5000 МЕ/неделю с дополнительными дозами 2000 МЕ, введенными до инфузий (в дополнение к исходному уровню в течение 4 инъекционных схем ННАЛРС), но количество фактора VIII, которое требовалось пациентам для нормального гемостаза в течение следующих 15 недель, было значительно снижено (С).

Фиг. 4 - терапевтическая активность ННАЛРС у пациента, страдающего от дефицита орнитин-транскарбамилазы (ОТС) с поздним началом заболевания. Клеточную терапию вводили на 4-й день инфузий (инфузий 01-04, одна инфузия в день), распределенные в течение 8-недельного периода с интервалом в две недели между днями инфузии. Период инфузий был завершен в период с февраля по март 2016 г. В течение этого периода лечения за пациентом тщательно наблюдали с медицинским контролем на 1-й день и 7-й день после инфузии. Сразу после периода инфузий уровень аммиака в крови был стабильным в течение 2-месячного периода (А). Уровень глутамина в крови также нормализовался в следующие месяцы (В).

Подробное описание настоящего изобретения

Основной вариант осуществления настоящего изобретения предусматривает ННАЛРС и потомство ННАЛРС, характеризующееся новыми комбинациями биологических активностей и маркеров, которые могут быть идентифицированы на их поверхности и, необязательно, внутриклеточно, и/или секретированы в клеточной культуральной среде. Эти особенности вместе с морфологическими и функциональными особенностями определяли в сочетании со способами получения ННАЛРС и потомства ННАЛРС в условиях культивирования клеток, определяя положительные (или отрицательные) критерии, характеризующие такие клетки. В частности, такой способ предусматривает:

- (а) дезагрегацию взрослой печени или ее части с образованием популяции первичных клеток печени;
- (b) получение препаратов первичных клеток печени (а);
- (с) культивирование клеток, содержащихся в препаратах (b), на подложке, которая обеспечивает прилипание и рост клеток и появление популяции клеток;
- (d) пассаж клеток (с) по меньшей мере один раз, а также
- (е) выделение популяции клеток, которую получали после пассирования (d), которые являются положительными в отношении маркеров, идентифицированных в краткой сущности настоящего изобретения.

Что касается стадии (а) способа, стадия дезагрегации предусматривает получение взрослой печени или ее части, которая содержит вместе с полностью дифференцированными гепатоцитами количество первичных клеток, которые могут быть использованы для получения ННАЛРС. Первичные клетки печени преимущественно выделены из тканей печени человека, которые получены из печени взрослого организма.

Термин "печень" относится к органу печени. Термин "часть печени", как правило, относится к образцу ткани, полученному из любой части органа печени без каких-либо ограничений относительно размера указанной части или области органа печени, откуда она происходит. Предпочтительно все типы клеток, присутствующие в органе печени, также могут быть представлены в указанной части печени. Размер части печени может, по меньшей мере частично, вытекать из практических соображений необходимости получения достаточного количества первичных клеток печени для разумного применения способа по настоящему изобретению. Следовательно, часть печени может представлять собой процент органа печени (например, по меньшей мере 1, 10, 20, 50, 70, 90% или более, как правило, массовую долю). В других неограничивающих примерах часть печени может быть определена по массе (например, по меньшей мере 1 г, 10 г, 100 г, 250 г, 500 г или более). Например, часть печени может представлять собой долю печени, например правую долю или левую долю, или любой образец сегмента или ткани, содержащий достаточное количество клеток, которые подвергаются резекции во время операции рассечения печени или при биопсии печени.

Термин "взрослая печень" относится к печени субъектов после рождения, т.е. в любое время после рождения, предпочтительно доношенных субъектов, и их возраст может составлять, например, по меньшей мере 1 день, 1 неделю, 1 месяц или более 1 месяца после рождения или по меньшей мере 1, 5, 10 лет и более. Следовательно, "взрослая печень" или зрелая печень могут быть обнаружены у людей, которые в противном случае были бы описаны в обычных терминах "младенец", "ребенок", "подросток" или "взрослый". Печень или его часть получают от "субъекта" или "донора", взаимозаменяемо относящегося к позвоночному животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку. Согласно другому варианту осуществления взрослая печень или ее часть могут быть от отличного от человека субъекта, предпочтительно субъекта, являющегося отличным от человека млекопитающим (например, грызуном или свиньей).

Донор может быть живым или мертвым, как это определено клинически признанными критериями, такими как критерии "сердце-легкие" (включая необратимое прекращение циркуляторных и дыхатель-

ных функций) или критерии "смерти мозга" (с необратимым прекращением всех функций всего мозга, включая в себя ствол головного мозга). Забор может включать в себя известные процедуры, такие как биопсия, резекция или удаление. Забор ткани печени у живого донора может потребоваться для обеспечения жизнеспособности донора. Печень или ее часть могут быть получены от донора, особенно донора-человека, который имеет устойчивое кровообращение, например, сердцебиение и поддерживаемые функции дыхания, например легочное дыхание или искусственную вентиляцию легких. Из живого донора-человека может быть удалена, как правило, только часть печени (например, путем биопсии или резекции), так что у донора сохраняется адекватный уровень нормальных функций печени, как того требуют юридические и этические нормы.

В соответствии с этическими и правовыми нормами может быть необходимо, чтобы мозг донора был мертв, или это может не требоваться (например, удаление всей печени или ее части, которая не совместима с дальнейшей выживаемостью донора-человека может быть разрешена у людей с мертвым мозгом). Забор печени или ее части от таких доноров является выгодным, так как ткань не страдает значительной гипоксией (отсутствие оксигенации), которая обычно возникает из-за ишемии (прекращения циркуляции). Во время забора ткани ткань может характеризоваться прекращением циркуляции и/или респираторных функций без искусственной вентиляции. Хотя печень или ее часть от этих доноров, возможно, страдала, по меньшей мере, от некоторой степени гипоксии, печень от доноров трупной ткани может быть использована для получения HNALPC в условиях культивирования клеток, например, в течение приблизительно 1, 3, 6, 12, 24 ч или более после прекращения циркуляции крови доноров.

Ткани (из иссеченных хирургическим путем образцов печени или биопсии печени), которые собираются как указано выше, могут быть охлаждены до комнатной температуры или до температуры ниже комнатной температуры, но, как правило, замораживание ткани или ее частей предотвращается, особенно там, где такое замораживание приведет к зарождению или росту кристаллов льда. Например, ткань может храниться при любой температуре от приблизительно 1°C или приблизительно 4°C до комнатной температуры и может преимущественно храниться при температуре приблизительно 4°C, например, на льду. Ткань может быть охлаждена в течение всего или части времени ишемии, т.е. после прекращения кровообращения у донора. То есть ткань может быть подвергнута тепловой ишемии, холодовой ишемии или комбинации тепловой и холодовой ишемии. Собранный ткань можно хранить, например, до 48 ч перед обработкой, предпочтительно в течение менее 24 ч, например, более предпочтительно менее 12 ч (например, менее 6, 3 или 1 ч). Забранная ткань может эффективно, но не обязательно, храниться, например, полностью или, по меньшей мере частично, погруженной в подходящую среду и/или ее можно, но не обязательно, перфузировать подходящей средой перед дальнейшей обработкой ткани. Специалист в настоящей области техники может выбрать подходящую среду, которая может поддерживать выживаемость клеток ткани в течение периода перед обработкой.

Способ по настоящему изобретению предусматривает дезагрегацию ткани печени взрослого человека, как описано выше, с образованием популяции первичных клеток. Используемый в настоящем документе термин "деагрегация", как правило, относится к частичному или полному нарушению клеточной организации ткани или органа, т.е. частичному или полному нарушению связи между клетками и клеточными компонентами ткани или органа для получения суспензии клеток (например, клеточной популяции) из указанной ткани или органа. Суспензия может содержать одиночные или отдельные клетки, а также клетки, физически присоединенные для образования кластеров или скоплений двух или более клеток. Дезагрегация предпочтительно не вызывает или вызывает как можно меньшее уменьшение жизнеспособности клеток. Подходящим способом дезагрегации печени или ее части для получения популяции (суспензии) первичных клеток из нее может быть любой способ, хорошо известный в настоящей области техники, включая в себя, без ограничения, ферментативное расщепление, механическое разделение, фильтрацию, центрифугирование и их комбинации. В частности, способ дезагрегации печени или ее части может предусматривать ферментативное расщепление ткани печени для высвобождения клеток печени и/или механическое разрушение или разделение ткани печени для высвобождения клеток печени. Небольшие тонкие фрагменты тканей печени, которые получают посредством биопсии печени, могут быть использованы непосредственно для выполнения культивирования клеток в соответствии со следующей стадией (с) без ферментативного или механического разрушения.

Способы дезагрегации печени или ее части, как указано выше, представлены в литературе как широко используемый способ перфузии коллагеназой на двух или более стадиях, которые были по-разному адаптированы и модифицированы для выполнения их в цельной печени или сегментах печени. Ткань печени перфузируют с помощью двухвалентного буферного раствора без катионов, предварительно нагретого до температуры 37°C, содержащего катион-хелатирующее средство (например, ЭДТА или ЭГТА). Буферные растворы могут содержать солевые растворы (например, HEPES, среду Williams E) или любой другой сбалансированный солевой раствор, который также может включать в себя такие соли, как хлорид натрия или хлорид калия. Это приводит к нарушению десмосомных структур, которые удерживают клетки вместе. Затем ткань перфузируют буферным раствором, содержащим двухвалентный катион(ы), такой как Ca^{2+} и Mg^{2+} , и ферменты, разрушающие матрикс, которые действуют для расщепления ткани.

Первичные клетки печени, как правило, высвобождаются мягким механическим разрушением и/или прессованием через фильтры для завершения процесса дезагрегации клеток. Такие фильтры могут иметь размеры сита, которые позволяют прохождению клеток, приблизительно 0,1 мм, 0,25 мм, 0,50 мм, 1 мм и более. Последовательность фильтров с постепенно уменьшающимися размерами сита может использоваться для постепенной дезагрегации ткани и высвобождения клеток. Дезагрегированные клетки промывают буфером, содержащим ингибитор протеазы, сыворотку и/или плазму, чтобы инактивировать коллагеназу и другие ферменты, используемые в перфузионном процессе, и затем отделяют от смеси путем осаждения их посредством низкоскоростного центрифугирования (например, от 10 до 500 g). Большинство, если не все, жизнеспособных клеток можно осадить, в то время как мертвые клетки и клеточный мусор, по существу, устраняются в надосадочную жидкость, а затем промываются ледяным буферным раствором для очистки клеточной суспензии. Количество и качество первичных клеток печени может варьировать в зависимости от качества ткани, композиций различных используемых растворов, а также от типа и концентрации фермента. Фермент часто представляет собой коллагеназу, но также может быть использована проназа, трипсин, гиалуронидаза, термоллизин и их комбинации. Коллагеназа может состоять из плохо очищенной смеси ферментов и/или проявлять протеазную активность, что может вызывать нежелательные реакции, влияющие на качество и количество жизнеспособных клеток, которых, в свою очередь, можно избежать, выбирая ферментные препараты с достаточной степенью чистоты и качества. Другие способы сбора первичных клеток печени могут исключать способы ферментативного расщепления и могут предусматривать перфузию печени растворами, содержащими сахарозу, с последующим механическим разрушением.

Что касается стадии (b) способа, то препарат первичных клеток печени, который получают после дезагрегации ткани печени, как правило, может представлять собой гетерогенную популяцию первичных клеток печени, содержащую клетки, относящиеся к любым типам относящихся к печени клеток, включая в себя предшественники или стволовые клетки, которые могли присутствовать в паренхиме и/или в непаренхиме печени. Иллюстративными типами относящихся к печени клеток, являются гепатоциты, холангиоциты, клетки Купфера, гепатические звездчатые клетки и эндотелиальные клетки печени, в дополнение к стволовым клеткам или клеткам-предшественникам, которые могут присутствовать или выявляться в условиях клеточной культуры из ткани печени.

Термин "гепатоцит" охватывает эпителиальные, паренхиматозные клетки печени, включая в себя, без ограничения, гепатоциты разных размеров или плоидности (например, диплоид, тетраплоид, октаплоид).

Термин "первичная клетка" включает в себя клетки, присутствующие в суспензии клеток, полученных из ткани или органа субъекта, например печени, путем дезагрегации клеток, присутствующих в такой эксплантационной ткани или органе, с помощью соответствующих способов.

Способы по настоящему изобретению могут предпочтительно начинаться с популяции клеток, представляющей большинство, если не все, типы клеток печени в объеме получения желательных клеток-предшественников взрослой печени в условиях клеточной культуры. Подходящая начальная популяция клеток для получения ННАЛРС может содержать гепатоциты в разных пропорциях (0,1%, 1%, 10% или более от общего количества клеток), в соответствии со способом дезагрегации печени и/или любыми способами фракционирования или обогащения исходного препарата гепатоцитами и/или другими типами клеток на основе физических свойств (размерности, морфологии), жизнеспособности, условий культивирования клеток или экспрессии маркера клеточной поверхности путем применения любых подходящих способов.

Популяция первичных клеток, определенная и полученная в настоящем документе путем дезагрегации печени (или ее части), может быть немедленно использована для создания клеточных культур в виде свежих первичных клеток печени или предпочтительно для хранения в виде криоконсервированных препаратов первичных клеток печени с использованием общих технологий для их длительного сохранения. Действительно, использование криоконсервированных клеточных препаратов, по-видимому, оказывает положительное влияние на эффективность, с которой ННАЛРС и потомство ННАЛРС впоследствии производятся в клеточной культуре. Клетки в этих образцах могут быть заморожены в клеточной культуральной среде или в растворе для сохранения клеток или органов (например, Viaspan, Cryostor, Celsior), которые дополняются другими соединениями, такими как факторы роста, сыворотка, буферные растворы, глюкоза, альбумин, этиленгликоль, сахароза, декстроза, ДМСО или любой другой криопротектор, или не содержат их. Каждый криоконсервированный препарат может содержать по меньшей мере 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 клеток или более на криофлакон или мешок в объеме производства и выделения большего количества ННАЛРС в условиях культивирования клеток после надлежащего оттаивания образца и, при необходимости, промывания клеток соответствующим буфером или культуральной средой для элиминации остаточной клеточной культуральной среды или раствора для сохранения клеток или органов.

Что касается стадии (c) способа, то препарат первичных клеток печени (в виде клеточной суспензии или в виде фрагментов тканей печени, полученных посредством биопсии печени) можно культивировать непосредственно на полностью синтетической подложке (например, пластике или любом полимерном

веществе) или синтетической подложке, предварительно покрытой питающими клетками, белковыми экстрактами или любым другим материалом биологического происхождения, который обеспечивает адгезию и пролиферацию подобных первичных клеток и появление популяции клеток-предшественников взрослой печени, имеющих желаемые маркеры, такие как маркеры, которые предпочтительно идентифицируют на уровне белка с помощью иммуногистохимии, проточной цитометрии или другого способа на основе антител.

Предпочтительно клетки из первичной клеточной популяции, которые адгезируют к указанному субстрату, культивируют в течение по меньшей мере 2 дней или более, предпочтительно 7 дней, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 12 дней. Более предпочтительно клетки из первичной клеточной популяции культивируют в течение 7 и 12 дней, чтобы получить популяцию адгезивных клеток, которая достаточно обогащена жизнеспособными первичными клетками, которые могут обеспечить ННАЛРС.

Термин "культивирование" в целом относится к условиям содержания и/или роста клеток, и в частности ННАЛРС и/или потомства ННАЛРС, в культуре клеток. Такие элементы, как подложка, где клетки культивируют и где возможна клеточная адгезия (или когда это необходимо, возможен рост клеточных кластеров в суспензии), композиция среды для культивирования клеток, плотность, при которой клетки высевают и поддерживают, концентрация O_2 и CO_2 , могут быть адаптированы для культивирования ННАЛРС и потомства ННАЛРС, как описано ниже и в примерах.

Термин "клетка-предшественник печени" относится к неспециализированной и пролиферативно компетентной клетке, которая производится путем культивирования клеток, которые выделены из печени и которые или потомство которых может приводить к образованию по меньшей мере одного относительно более специализированного клеточного типа. Клетка-предшественник печени дает начало потомкам, которые могут дифференцироваться вдоль одной или нескольких линий, чтобы производить все более специализированные клетки (но предпочтительно гепатоциты или гепатоактивные клетки), причем такие потомки сами могут представлять собой клетки-предшественники или даже производить терминально дифференцированные клетки печени (например, полностью специализированные клетки, в частности клетки, представляющие морфологические и функциональные особенности, сходные с таковыми у гепатоцитов человека).

ННАЛРС представляют собой клетки-предшественники взрослой печени, полученные в условиях GMP, которые могут быть дополнительно охарактеризованы технологиями, которые позволяют обнаруживать соответствующие маркеры уже на этой стадии (т.е. перед пассированием клеток, как указано на стадии (d)) и которые были первоначально охарактеризованы на более поздней стадии, как описано ниже на стадии (e). Среди технологий идентификации таких маркеров и их оценки как положительной или отрицательной, предпочтительными являются Вестерн-блоттинг, проточная цитометрия, иммуноцитохимия или анализ среды для культивирования клеток, поскольку позволяет обнаруживать маркер на уровне белка даже при небольшом количестве ННАЛРС, которые доступны на этой стадии.

ННАЛРС возникают из первичной популяции клеток печени, которая покрывает подложку, что делает возможным адгезию клеток в окружающей среде *in vitro*, способной стимулировать выживание и/или рост таких клеток. Эта окружающая среда может препятствовать нежелательному обмену веществ между указанной окружающей средой (т.е. контейнером для культуры клеток) и окружением (например, путем предотвращения загрязнения лабораторной окружающей среды), в то время как она может обеспечивать непрерывный или прерывистый обмен другими полезными компонентами между сосудами для культивирования (например, путем периодического или непрерывного обмена частью или всей культуральной средой и газами).

Сосуды для культивирования могут представлять собой колбы для культивирования клеток, бутылки, луночные планшеты, многослойные флаконы, биореакторы и посуду разных форматов, но отображающие одну или несколько поверхностей подложки, совместимых с клеточной адгезией, так что покрытые клетки могут контактировать с этой подложкой, которая должна поддерживать клеточные культуры. В общем, подложка, которая допускает прилипание клеток к ней, может представлять собой любой, по существу, гидрофильный субстрат, являющийся стеклом или синтетическим полимерным материалом (таким как поликарбонаты, полистиролы, полиортоэфиры, полифосфазены, полифосфаты, сложные полиэфиры, нейлоны или их смеси), которые, как правило, имеют форму и обрабатываются для обеспечения поверхностей гидрофильных подложек и тем самым повышают вероятность эффективного прикрепления клеток (как показано в примерах с использованием коммерческих материалов CellBind). Обработка поверхности может иметь форму поверхностного покрытия или может включать образование химических групп на поверхности полимера, которые имеют общее сродство к воде или иным образом проявляют достаточную полярность, чтобы обеспечить стабильную адсорбцию к другой полярной группе. Эти функциональные группы приводят к гидрофильности и/или увеличению поверхностного кислорода и являются признанными свойствами для усиления роста клеток на модифицированных таким образом поверхностях подложки. Такие химические группы могут включать в себя такие группы, как аминные, амидные, карбонильные, карбоксилатные, сложноэфирные, гидроксильные или сульфгидрильные группы, которые также могут быть введены путем обработки их основанными на конкретной частоте волны технологиями.

Клеточная адгезия может быть облегчена путем покрытия обработанных пластиковых поверхностей слоем подходящего матрикса. Покрытие может включать в себя подходящие поликатионы (например, полиомитин или полилизин) или предпочтительно один или несколько компонентов внеклеточного матрикса, которые могут быть предусмотрены для производства по GMP: ламинины, неволокнистые коллагены (предпочтительно коллаген типа 1), гликозаминогликаны (например, гепарин или гепарансульфат) или белки, такие как фибронектин, желатин, витронектин, эластин, тенаскин, агрекан, агрин, костный сиалопротеин, белок матрикса хряща, фибриноген, муцины или молекулы клеточной адгезии, включая в себя кадгеринины или коннексины, отдельно или в различных комбинациях. Предпочтительные примеры могут включать в себя композиции коллагена, содержащие или не содержащие другие компоненты внеклеточного матрикса. Альтернативно, синтетические пептиды, которые являются фрагментами или иначе получены из перечисленных выше белков, гели, молекулярные каркасы и другие трехмерные структуры, которые образованы из синтетических и/или биологических материалов, могут быть использованы в объеме настоящего изобретения.

Суспензия первичных клеток может контактировать с адгезивной поверхностью в течение определенного периода времени (например, по меньшей мере 2, 4, 6, 12, 24 ч или более), что является достаточным для того, чтобы позволить первичным популяциям клеток печени присоединяться к адгезивной подложке перед удалением какого-либо неадгезивного вещества из системы культивирования (например, нежизнеспособных или мертвых клеток и клеточного мусора) путем удаления среды из системы культивирования и необязательной промывки, однократной или многократной, адгезивных клеток. Затем систему культивирования обеспечивают любой подходящей средой или изотоническим буфером (например, PBS). Таким образом, клетки из первичной популяции клеток печени, которые адгезируют к поверхности, отбирают для дальнейшего культивирования, и их можно подсчитать для оценки плотности покрытия, которая может быть выражена как количество клеток, нанесенных на см^2 указанной поверхности (например, от 10 до 10^5 клеток/ см^2).

Препарат первичных клеток, непосредственно при высевании или после отмывания клеток, поддерживается в жидкой среде, которая поддерживает их выживание и/или рост клеток. Среда может быть добавлена в систему до, вместе с или после введения в нее клеток. Среда может быть свежей (т.е. ранее не использовалась для культивирования клеток) или может содержать, по меньшей мере, фракцию, которая была кондиционирована предшествующими культивируемыми клетками печеночного происхождения (или любого другого происхождения). В частности, среда может представлять собой любую подходящую культуральную среду для культивирования клеток-предшественников печени, как описано в литературе, и ее можно регулярно обменивать (например, каждый час, 3 часа, 12 часов, 24 часа и более) со свежей средой, представляющей те же или другие особенности (например, состав, pH или окислительный статус). Весь объем среды может быть изменен или, альтернативно, только часть среды может быть изменена, так что часть среды, кондиционированная предыдущим культивированием клеток, сохраняется. Альтернативно, среду не обменивают до тех пор, пока клетки не будут перенесены в другой сосуд для культивирования, продлевая культуру клеток таким образом, чтобы большая часть не представляющих интерес клеток (например, гепатоциты и другие полностью дифференцированные клетки печеночного происхождения) отделялись и погибали, а свежая среда может быть просто регулярно добавлена.

Адгезивные первичные клетки культивируют в присутствии жидкой культуральной среды для выращивания адгезивных клеток, которая в соответствии с требованиями GMP основана на определенных химических средах с добавлением (или без) добавок бычьей, человеческой или другой животной сыворотки. Эти среды, которые могут быть дополнены соответствующей смесью органических или неорганических соединений, могут помимо предоставления питательных веществ и/или промоторов роста также способствовать росту/адгезии или элиминации/откреплению конкретных типов клеток.

Составы основных культуральных сред (доступных, например, из Американской коллекции типовых культур, ATCC или из Invitrogen, Carlsbad, California) могут быть использованы для культивирования первичных клеток в настоящем документе, включая в себя, без ограничения, минимальную питательную среду Игла (MEM), модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), α -модифицированную минимальную питательную среду (α -MEM), базовую питательную среду (BME), среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM), среду BGJb, питательную смесь F-12 (Ham), Liebovitz L-15, DMEM/F-12, питательную модифицированную среду Игла (EMEM), RPMI-1640, среду 199, среду Вэймонта MB 752/1 или среду Williams Medium E, а также модификации и/или их комбинации. В целом общеизвестны композиции этих основных сред и критерии адаптации концентраций сред и/или добавок к среде, которые необходимы для культивируемых клеток. Предпочтительный состав основной среды может быть одним из тех, которые имеются в продаже, например, в среде Williams Medium E, IMDM или DMEM, которые, как сообщается, поддерживают *in vitro* культуру клеток взрослой печени и включают в себя смесь факторов роста для их соответствующего роста, пролиферации, поддержания желаемых маркеров и/или биологической активности, или длительного хранения.

Такие составы основных сред содержат ингредиенты, необходимые для развития клеток млекопи-

тающих, которые известны как неорганические соли (в частности, соли, содержащие Na, K, Mg, Ca, Cl, P и, возможно, Cu, Fe, Se и Zn), физиологические буферы (например, HEPES, бикарбонат), нуклеотиды, нуклеозиды и/или основания нуклеиновых кислот, рибоза, дезоксирибоза, аминокислоты, витамины, антиоксиданты (например, глутатион) и источники углерода (например, глюкоза, пируват). Дополнительные добавки могут использоваться для обеспечения клеток необходимыми микроэлементами и веществами для оптимального роста и размножения. Такие добавки включают в себя инсулин, трансферрин, соли селена и их комбинации. Эти компоненты могут быть включены в раствор соли, такой как сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), солевой раствор Эрла. Могут быть добавлены дополнительные антиоксидантные добавки, например β -меркаптоэтанол. Хотя многие основные среды уже содержат аминокислоты, некоторые аминокислоты могут быть добавлены позже, например L-глутамин, который, как известно, менее стабилен в растворе. Кроме того, среда может быть снабжена антибиотическими и/или противогрибковыми соединениями, такими как, как правило, смеси пенициллина и стрептомицина и/или других соединений. Самое главное, клеточные культуральные среды могут быть дополнены плазмой или сывороткой млекопитающих, которые содержат клеточные факторы и компоненты, которые необходимы для жизнеспособности и размножения клеток и которые при определенных условиях могут быть заменены синтетическими компонентами.

"Сыворотку", как обычно определяется этот термин, получают из образца цельной крови, сначала позволяя пройти свертыванию в образце и затем отделяя сформированный таким образом сгусток и клеточные компоненты образца крови от жидкого компонента (сыворотки) с помощью соответствующего способа, как правило, путем центрифугирования. Инертный катализатор, например стеклянные шарики или порошок, может способствовать свертыванию. Предпочтительно сыворотка может быть получена с использованием сывороточных разделительных сосудов (SST), которые содержат инертный катализатор для млекопитающих.

Сыворотка или плазма могут быть получены коммерчески и из организма того же вида, что и виды, из которых получены первичные клетки печени. Сыворотка или плазма человека могут быть использованы для культивирования первичных клеток печени человека. Альтернативно, среда содержит бычью сыворотку или плазму, предпочтительно фетальную бычью (телячью) сыворотку или плазму, более предпочтительно фетальную бычью (телячью) сыворотку (FCS или FBS). Среда содержит приблизительно от 0,5% до приблизительно 40% (об./об.) сыворотки или плазмы или замены сыворотки, предпочтительно приблизительно от 5 до 20% (об./об.), например приблизительно от 5 до 15% (об./об.), например, приблизительно 10% (об./об.). Среда для культивирования клеток печени человека может содержать смесь плазмы или сыворотки человека, предпочтительно человеческой сыворотки и бычьей плазмы или сыворотки, предпочтительно бычьей сыворотки.

Перед хранением или применением плазму или сыворотку можно облучать (например, γ -облучение) или инактивировать нагреванием. Инактивация нагреванием используется в настоящей области техники в основном для удаления дополнения. Инактивация нагреванием, как правило, предусматривает инкубацию плазмы или сыворотки при 56°C в течение 30-60 мин, например 30 мин при постоянном перемешивании, после чего плазме или сыворотке дают возможность постепенно охладиться до температуры окружающей среды. Необязательно, плазму или сыворотку можно также стерилизовать перед хранением или использованием (например, путем фильтрации через один или несколько фильтров с размером пор менее 1 мкм) или обрабатывать в соответствии с любой применимой нормативной политикой для культивирования клеток человека для терапевтического применения.

Обычные компоненты основной среды (до добавления сыворотки или плазмы), например, изотонический солевой раствор, буферы, неорганические соли, аминокислоты, источники углерода, витамины, антиоксиданты, индикаторы pH и антибиотики, не считаются факторами роста или факторами дифференциации в настоящей области техники. С другой стороны, сыворотка или плазма представляют собой сложный состав, возможно содержащий один или несколько таких факторов роста.

Используемый в настоящем документе термин "фактор роста" относится к биологически активному веществу, которое влияет на пролиферацию, рост, дифференцировку, выживание и/или миграцию различных типов клеток, а также может влиять на развитие, морфологические и функциональные изменения в организме либо в одиночку, либо когда модулировано другими веществами. Фактор роста, как правило, может действовать путем связывания в качестве лиганда с рецептором (например, поверхностным или внутриклеточным рецептором), присутствующим в клетках. Фактор роста в настоящем документе может представлять собой, в частности, белковый объект, содержащий одну или несколько полипептидных цепей. Термин "фактор роста" охватывает представителей семейства факторов роста фибробластов (FGF), семейства костного морфогенетического белка (BMP), семейства факторов роста тромбоцитов (PDGF), семейства трансформирующих факторов роста (TGF- β), фактора роста нервов (NGF), семейства эпидермального фактора роста (EGF), семейства факторов роста, связанных с инсулином (IGF), семейства фактора роста гепатоцитов (HGF), семейства интерлейкина-6 (IL-6) (например, онкостатин M), гемопоэтических факторов роста (HeGF), факторов роста эндотелиальных клеток тромбоцитов (PD-ECGF), ангиопоэтин, семейства фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) или глюкокортикоидов. Когда способ приме-

няется для клеток печени человека, фактором роста, используемым в настоящем способе, может быть человеческий или рекомбинантный фактор роста. Использование человеческого и рекомбинантного факторов роста в настоящем способе является предпочтительным, поскольку ожидается, что такие факторы роста окажут желательное влияние на клеточную функцию.

Среда может содержать комбинацию сыворотки или плазмы с одним или несколькими экзогенно добавленными факторами роста, как определено выше, предпочтительно в концентрациях, в которых конкретные факторы роста могут индуцировать влияние на культивируемые клетки *in vitro*. Например, среда может содержать EGF и инсулин, или EGF и дексаметазон, или инсулин и дексаметазон, или каждый EGF, инсулин и дексаметазон. EGF можно, как правило, использовать в концентрациях приблизительно от 0,1 нг/мл до 1 мкг/мл и предпочтительно от 1 до 100 нг/мл, например, приблизительно 25 нг/мл; инсулин, как правило, можно использовать в концентрациях приблизительно от 0,1 мкг/мл до 1 мг/мл и предпочтительно приблизительно от 1 до 100 мкг/мл, например, приблизительно 10 мкг/мл; дексаметазон можно, как правило, использовать в концентрациях приблизительно от 1 нМ до 1 мкМ, предпочтительно от приблизительно 1 до 100 нМ, например, приблизительно 10 нМ. В конкретных условиях изготовления по GMP EGF может отсутствовать.

Гормоны также могут быть использованы в культуре клеток, например, D-альдостерон, диэтилстильбэстрол (DES), дексаметазон, инсулин, эстрадиол, гидрокортизон, пролактин, прогестерон, гиротропин, тироксин и L-тиронин. Клетки печени могут также получать положительный результат от культивирования с трийодтиронином, α -токоферолацетатом и глюкозагом. Липиды и липидные носители также могут быть использованы для дополнения клеточных культуральных сред. Такие липиды и носители могут включать в себя, без ограничения, циклодекстрин, холестерин, линолевую кислоту, конъюгированную с альбумином, линолевую кислоту и олеиновую кислоту, конъюгированную с альбумином, неконъюгированную линолевую кислоту, линолеино-олеино-арахидоновую кислоту, конъюгированную с альбумином, неконъюгированную и конъюгированную с олеиновой кислотой с альбумином, среди прочих. Подобным же образом альбумин можно использовать в композициях, не содержащих жирных кислот.

Морфологические и фенотипические особенности HNALPC, описанные в примерах, могут позволить получать такие клетки не только тогда, когда криоконсервированные препараты первичных клеток печени обладают низкой эффективностью посева, но также путем тестирования и/или адаптации известных технологий для получения адгезивных клеток из гетерогенных препаратов первичных клеток путем выбора и объединения различных технологий, условий и/или материалов (например, синтетического полимерного материала, компонента(ов) внеклеточного матрикса, среды для культивирования клеток, количества кислорода и/или CO₂ в инкубаторе, отмывочного буфера и т.д.). В частности, культивирование в гипоксических условиях (полученное добавлением антиоксидантного соединения в миллимолярных или более низких концентрациях) вместе с одной или несколькими комбинациями этих других элементов может быть применено для получения HNALPC в большем количестве и/или более быстро.

Эта стадия культивирования первичных клеток печени, как определено выше, приводит к появлению и пролиферации HNALPC в культуре и может продолжаться до тех пор, пока HNALPC не будут достаточно пролиферированы. Например, культивирование можно продолжать до тех пор, пока популяция клеток не достигнет определенной степени конфлюэнтности (например, по меньшей мере 50%, 70% или по меньшей мере 90% конфлюэнтности или более). Используемый в настоящем документе термин "конфлюэнтность" относится к плотности культивируемых клеток, в которых клетки контактируют друг с другом, покрывая, по существу, все поверхности, доступные для роста (т.е. полностью конфлюэнтные).

Что касается стадии (d) способа, первичные клетки культивируют в клеточной культуральной среде, поддерживающей их адгезию, а также пролиферацию и появление гомогенной популяции клеток, которая по меньшей мере через один пассаж постепенно обогащается HNALPC. HNALPC могут быть быстро размножены для получения достаточного количества клеток для получения потомства HNALPC, обладающего желаемыми свойствами (например, в виде двумерных адгезивных клеток или трехмерных клеточных кластеров при заданном состоянии плотности и/или дифференцировки) с удвоением клеток, что может быть получено в течение 48-72 ч, и поддержания имеющего желаемые свойства потомства HNALPC по меньшей мере в течение 2, 3, 4, 5 или более пассажей.

При пассировании культивируемые клетки отделяют и дезагрегируют от культуральной подложки и друг от друга. Отделение и дезагрегация клеток могут быть проведены, как общеизвестно в настоящей области техники, например, путем ферментативной обработки протеолитическими ферментами (например, выбранными из трипсина, коллагеназы, например, типа I, II, III или IV, диспазы, проназы, папаина и т.д.), обработки бивалентными ионными хелаторами (например, ЭДТА или ЭГТА) или механической обработки (например, повторное пипетирование через маленькую пипетку или наконечник пипетки) или любой комбинации этих обработок.

Подходящий способ отделения и диспергирования клеток должен обеспечивать желаемую степень отделения и диспергирования клеток, сохраняя при этом большинство клеток в культуре. Предпочтительно отделение и дезагрегация культивируемых клеток будут давать значительную долю клеток в виде отдельных жизнеспособных клеток (например, по меньшей мере 50%, 70%, 90% клеток или более). Ос-

тавшиеся клетки могут присутствовать в кластерах клеток, каждый из которых содержит относительно небольшое количество клеток (например, в среднем от 1 до 100 клеток).

Затем отделенные и дезагрегированные таким образом клетки (как правило, в виде клеточной суспензии в изотоническом буфере или среде) могут быть повторно нанесены на подложку, которая обеспечивает адгезию к ней клеток и затем культивируют в среде, как описано выше, поддерживая дальнейшую пролиферацию ННАЛРС и потомство ННАЛРС. Эти клетки могут быть затем культивированы путем повторного нанесения их при плотности от 10 до 10^5 клеток/см² и коэффициентом разделения приблизительно от 1/16 до 1/2, предпочтительно приблизительно от 1/8 до 1/2, более предпочтительно приблизительно от 1/4 до 1/2. Коэффициент разделения обозначает долю пассированных клеток, которые высеваются в пустой (как правило, новый) сосуд для культивирования с той же площадью поверхности, что и сосуд, из которого были получены клетки. Тип сосуда для культивирования, а также поверхности, обеспечивающей клеточную адгезию в сосуде для культивирования и среда для культивирования клеток могут быть такими же, как использовались первоначально и как описано выше, или могут быть отличными. Предпочтительно клетки поддерживаются на CellBind или любой другой подходящей подложке, которая покрыта белками внеклеточного матрикса (такими как коллагены и предпочтительно коллаген I типа) или синтетическими пептидами, которые приемлемы в условиях GMP.

Что касается стадии (е) выше, то выделение популяции ННАЛРС применяется к клеткам, которые являются положительными в отношении перечисленных маркеров, дополнительно проверяя критерии для первоначальной идентификации ННАЛРС на стадии (с) выше, но это может быть более легко установлено, учитывая большее количество клеток, которые доступны после пассирования.

Термин "выделение" относится как к физической идентификации, так и к выделению клеточной популяции из культуры клеток или биологического образца, что может быть выполнено путем применения соответствующих технологий клеточной биологии, которые либо основаны на проверке клеточных культур и на характеристике (и физическом разделении, когда это возможно и желательно) клеток, соответствующих критериям, или на автоматизированной сортировке клеток в соответствии с наличием/отсутствием антигенов и/или размером клеток (например, FACS). Согласно некоторым вариантам осуществления термин "выделение" может предусматривать дополнительную стадию физического разделения и/или количественного определения клеток, в частности, путем проведения проточной цитометрии.

Термины "клеточная популяция" и "популяция клеток" относятся в целом к группе клеток. Если не указано иное, термин относится к группе клеток, состоящей, по существу, из определенных в настоящем документе клеток или содержащей их. Популяция клеток может состоять, по существу, из клеток, имеющих общий фенотип, или может содержать по меньшей мере часть клеток, имеющих общий фенотип. Говорят, что клетки имеют общий фенотип, когда они, по существу, похожи или идентичны по одной или нескольким очевидным характеристикам, включая в себя, без ограничения, морфологический вид, уровень экспрессии конкретных клеточных компонентов или продуктов (например, РНК или белков), активность определенных биохимических путей, способность к пролиферации и/или кинетике, потенциал дифференциации и/или ответ на сигналы дифференциации или поведение во время культивирования *in vitro* (например, адгезия или рост монослоя). Таким образом, такие очевидные характеристики могут определять популяцию клеток или их долю. Популяция клеток может быть "по существу гомогенной", если значительная часть клеток имеет общий фенотип. "По существу гомогенная" популяция клеток может содержать по меньшей мере 60%, например по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или даже по меньшей мере 99% клеток, имеющих общий фенотип, такой как фенотип, который специфически относится к ННАЛРС (или к потомству ННАЛРС). Более того, популяция клеток может состоять, по существу, из клеток, имеющих общий фенотип, такой как фенотип ННАЛРС (т.е. потомство ННАЛРС), если любые другие клетки, присутствующие в популяции, не изменяют или не оказывают существенного влияния на общие свойства клеточной популяции и поэтому его можно определить как клеточную линию.

В общем, любая технология идентификации и характеристики клеточных маркеров для конкретного типа клеток (например, мезенхимальный, печеночный, гемопоэтический, эпителиальный, эндотелиальный маркеры) или с определенной локализацией (например, внутриклеточной, на клеточной поверхности или секретируемой), которые опубликованы в литературе, может считаться подходящей для характеристики ННАЛРС и потомства ННАЛРС. Такие технологии могут быть сгруппированы в две категории: те, которые позволяют поддерживать целостность клеток во время анализа, и те, которые основаны на экстрактах (содержащих белки, нуклеиновые кислоты, мембраны и т.д.), которые производятся с использованием таких клеток. Примеры содержат данные о том, как такие технологии использовались для характеристики ННАЛРС и потомства ННАЛРС, например, проводя анализ наличия клеточных поверхностных антигенов перед тем, как провести более подробный и сравнительный анализ с другими клетками-предшественниками печени или первичными клетками взрослой печени, чтобы оценить их отличительные признаки и биологическую активность.

На белковом уровне такие технологии, как проточная цитометрия или иммуноцитохимия, позволяют определять присутствие/отсутствие поверхностных или внутриклеточных белков в ННАЛРС с ис-

пользованием антител или других специфических для белков реагентов. Проточная цитометрия представляет собой предпочтительную технологию для характеристики клеточных популяций в соответствии с комбинированным присутствием/отсутствием поверхностных или внутриклеточных маркеров, определяемых с помощью однократной или множественной техники окрашивания и/или оценки размера и granularity. Иммуноцитохимия также предоставляет информацию о морфологических признаках, которые связаны с комбинированным присутствием/отсутствием поверхностных, цитоскелетных и/или других внутриклеточных маркеров.

В частности, присутствие по меньшей мере одного мезенхимального маркера, одного маркера адгезии, одного тетраспаина, одного маркера, выбранного из CD98, CD140b и β 2-микроглобулина, и по меньшей мере одного печеночного маркера следует измерять с помощью проточной цитометрии, иммуноцитохимии или любого другого способа (как правило, использующего антитела, лектины или другие белки и не требующего экстракции белка или нуклеиновой кислоты), что позволяет оценить процент клеток, презентующих рецептор. Положительность в отношении дополнительных маркеров клеточной поверхности, отличных от тех, которые строго связаны с печеночными или мезенхимными особенностями (такие как положительные маркеры, которые указаны в примерах), можно точно измерять. Положительность с помощью проточной цитометрии и иммуноцитохимии в настоящем документе определяют, когда по меньшей мере 60% клеток презентуют желаемый маркер или рецептор (как показано в примерах). Точно так же отрицательность по проточной цитометрии и иммуноцитохимии в настоящем документе определяют, когда менее чем 20% клеток презентуют данный маркер или рецептор (как показано в примерах). Согласно некоторым вариантам осуществления менее чем 10% клеток презентуют данный отрицательный маркер. Когда речь идет о маркерах клеточной поверхности, положительность предпочтительно измеряется в клетках с непроницаемой мембраной.

Согласно некоторым вариантам осуществления при измерении данного маркера средство, которое используют для обнаружения определенного выше маркера или белка клеточной поверхности, иммобилизуют на твердой фазе (например, шарике, пластине или биоматериале), метят (например, флуоресцентно) и/или распознают другим соединением, которое помечено (например, вторичное антитело). Существует множество способов, посредством которых метка может производить сигнал, обнаруживаемый внешними средствами, например, желательно посредством визуального осмотра или электромагнитного излучения, нагревания и химических реагентов. Метка или другой компонент, производящий сигнал, также может быть связан с конкретным связывающим партнером, другой молекулой или с подложкой, такой как шарики, с использованием любого способа, известного в настоящей области техники, такого как химическое сшивание или использование системы биотин-стрептавидина. Метка может непосредственно производить сигнал, и поэтому для получения сигнала не требуются дополнительные компоненты. Многочисленные органические молекулы, например флуорохромы (такие как FITC, PE, PC5, PC7, APC или любые другие, известные как совместимые с проточной цитометрией), поглощают ультрафиолетовый и видимый свет. Другие типы меток непосредственно производят сигнал, такой как радиоактивные изотопы и красители. Альтернативно, метке могут потребоваться другие компоненты для произведения сигнала, и тогда система формирования сигнала будет включать все компоненты, необходимые для получения измеримого сигнала, которые могут включать в себя подложки, коферменты, ионы металлов или вещества, которые реагируют с ферментативными продуктами (например, хемилюминесцентное обнаружение пероксидазы хрена).

Специфическая для печени метаболическая активность ННАЛРС предусматривает биологическую активность, как правило, связанную с клетками печени (в частности, с гепатоцитами) и отличающую клетки печени от клеток, присутствующих в других тканях, и, в частности, предусматривает активности, связанные со связыванием, активацией и/или деградацией белков или других субстратов, как описано в литературе и в примерах. Эти биологические активности устанавливаются на основе обнаружения специфических для печени метаболических активностей, которые могут представлять собой активность связывания белка/лекарственного средства и более предпочтительно ферментативную активность на данных подложках или в сочетании со специфическими для печени молекулами, которые обнаруживаются с помощью технологий блоттинга (вестерн- или нозерн-блот), секвенирования, изоэлектрофокусировки, ELISA или интернализации синтетических или натуральных соединений, которые, как известно, специально транспортируются и метаболизируются в клетках печени. Другие соответствующие ферментативные активности, отличные от тех, которые строго связаны с функциями печени, могут быть аналогичным образом измерены и сопоставлены с другими, измеренными в гепатоцитах или других типах клеток, с использованием описанных в литературе способов. В зависимости от альтернативных подходов и применений активности, связанные с эндотелием (например, в связи с прохождением через этот барьер и достижения ткани) или крови (например, в связи со свертыванием), можно измерять *in vitro* или в соответствующих моделях *in vivo*.

На уровне нуклеиновой кислоты полногеномное секвенирование, ПЦР или кПЦР в реальном времени можно использовать для характеристики ННАЛРС или потомства ННАЛРС. Таким образом, ПЦР в реальном времени можно использовать для количественной оценки экспрессии исследуемого гена в зависимости от количества циклов и нормализации его по отношению к циклам, полученным для 1 или

более эндогенных контролей. В частности, реакцию ПЦР в реальном времени можно проводить с использованием ННАЛРС и соответствующих праймеров и буферов, но количество циклов для получения сигнала не должно превышать 25, 30 или 35 циклов.

На уровне активности присутствие специфической для печени метаболической активности может быть измерено с помощью любого подходящего способа, который позволяет оценивать присутствие и/или уровень активности специфических для печени ферментов, но предпочтительно должен позволять количественно определять *in vitro* фактическую ферментативную активность с заданным пределом обнаружения конкретного конечного продукта (как его легко установить с помощью литературы и коммерчески доступных продуктов) для измерения активности СYP450, детоксикации, хранения гликогена, секреции α -1-антитрипсина или альбумина, производства желчи, производства тромбopoэтина, производства ангиотензиногена, конверсии аммиака в мочевины, синтеза холестерина, гликогенолиза, гликогенеза и липогенеза. В частности, положительность, по меньшей мере, по отношению к метаболической активности, специфической для печени, в настоящем документе определяется, когда активность измеряется как статистически выше предела обнаружения конечного продукта (по меньшей мере в два раза, пять раз или в десять раз больше, чем предел обнаружения) или приближается к уровню активности первичных гепатоцитов (превосходя, идентично или ниже не более чем на 10%, не более чем на 25%, не более чем на 50%, не более чем на 75% или не более чем на 90%).

В литературе подробно описываются технологии оценки активности цитохрома P450 в гепатоцитах человека *in vitro*, в частности, в отношении соединений, специально индуцирующих активность фермента и форматов, которые могут быть использованы для проведения этих экспериментов (Gerets H.H. et al., 2012; Gomez -Lechon M.J. et al., 2012). Среди различных индукторов метаболизм лекарственных средств в этих клетках может быть оценен с использованием мидазолама, этоксирезорубина, бензоксирезорфина, бупропиона, фенацетина, диклофенака, толбутамида, фенobarбитала, рифампицина, кофеина, β -нафтофлавона, омепразола, декстрометорфана, 3-метилхолантрена, репаглинида или других известных цито/гепатотоксических соединений в качестве зондов, перечисленных в литературе (Bale S. et al., 2014). Обнаружение и количественное определение метаболитов может быть связано с активностью печеночных ферментов на конкретных соединениях, таких как СYP1A2 (путем обнаружения параксантина или ацетаминофена), СYP3A4 (путем обнаружения 1-ОН-мидазолама или омепразола сульфата), СYP2C6 (путем обнаружения НО-бупропиона), СYP2C9 (путем определения 4'НО-диклофенака), а также для других основных активностей цитохрома P450, таких как СYP1A2, СYP3A5, СYP3A7 или СYP7A1 (сингулярно или в соответствующих комбинациях).

Другими ферментами, чья экспрессия или (предпочтительно) активность может быть установлена в ННАЛРС и потомстве ННАЛРС, являются UDP-глюкуронозилтрансферазы (такие как UGT1A1, UGT2B4, UGT2B7), сульфотрансферазы (катализирующие конъюгацию сульфата нескольких фармакологически важных эндогенных молекул и ксенобиотиков), тирозинтрансферазы, триптофан-2,3-диоксигеназа (TDO2 или TDO), индоламин-2,3-диоксигеназы IDO1 или IDO2), лизилоксидаза (LOX), глутатион-S-трансферазы (например, GST- α), белки с множественной лекарственной устойчивостью (MDR или MRP-1/-2/-3), специфические для печени транспортеры (такие как OATP1B1) и другие ферменты биотрансформации фазы I/II/III. Кроме того, можно также измерять и сравнивать производство и секрецию альбумина/мочевины, метаболизм аммиака, накопление гликогена, образование желчи, производство тромбopoэтина/ангиотензиногена и скорость удаления галактозы/сорбита и сопоставлять их с использованием хорошо установленных протоколов.

Когда препарат ННАЛРС получают способами по настоящему изобретению, эту популяцию клеток можно поддерживать и/или размножать в условиях, которые позволяют рост и удвоение без дифференциации. Предпочтительно ННАЛРС пассируют как недифференцированные адгезивные клетки не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4 или не более чем 5 раз в культуре, так что можно оценить количество удвоений клеток для установления наиболее подходящих условий для дальнейшего применения *in vivo* или *in vitro*. После одного или нескольких пассажей в этом статусе ННАЛРС могут быть индуцированы для дифференциации в гепатоцитоподобные или гепатоактивные клетки. В обоих случаях полученные клетки представляют собой потомство ННАЛРС. В первом случае условия для поддержания ННАЛРС в виде недифференцированного потомства ННАЛРС могут быть теми же, что и для получения исходной популяции ННАЛРС с целью увеличения количества доступных клеток.

Следуя стадии (e) способов по настоящему изобретению, необязательная дополнительная стадия (f) может предусматривать поддержание ННАЛРС в условиях культивирования клеток, что позволяет дифференцировать клетки, представляющие специфические для печени активности, например гепатоцитоподобные или гепатоактивные клетки (например, клетки-предшественники взрослой печени, которые потеряли свою положительность к большинству, если не ко всем, мезенхимальным маркерам, и являются положительными в отношении большинства, если не всех, морфологических, биологических и функциональных признаков гепатоцитов). Альтернативно, потомство ННАЛРС представляет комбинацию печеночных и других специфических для ткани признаков, которые относятся к конкретному процессу изготовления по GMP, составу, сайту введения или одновременному применению других соединений *in vivo*.

Эти свойства могут быть связаны, в частности, с белками, обладающими иммунорегуляторными особенностями, которые экспрессируются на поверхности клеток или секретируются, как описано в литературе для ADHLSC (Berardis S. et al., 2014; Sana G. et al., 2014; Raicevic G. et al., 2015).

Дополнительные пассажи (например, отделение и диспергирование клеток, пересев и т.д.) и культивирование (например, добавление или изменение среды после конфлоэнции и т.д.) могут выполняться в условиях, по существу, идентичных или аналогичных условиям описанного выше первого пассажа или включающих модификации, которые будут предложены в литературе и/или для конкретного применения ННАЛРС или потомства ННАЛРС. Таким образом, условия для поддержания и/или дифференцировки ННАЛРС или потомства ННАЛРС в культуре клеток могут быть дополнительно оптимизированы в соответствии с различными критериями, такими как время/среда для дифференцировки в гепатоцитоподобные или гепатоактивные клетки, системы для поддержания трехмерной культуры клеток в виде клеточных суспензий, использование конкретных подложек или каркасов, гипоксия, комбинированное или последовательное добавление факторов роста и химических соединений в клеточной культуральной среде или плотность клеток.

Во время таких более поздних пассажей активность и общий фенотип потомства ННАЛРС могут быть дополнительно адаптированы и/или улучшены для окончательного хранения, составления и/или использования функции путем конструирования клеток на уровне экспонированных белков клеточной поверхности и/или их гликозилирования *in vitro*, без генетической манипуляции, в частности, для улучшения приживления клеток, например, путем добавления групп сиалированного антигена Lex или пептидов (Sarkar D. et al., 2011; Wan X. et al., 2013; Cheng H. et al., 2012). Потомство ННАЛРС может быть также культивировано в определенных условиях на заключительной стадии (непосредственно перед применением или хранением), так что некоторые свойства лучше поддерживаются, например, путем культивирования на термочувствительном полимере или других подложках, которые обеспечивают более мягкое высвобождение клеток (Nash M. et al., 2013; You J. et al., 2013; Nagase K. et al., 2015). Дальнейшие модификации клеточной культуральной среды (такие как культивирование в гипоксических условиях с антиоксидантами или путем добавления цитокинов или других соединений, таких как ликопин), которые могут улучшить приживление клеток, активность *in vivo* или уменьшить апоптоз, могут быть применены в качестве предварительной обработки в соответствии с литературой (Kavanagh D. et al., 2014; Kim J.Y. et al., 2015; Zeng W. et al., 2015).

Способы по настоящему изобретению обеспечивают ННАЛРС, представляя морфологические особенности, экспрессию белка и функциональные особенности, которые отличаются от тех, которые определены в ранее описанных клетках-предшественниках взрослой печени. Следовательно, ННАЛРС, которые получены или получают с помощью определенных выше способов, представляют собой еще один вариант осуществления настоящего изобретения. Эти способы позволяют обеспечить популяцию клеток, содержащую значительную долю специфических клеток (по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более), даже приводя, по существу, к гомогенной популяции клеток, поскольку она может быть оценена с помощью любого подходящего стандартного способа, например с помощью проточной цитометрии или любого другого способа иммуноокрашивания, с оценкой дальнейшей биологической активности или без нее.

ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут быть использованы для установления клеточных культур для любого немедленного применения или для хранения в виде криоконсервированных препаратов, каждый из которых содержит по меньшей мере 10^3 , 10^6 , 10^9 клеток или более, для получения или применения большего количества ННАЛРС или потомства ННАЛРС после надлежащего оттаивания препаратов и, если необходимо, для производства ННАЛРС и потомства ННАЛРС в промышленных масштабах (например, с использованием биореакторов, мембран, микросфер, микрогидродинамики или любого другого технического решения для улучшения биообработки и размножения клеток при сохранении желаемых свойств клеток). Образцы клеточных популяций, соответствующие любому из ННАЛРС и потомства ННАЛРС, могут быть подвергнуты криохранению в содержащей сыворотку среде или среде, свободной от сыворотки (например, коммерчески доступные композиции для криоконсервирования), и/или в присутствии криозащитного средства (например, диметилсульфоксида в соответствующей концентрации). Потомство ННАЛРС может быть совместимо с коммерческими системами, разработанными для применения на органах на чипе в испытаниях безопасности, патофизиологических исследованиях и других микрогидродинамических моделях печени на основе клеток для разработки лекарств и токсикологии (Al  r  e N. et al., 2014; Lin C. et al., 2015).

В частности, препараты ННАЛРС и потомства ННАЛРС, содержащие предопределенное количество клеток (например, 50000, 100000, 500000, 1 миллион, 10 миллионов, 100 миллионов, 1 миллиард или более клеток), могут быть предоставлены в одном или нескольких флаконах, которые могут быть затем включены в набор, содержащий такие флаконы (или другой подходящий сосуд или контейнер, например, используемый для микроструйных применений), которые затем могут быть включены в набор, содержащий такие флаконы, контейнеры, микроструйный аппарат и любое другое подходящее устройство, одно-разовые материалы (например, фильтры, шприцы), растворы (например, PBS, среда для культивирования клеток, разбавитель), химические вещества (например, ферментативные субстраты, флуорохромы, лекар-

ственные средства), биологические продукты (например, факторы роста, антитела, праймеры) и/или инструкции для применения компонентов такого набора, могут быть соответствующим образом упакованы и отправлены клиентам для применения ННАЛРС и потомства ННАЛРС *in vivo* (например, для введения пациенту или животному) или *in vitro* (например, для исследования токсичности или эффективности соединений в качестве потенциальных лекарственных средств).

Поддержание, пролиферация и/или дифференциация ННАЛРС и потомства ННАЛРС в условиях культивирования клеток (или после имплантации в животную модель или пациента) могут быть выполнены, как требуется для желаемого применения. В литературе приводятся несколько протоколов для поддержания клеток-предшественников печени и/или получения из них гепатоцитоподобных или гепатоактивных клеток. Примеры обеспечивают средства для получения ННАЛРС и потомства ННАЛРС в условиях культивирования клеток и для их дифференцировки в клетки, представляющие специфические для печени активности в виде адгезивных клеток или в виде трехмерных клеточных кластеров.

В этом последнем случае ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут быть предусмотрены для желаемого применения в виде трехмерных клеточных кластеров, подобных сфероидам или органоидам печени, которые, согласно литературе, могут обеспечить клеткам значительное улучшение жизнеспособности и функциональности при введении внутрь печени или вне ее, используемых для исследования гепатотоксичности соединений, поддерживаемых в виде криоконсервированных препаратов, разведенных в биореакторах или многослойных флаконах для укрупнения процесса изготовления или применения во вспомогательных устройствах печени (Ebrahimkhani M. et al., 2014; Lancaster M.A. et al., 2014; Massie I. et al., 2011). ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут быть получены также путем инкапсуляции клеток в синтетические или биологические матрицы. В частности, печеночные децеллюляризованные каркасы или внеклеточные матрицы могут применяться в качестве каркасов для культивирования одного или нескольких типов клеток, в качестве двумерного покрытия субстрата и трехмерной инъекционной гидрогелевой платформы для получения печеночных органоидов (Lee J. et al., 2014; Caralt M. et al., 2014).

Поддержание, пролиферация и/или дифференциация ННАЛРС и потомства ННАЛРС могут быть улучшены путем адаптации условий культивирования клеток с использованием технических решений, хорошо известных в настоящей области техники для стволовых клеток, клеток-предшественников или мезенхимальных клеток разного происхождения. Например, протоколы *ex vivo* неклеточной разрушающей атмосферы с низким содержанием кислорода и другие подходы к адаптации микросреды *in vitro* могут способствовать выживанию, генетической стабильности, пролиферации, дифференциации после трансплантации, хоминга и репопуляции в печени, секреции паракринных факторов и общему терапевтическому потенциалу таких клеток (Muscari C. et al., 2013; Cigognini D. et al., 2013). В противном случае компоненты, полученные из крови человека, такие как сыворотка пуповинной крови и лизат тромбоцитов, исследуют и развивают как компоненты культуры клеток, которые не являются ксеногенной альтернативой бычьей сыворотке и по-прежнему совместимы с руководящими принципами GMP для получения клинических клеточных композиций без известных проблем, связанных с сывороткой, таких как непостоянство качества, риск заражения и нежелательные иммунизующие эффекты (Vieback K., 2013).

Перед введением или иным применением ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут быть временно или стабильно модифицированы путем воздействия на указанные клетки гетерологичными биологическими или химическими средствами или путем введения указанных средств в клетки. В частности, ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут быть модифицированы (или сконструированы после их трансформации соответствующими векторами) в культуре клеток (например, после и/или до их дифференциации) путем обработки клеток факторами роста и/или введения нуклеиновых кислот, которые влияют на общий профиль экспрессии клеток, предпочтительно по отношению к специфическим печеночным признакам или особенностям, способствующим клеточной культуре (например, путем трансдуцирования клеток с микроРНК или лентивирусными векторами, экспрессирующими рекомбинантные белки, такие как факторы роста или факторы транскрипции, которые, как известно, влияют на печеночную дифференциацию или дифференциацию по отношению к любому другому типу клеток, и/или производство представляющих терапевтический интерес белков или флуоресцентных белков).

В частности, ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут, следовательно, представлять улучшенные и/или дополнительные биологические активности *in vivo* и/или *in vitro* после и/или до их дифференцировки в клетки, представляющие полный спектр специфических для печени видов активности. Предпочтительно ННАЛРС и потомство ННАЛРС спроектированы до того, как они дифференцируются, так что потомство ННАЛРС последовательно модифицируют, чтобы улучшить биологическую активность независимо от любой последующей дифференциации *in vitro* или *in vivo* (что может подразумевать или не подразумевать печеночный или другой тип дифференцировки).

Воздействие на потомство ННАЛРС химическими средствами, клеточной культуральной средой и/или векторами из нуклеиновых кислот, которые известны как индуцирующие дифференцировку других известных клеток-предшественников/стволовых клеток печени в другие типы непеченочных клеток (например, остециты, продуцирующие инсулин β -клетки или клетки костного мозга), могут в равной степени обеспечивать такие типы непеченочных клеток. Непеченочные клеточные популяции, которые получают путем применения этих технологий, известных в литературе, к ННАЛРС (или любому кон-

кретному типу потомства ННАЛРС), представляют собой дополнительные типы дифференцированного потомства ННАЛРС, чем те, которые описаны в примерах (полученные с использованием клеточной культуральной среды для индуцирования печеночной дифференцировки), которые могут быть использованы *in vitro* и/или *in vivo* (в частности, для терапевтических целей) в соответствии с биологической активностью, которую потомство ННАЛРС потеряло и/или приобрело как следствие такого воздействия (например, дифференцированное потомство ННАЛРС, которое производит и секретирует инсулин, может использоваться для лечения сахарного диабета).

Обычные способы переноса генов, применимые к клеткам-предшественникам печени, могут быть использованы для введения нуклеиновых кислот в ННАЛРС и потомство ННАЛРС, включая в себя микроинъекцию, электропорацию, совместное осаждение фосфатом кальция, липосомы или трансфекцию вируса. После их трансформации соответствующими векторами ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут экспрессировать рекомбинантные белки или содержать нуклеиновые кислоты, которые позволяют указанным клеткам выполнять улучшенные и/или дополнительные биологические активности *in vivo* и/или *in vitro* после и/или до их дифференцировки в гепатоцитоподобные или гепатоактивные клетки (например, в рамках создания моделей на основе клеток-предшественников печени для генной терапии). Когда векторы представляют собой вирусные векторы (например, лентивирусный вектор), они будут характеризоваться определением их титра, чтобы выбрать оптимальные условия эффективности трансдукции и скорости пролиферации, а также проанализировать их профиль экспрессии, а также их безопасность.

Печень анатомически связана с системой кровообращения таким образом, что она позволяет эффективно высвобождать различные белки в кровоток. Поэтому гены, кодирующие белки, которые имеют системные эффекты, могут быть встроены в ННАЛРС и потомство ННАЛРС (в частности, перед культивированием для получения трехмерных клеточных кластеров) для дальнейшего повышения их эффективности (особенно при системном введении, например, посредством внутривенной, внутримышечной или внутрибрюшинной инъекции), а также для их приживания и поддержания при введении *in vivo*.

Например, множество генов, кодирующих гормоны или антитела, может быть встроено в клетки печени по настоящему изобретению для секреции их генных продуктов в кровообращение. В частности, ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут быть модифицированы таким образом, чтобы конститутивно или временно сверхэкспрессировать белок, как правило, экспрессируемый гепатоцитами (и, возможно, уже экспрессируемый такими клетками), но являющийся дефектным или отсутствующим у пациента (этот дефект, лежащий в основе патологического состояния как при врожденных ошибках метаболизма печени), а затем помочь восстановить производство белка и тем самым помочь в лечении пациента. Примерами таких белков являются метаболические ферменты, такие как лиаза, аргиназа, глюкокиназа, орнитинтранскарбамилаза, аргиносукцинатсинтетаз, аригинонукцинаткарбамилфосфатсинтаза, N-ацетилглутаматсинтаза, глутаминсинтетаз, гликогенсинтетаз, глюкозо-6-фосфатаза, щелочная фосфатаза, сукцинатдегидрогеназа, пируваткиназа, ацетил-CoA-карбоксилаза, синтетаз жирных кислот, аланинаминотрансфераза, глутаматдегидрогеназа, ферменты цитохрома P450, альдегиддегидрогеназы и/или алкогольдегидрогеназа. Альтернативно, ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут быть модифицированы путем введения ДНК, кодирующей секретируемый белок плазмы, такой как альбумин, фактор роста или гормон, инсулин, трансферрин, белки комплемента (такие как компонент C3), α 2-макрोगлобулин, α / β / γ -цепь фибриногена, факторы коагуляции (фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор XI, фактор XIII, фактор IX), α -1-антитрипсин и т.п.

Биологические материалы, полученные при производстве ННАЛРС и потомства ННАЛРС, могут быть дополнительно использованы для идентификации биологических объектов, которые могут иметь специфическое применение, в частности, в различных медицинских применениях. Эти биологические материалы включают в себя не только субпопуляции (или клеточные линии) ННАЛРС или потомства ННАЛРС, которые презентуют специфические маркеры, активности и/или морфологию (как определено в примерах 3 и 4), но также и любой другой биологический объект, который получают как промежуточные или конечные продукты, такие как кондиционированные клеточные культуральные среды и фракции этих клеток и среды, включая в себя белки, метаболиты, клеточные везикулы и/или нуклеиновые кислоты, которые могут быть использованы в качестве биомаркеров для обнаружения представляющих медицинский интерес клеток или в качестве соединений, которые представляют активность или зону медицинских интересов. Дополнительная информация может быть также определена путем измерения содержания кондиционированной клеточной культуральной среды (например, в виде супернатанта клеточной культуры), которая может предоставлять соответствующую информацию о секрете и, в частности, о паракринном воздействии ННАЛРС и потомства ННАЛРС.

Соответствующие биологические особенности ННАЛРС или потомства ННАЛРС можно идентифицировать с использованием таких технологий, как проточная цитометрия, иммуноцитохимия, масс-спектрометрия, гель-электрофорез, иммуноанализ (например, иммуноблоттинг, вестерн-блоттинг, иммунопреципитация, ELISA), амплификация нуклеиновой кислоты, ферментативная активность, технологии-омики (протеомика, гликомика, транскриптомика, метаболомика) и/или другая биологическая активность. В частности, "технологии-омики" могут обеспечивать дополнительные средства для сравнения

ННАЛРС или потомства ННАЛРС с использованием баз данных и других наборов данных, которые публикуются для стволовых клеток или клеток-предшественников и, в частности, для клеток-предшественников печени (Yu J., et al., 2012; Santamaria E., et al., 2012; Slany A., et al., 2010; Sison-Young R. et al., 2015). Эти дополнительные маркеры могут использоваться либо на начальной стадии получения потомства ННАЛРС, либо позже (например, для сравнения и проверки промышленно изготовленных партий потомства ННАЛРС или для оценки пригодности для фармацевтического применения).

Эти подходы могут служить средством для определения новых биомаркеров, связанных с клетками-предшественниками взрослого организма, как *in vivo*, так и *in vitro* (например, для установления количества, качества и гомогенности популяции клеток до, во время или после получения и применения). В частности, биомаркеры могут быть определены посредством концентрации данной популяции клеток (ННАЛРС и/или потомство ННАЛРС) в биологическом образце или в культуре клеток вообще или в сочетании с концентрацией клеток, которые презентуют специфический белок, липид, фермент, фосфолипид и/или гликаны. Такие биомаркеры могут соответствовать пептиду, белку, фосфолипиду, липиду, нуклеиновой кислоте, гликану или любым комбинациям компонентов таких элементов. Биомаркер может быть специфическим для оценки пригодности клеточной популяции, являющейся ННАЛРС или потомством ННАЛРС, для данного применения (например, лечения специфического заболевания печени, получения гепатоактивных типов клеток, следующих за дифференцировкой или модификацией *in vitro* химическими средствами и/или векторами-нуклеиновыми кислотами, оценивая метаболизм конкретного соединения), в частности, при сравнении потомства ННАЛРС, полученного от разных доноров и/или путем применения различных производственных процессов. В противном случае биомаркер может оценить, действительно ли данная ткань печени (или образец свежих или криоконсервированных клеток печени) подходит для более эффективного получения ННАЛРС (например, путем скрининга банков тканей печени и библиотек других биологических образцов, полученных из печени, таких как библиотеки белковых экстрактов и кДНК) для определения того, какие доноры и/или образцы могут быть выбраны.

Термин "биомаркер" или "маркер" относится к молекуле, параметру, характеристике или объекту, который объективно измеряется и оценивается как характеристика ННАЛРС и потомства ННАЛРС. Количественная оценка биомаркера, связанного с ННАЛРС и/или потомством ННАЛРС в конкретном образце (таком как ткань или биологическая жидкость), может быть связана с количественной оценкой всех клеток, с эффективностью, с которой ННАЛРС и/или потомство ННАЛРС может быть произведено и выделено, с конкретной технологией *in vitro* или с конкретным медицинским применением или статусом пациента.

ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут применяться в регенеративной медицине и в биологических анализах, требующих клетки, которые характеризуются биологическими особенностями (такими как метаболические или ферментативные активности, антигенный профиль или другой фенотип), которые как можно более близки к тем, которые наблюдаются для первичных гепатоцитов в течение желаемого периода времени, как только они дифференцируются как *in vivo*, так и *in vitro*, или даже до индуцирования полной дифференциации по отношению к клеткам, представляющим большее количество и/или более сильную специфическую для печени активность (т.е. гепатоактивные клетки). ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут также использоваться для применений *in vitro*, таких как фармакологические или токсикологические исследования (например, скрининг и характеристика биологических или химических средств). ННАЛРС и потомство ННАЛРС позволяют создавать *in vitro* и животные модели токсикологии, фармакологии и фармакогенетики (как широко описано для первичных гепатоцитов и гепатоцитоподобных клеток, полученных из клеток-предшественников или стволовых клеток различного происхождения) или идентифицировать биомаркеры для идентификации *in vivo* и/или *in vitro* клеточной популяции, представляющей медицинский интерес, в частности в связи с диагнозом, профилактикой и/или лечением заболеваний печени.

Используемый в настоящем документе термин "*in vitro*" означает снаружи или за пределами организма животного или человека. Используемый в настоящем документе термин "*in vitro*" следует понимать как включающий в себя "*ex vivo*". Термин "*ex vivo*", как правило, относится к тканям или клеткам, удаленным из организма животного или человека и поддерживаемым или размножаемым вне организма, например, в культуральном сосуде или биореакторе.

Если ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут быть предпочтительно использованы для применений *in vivo*, потомство ННАЛРС, которое дифференцировано *in vitro*, может предпочтительно применяться в качестве дифференцированных гепатоцитоподобных или гепатоактивных клеток для обнаружения/подтверждения лекарственных средств.

ННАЛРС и потомство ННАЛРС (или соответствующие биологические материалы, которые получают при их создании) могут быть предусмотрены в содержащих их композициях и, в частности, в виде фармацевтических композиций, которые могут применяться в терапевтических способах для *in vivo* введения (у людей или на животных моделях) или применений *in vitro* в виде композиции, включающей в себя такие клетки либо в виде свежих клеток, либо в виде клеток, пригодных для длительного хранения (например, криоконсервированных клеток).

Предпочтительно композиция, содержащая ННАЛРС или потомство ННАЛРС, может содержать по

меньшей мере 10^3 , 10^6 , 10^9 или более клеток (например, от 5 миллионов до 500 миллионов или от 5 миллионов до 250 миллионов, или от 50 миллионов до 500 миллионов, или от 50 миллионов до 250 миллионов, или от 100 миллионов до 500 миллионов, или от 100 миллионов до 250 миллионов клеток для каждой дозы или введения). Такие композиции на основе клеток могут также включать в себя другие средства биологического (например, антитела или фактор роста) или химического происхождения (например, лекарственные средства, консервирующие клетки или метящие соединения), которые могут обеспечить дополнительный терапевтический, диагностический или любой другой полезный эффект. В литературе представлено несколько примеров необязательных добавок, вспомогательных веществ, наполнителей и/или носителей, которые совместимы с фармацевтическими композициями на основе клеток, которые могут включать в себя дополнительные специфические буферы, факторы роста или адьюванты, причем количество каждого компонента композиции определено (с точки зрения микрограмм/миллиграммов, объема или процента), а также средств для их комбинирования с ННАЛРС и потомством ННАЛРС.

ННАЛРС и потомство ННАЛРС можно вводить в виде композиции, которая в зависимости от выбранного способа введения может представлять собой суспензию клеток, губку или другую трехмерную структуру, где клетки могут расти и дифференцироваться *in vitro* и/или *in vivo*, включая в себя биоискусственную печень, природные или синтетические матрицы или другие системы, делающие возможным приживание и функционирование клеток в соответствующих местах (включая в себя области воспаления или повреждения тканей, которые экспрессируют хемокины, которые помогают хомингу и приживлению клеток). В частности, ННАЛРС и потомство ННАЛРС можно вводить путем инъекции (охватывая также введение катетера, внутривенное или внутриартериальное) или имплантации, например, локализованной инъекции, системной инъекции, внутриселезеночной инъекции, внутрисуставной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, интрапортальной инъекции, инъекции в паренхиму печени, например, под капсулу печени, парентерального введения или внутриматочной инъекции в эмбрион или плод.

При системном и не локальном введении продукт ННАЛРС может характеризоваться эффектом в отдаленном месте либо потому, что такие ННАЛРС перемещаются в кровотоку и трансплантируются в отдаленные места (такие как внутренние органы или суставы), либо секретируемые ННАЛРС белки достигают определенных типов клеток, благодаря кровотоку. Кроме того, ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут использовать биологические компоненты детоксикационных устройств, таких как перфузия печени или вспомогательные устройства для печени с жесткой, пластиковой наружной оболочкой и полыми полупроницаемыми мембранными волокнами, в которых высевают ННАЛРС или потомство ННАЛРС (как и другие стволовые клетки, первичные клетки человека, такие как дифференцированные гепатоциты или типы клеток, происходящие из стволовых клеток). Жидкость организма может протекать через устройство для детоксикации в соответствии с известными процедурами, а затем возвращаться пациенту.

ННАЛРС, потомство ННАЛРС или содержащая их композиция могут быть использованы для тканевой инженерии и клеточной терапии путем трансплантации клеток печени (LCT) во внутripеченочные или внепеченочные места (в том числе для модуляции иммунологического ответа на предшествующую или последующую трансплантацию печени или других органов и тканей). Используя этот подход, животные модели заболеваний печени человека могут быть также получены путем трансплантации ННАЛРС человеческого происхождения, потомства ННАЛРС человеческого происхождения или содержащей их композиции животным, причем воздействие соединения на гепатоциты человека может быть более эффективно оценено и отделено от эффектов на животной модели.

При введении терапевтической композиции, содержащей ННАЛРС или специфическое потомство ННАЛРС, ее, как правило, можно вводить в виде стандартной дозы. В любом случае может быть желательно включать средства и/или адаптировать известные способы для введения клеток пациентам, которые обеспечивают жизнеспособность ННАЛРС или потомства ННАЛРС, например, путем включения клеток в биополимер или синтетический полимер. Примеры подходящих биополимеров включают в себя, без ограничения, фибронектин, фибрин, фибриноген, тромбин, коллаген и протеогликаны, ламинины, молекулы адгезии, протеогликаны, гиалуронаны, цепи гликозаминогликанов, хитозан, альгинат, природные или синтетически модифицированные пептиды, которые получают из таких белков, и синтетические, биоразлагаемые и биосовместимые полимеры. Эти композиции могут быть получены с включением цитокинов, факторов роста или без них и введены в виде суспензии или в виде трехмерного геля с клетками, встроенными в него.

Способы по настоящему изобретению рассматривают не только использование любого донора тканей печени для получения ННАЛРС или потомства ННАЛРС, но и использование собственной ткани печени пациента для производства и выделения ННАЛРС и получения потомства ННАЛРС или содержащей их композиции. Такие клетки будут аутологичны пациенту и могут быть легко введены пациенту. В противном случае ННАЛРС могут быть произведены и выделены из ткани, которая не является тканью пациента. Когда предполагается введение таких клеток пациенту, может быть предпочтительным, чтобы ткань печени, подвергнутая способу по настоящему изобретению для получения ННАЛРС, выбиралась таким образом, чтобы максимизировать, по меньшей мере, в достижимых пределах, совместимость тканей между пациентом и вводимыми клетками, тем самым уменьшая вероятность отторжения вводимых клеток иммунной системой пациента (например, отторжение трансплантата против хозяина).

Проблема терапевтического применения ННАЛРС и потомства ННАЛРС заключается в количестве клеток, необходимых для достижения оптимального эффекта. Дозы для введения могут варьировать, могут предусматривать начальное введение с последующими введениями и могут быть установлены квалифицированным специалистом, применяя идею настоящего раскрытия. Как правило, вводимая доза или дозы будут обеспечивать терапевтически эффективное количество клеток, и для этого может потребоваться оптимизация количества вводимых клеток. Таким образом, количество подлежащих введению клеток будет изменяться для подлежащего лечению субъекта (например, от 10^2 до 10^{10} клеток на каждое воздействие в цикле или всего цикла воздействия, например, от 1×10^6 до 1×10^7 клеток/кг массы тела, или от 2×10^6 до 8×10^6 клеток/кг массы тела, или от 3×10^6 до 5×10^6 клеток/кг массы тела субъекта на каждое воздействие в цикле или, например, от 1×10^6 до 1×10^8 клеток/кг массы тела, или от 5×10^6 до 5×10^7 клеток/кг массы тела, или от 1×10^7 до 2×10^7 клеток/кг массы тела субъекта на весь цикл воздействия). Однако точное определение терапевтически эффективной дозы может быть основано на факторах, характерных для каждого пациента, включая в себя его размер, возраст, размер повреждения ткани и времени с момента возникновения повреждения.

Предпочтительно композиции, содержащие ННАЛРС или специфическое потомство ННАЛРС, должны содержать, по существу, гомогенную клеточную популяцию, как определено выше, и количество клеток в пределах каждой дозы может быть впоследствии отрегулировано.

Распределение, дифференциация и/или пролиферация ННАЛРС или потомства ННАЛРС после их введения или имплантации могут быть определены (а также их активность после/до введения другого терапевтического средства) и могут быть исследованы у человека или на животных моделях (предпочтительно грызуны). Например, анализ печени мышей SCID с внутриселезеночными трансплантированными ННАЛРС или потомством ННАЛРС может продемонстрировать, что эти клетки способны проникать в печень и восстанавливать популяцию органа путем обнаружения человеческого маркера и дифференцироваться в активные зрелые гепатоциты посредством обнаружения альбумина человека или любого другого типичного человеческого специфического для печени маркера (или рекомбинантного гена, который ранее был трансфицирован у введенных ННАЛРС или потомства ННАЛРС).

Другим аспектом настоящего изобретения является способ профилактики и/или лечения заболевания печени, предусматривающий введение ННАЛРС, потомства ННАЛРС или содержащей их композиции нуждающемуся в этом субъекту. ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут применяться для лечения заболеваний печени, в частности тех, которые требуют постоянного (или ограниченного по времени) восстановления функции печени у субъекта, который, согласно литературе, требует трансплантации печени, трансплантации гепатоцитов или регенерации печени, учитывая потерю массы и/или функции печени, которая наблюдается и которая может быть сгруппирована в разные категории.

Способ лечения заболевания печени предусматривает введение продукта ННАЛРС, такого как ННАЛРС или данное потомство ННАЛРС, и предпочтительно в композиции, нуждающемуся в этом субъекту. В частности, способ лечения заболевания у нуждающегося в этом пациента предусматривает введение пациенту эффективного количества продукта ННАЛРС, причем заболевание предпочтительно представляет собой заболевание печени или наследственное нарушение свертываемости крови.

Первичная категория заболеваний печени представлена врожденными ошибками метаболизма печени, которые могут быть дополнительно разделены на ошибки метаболизма аминокислот (такие как болезнь кленового сиропа, фенилкетонурия, тирозинемия, пропионовая ацидемия, органическая ацидурия и нарушения цикла обмена мочевины, включая в себя аргинин-янтарную аминокацидурию, дефицит карбамоилфосфатсинтазы I, цитруллинемию, гиперкарнинемию и дефицит орнитин-карбамоилтрансферазы), метаболизма металлов (например, болезнь Вильсона или гемохроматоз) и метаболизма углеводов (такие как гликогенное заболевание типа I/II, фруктозаemia или галактоземия), лизосомальные нарушения (такие как болезнь Вольмана, болезнь Ниманна Пика), пероксисомальные нарушения (такие как болезнь Рефсума), семейные гиперхолестеринемии и другие нарушения метаболизма липидов, митохондриальные заболевания (такие как дефицит пируваткарбоксилазы) и гипербилирубинемии (такие как синдром Криглера-Наджара, синдром Гильберта или синдром Дубина-Джонсона). Вторая категория представлена другими заболеваниями печени, не связанными напрямую с недостатками свертываемости или метаболизма, и включает в себя прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз типа 1/2/3, дефицит α -1-антитрипсина, болезнь Кароли, дефекты транспортеров клеток печени, порфирии (такие как острая интермиттирующая порфирия), жировое перерождение печени и другие фиброзные заболевания печени (NASH/NAFLD), первичный билиарный цирроз, склерозирующий холангит, дегенеративные заболевания печени или острую или хроническую печеночную недостаточность (например, постгепатэктомия, молниеносную, индуцированную вирусом, обостренную хроническую печеночную недостаточность) или другие типы дегенерации печени, которые можно лечить, заменяя ткани печени клетками-предшественниками печени (например, при злокачественной опухоли печени или других злокачественных новообразованиях).

Что касается наследственных нарушений свертываемости крови, заболевание может быть выбрано, например, из дефицита фактора V, дефицита фактора VII, дефицита фактора VIII, дефицита фактора IX,

дефицита фактора XI, дефицита фактора XIII и других дефицитов из-за недостаточного количества других связанных со свертываемостью факторов или других белков, специфически экспрессируемых и секретируемых печенью в кровоток, таких как альбумин или тканевой фактор, этот последний продукт экспрессируется такими клетками (Stephenne X. et al., 2012) и представляет потенциальный интерес для некоторых типов синдромов, связанных с нарушениями свертываемости крови.

Как обсуждалось выше, продукт ННАЛРС можно вводить или применять в комбинации с другим продуктом (таким как лекарственное средство, терапевтическое средство, другой тип клеток или другой биологический материал). Это относится к любому из введений и терапевтических применений, описанных в настоящем документе.

В частности, другой терапевтический продукт можно вводить, по существу, одновременно с продуктом ННАЛРС (в той же фармацевтической композиции или в отдельной фармацевтической композиции) или в разное время (в различных фармацевтических композициях и в любом порядке или с любой частотой). Независимо от того, вводится ли другой терапевтический продукт из продукта ННАЛРС отдельно или нет, полученные эффекты могут быть синергическими, т.е. эффекты превосходят ожидаемые при добавке, отрицательные эффекты одного из таких компонентов смягчаются или исчезают, и/или положительные эффекты одного из таких компонентов получают путем введения его в более низком количестве или с меньшей частотой.

Когда продукт ННАЛРС представляет собой потомство ННАЛРС, эти клетки могут быть введены (ранее совместно культивированные в условиях *in vitro* или нет) в комбинации с другим типом клеток (например, первичными человеческими гепатоцитами, клетками АДНЛРС или другим типом или популяцией клеток человека, представляющей собой первичную, стволовую, мезенхимальную клетку и/или клетку-предшественника, такую как те, которые описаны в публикации международной заявки WO 2006126219, и другие предшественники или стволовые клетки печеночного происхождения) или соответствующими кондиционированными клеточными культуральными средами в виде супернатанта клеточной культуры. Комбинация ННАЛРС с другим типом клеток может улучшить терапевтическую эффективность, приживление, хоминг, репопуляцию, пролиферацию и/или стабильность одного и/или другого типа клеток в организме человека. Потомство ННАЛРС может быть введено в виде части препарата, также содержащего такой другой тип клеток, или его можно вводить отдельно, но в комбинации с другим типом клеток, например, последовательно или одновременно (в любом порядке). Два типа клеток могут вводиться в виде суспензии или совместной культуры клеток или внутри губки или другой трехмерной структуры, где клетки могут расти, размножаться и дифференцироваться *in vitro* и/или *in vivo*, включая в себя биоискусственные устройства печени и природные или синтетические матрицы, которые осуществляют поддержание этих клеток в организме человека. Комбинация ННАЛРС с кондиционированными клеточными культуральными средами другого типа клеток может обеспечить потомство ННАЛРС с улучшенной терапевтической эффективностью, приживлением, пролиферацией и/или стабильностью в организме человека вместе с другими полезными свойствами, связанными с композицией кондиционированных клеточных культуральных сред другого типа клеток или без них.

Альтернативно, когда продукт ННАЛРС представляет собой кондиционированную клеточную культуральную среду потомства ННАЛРС, этот препарат можно вводить в комбинации с другим типом клеток (например, первичными человеческими гепатоцитами, клетками АДНЛРС или другим типом клеток человека или популяцией, представляющей собой первичную, стволовую, мезенхимальную клетку и/или клетку-предшественника, такую как те, которые описаны в публикации международной заявки WO 2006126219, и другие предшественники или стволовые клетки печеночного происхождения) или соответствующими кондиционированными клеточными культуральными средами. Комбинация кондиционированных клеточных культуральных сред потомства ННАЛРС с другим типом клеток может улучшить приживление, стабильность, хоминг, пролиферацию, репопуляцию и/или стабильность этого последнего типа клеток в организме человека. Опять же, продукт ННАЛРС можно вводить как часть состава, также содержащего такой другой тип клеток, или его можно вводить отдельно, но в комбинации с другим типом клеток, например, последовательно или одновременно (в любом порядке). Альтернативно, комбинация кондиционированной клеточной культуральной среды потомства ННАЛРС с кондиционированной клеточной культуральной средой другого типа клеток может обеспечить раствор с улучшенной терапевтической эффективностью, потенциально сочетающий эффекты секретируемых белков, которые содержатся в настоящем документе. Опять же, кондиционированная культуральная среда со стволовыми клетками потомства ННАЛРС может быть введена как часть состава, также содержащего другую такую кондиционированную культуральную среду, или ее можно вводить отдельно, но в сочетании с этой другой средой, например, последовательно или одновременно (например, в любом порядке).

Введение или терапевтическое применение продукта ННАЛРС (аналогично введению и терапевтическому применению клеток АДНЛРС или кондиционированной клеточной культуральной среды клеток АДНЛРС, как описано в публикации международной заявки WO 2015001124) также может оказывать неожиданные положительные эффекты. В частности, введение или терапевтическое применение потомства ННАЛРС или кондиционированной клеточной культуральной среды, полученной из потомства ННАЛРС, можно комбинировать с введением специфически необходимого белка для лечения наследуе-

мого заболевания, такого как метаболический фермент (например, орнитинтранскарбамилаза или UDP-глюкуронозилтрансфераза 1A1) или фактор свертываемости (например, фактор, VIII, фактор IX или фактор XI). Такие белки или факторы свертываемости могут применяться вместе с белками и ферментами, которые обеспечиваются продуктом ННАЛРС (или клетками АДНЛРС или соответствующими средами для культивирования клеток) и которые вовлечены в один и тот же метаболический путь или физиологическую функцию (например, свертываемость крови), возможно с получением синергических эффектов. Когда продукт ННАЛРС вводится или применяется в сочетании с другим продуктом, как обсуждалось выше, другой продукт может поэтому быть белком для лечения наследуемого заболевания, таким как метаболический фермент или фактор свертываемости. Кроме того, фармацевтические композиции могут быть получены путем криоконсервирования продукта ННАЛРС в высокой концентрации (10 миллионов/мл, 50 миллионов/мл, 100 миллионов/мл или более в соответствующих коммерческих растворах, таких как Cryostor), которые оттаивают и вводят пациентам путем восстановления фармацевтической композиции соответствующим разбавителем непосредственно во флаконах для криоконсервирования (без необходимости классифицированного окружения и с меньшими логистическими требованиями).

Этот подход может обеспечить фармацевтические композиции, которые обеспечивают более длительный и/или улучшенный терапевтический эффект, чем введение выделенного рекомбинантного белка, как обычно используется для лечения дефицита фермента или фактора свертываемости. Таким образом, фармацевтическая композиция может содержать (а) описанный в настоящем документе продукт ННАЛРС, такой как потомство ННАЛРС или его кондиционированная культуральная среда, (б) другой описанный в настоящем документе продукт, например лекарственное средство, терапевтическое средство, другой тип клеток или другой биологический материал (например, орнитинтранскарбамилазу или UDP-глюкуронозилтрансферазу 1A1) или фактор свертываемости (например, фактор, VIII, фактор IX или фактор XI), и (с) фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В этой области конкретные типы продуктов ННАЛРС и клеток АДНЛРС (такие как субпопуляция, клеточные линии и их фракция) могут быть выбраны в процессе производства, например, чтобы представить наиболее подходящий уровень производства для серии белков (как абсолютные значения и/или как соотношение между такими белками), которые вовлечены в данный метаболический путь или физиологическую функцию (например, свертываемость крови). Например, конкретные субпопуляции ННАЛРС или потомства ННАЛРС (и связанный с ними производственный процесс) могут быть выбраны таким образом, чтобы обеспечить популяции клеток (которые могут поддерживаться как клеточная линия, отложенные клеточные препараты или хранящиеся иным образом), которые имеют сбалансированную экспрессию множественных факторов свертываемости (например, два или более внешних факторов из фактора V, фактора VII и фактора X и/или два или более из внутренних факторов из фактора VIII, фактора XI, фактора XIII, фактора XII и фактора IX), которые являются подходящим для одного из различных типов дефицита свертываемости крови, такого как гемофилия (тип А связан с дефицитом фактора, тип В связан с дефицитом фактора IX, тип С связан с дефицитом фактора XI).

Применение ННАЛРС или потомства ННАЛРС в целом в составе композиций и в способах лечения может оказывать терапевтический эффект на заболевания печени, такие как перечисленные выше, но также может быть связано с исследованиями *in vitro* замещения первичных гепатоцитов или клеточных линий печени. В частности, потомство ННАЛРС можно использовать в (ранних) фармакологических и токсикологических способах оценки эффективности (если продукт ННАЛРС экспрессирует потенциальную лекарственную мишень для специфического для печени или неспецифического заболевания), метаболизма, стабильности и/или токсичности соединений (например, биологических или химических объектов).

Такие способы и применения *in vitro*, как правило, должны предусматривать следующие стадии:

(а) предоставление препарата продукта ННАЛРС (например, ННАЛРС или потомства ННАЛРС в виде клеток, клеточного экстракта или кондиционированной среды, полученной из ННАЛРС или потомства ННАЛРС);

(б) подвергание указанного продукта ННАЛРС действию одного или нескольких экзогенных компонентов, выбранных из химических соединений, белков, нуклеиновых кислот, липидов, сахаров, металлов, солей, вирусов, бактерий или клеток, а также

(с) обнаружение влияния указанного одного или нескольких экзогенных компонентов на продукт ННАЛРС и/или обнаружение присутствия, локализации или изменения указанного одного или нескольких экзогенных компонентов после воздействия продукта ННАЛРС.

ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут экспрессировать высокие уровни ферментов и другие специфические для печени белки, которые, как известно, метаболизируют большинство химических веществ, которые уже зарегистрированы, потенциальные лекарственные средства, все еще находящиеся в стадии разработки и доклинической оценке специфических для печени эффектов, или любое другое химическое вещество, предположительно имеющее специфические для печени эффекты, которые могут быть нежелательными (например, для гепатотоксического соединения) или желаемыми (если ННАЛРС и потомство ННАЛРС экспрессируют фермент и другой специфический для печени белок, про который известно, что он сам является мишенью для потенциальных лекарственных средств для специфического для печени

или неспецифического для печени заболевания, такого как злокачественная опухоль, и соединение может затем рассматриваться как потенциальное лекарственное средство для такого заболевания).

В общем, продукты ННАЛРС в виде клеток, клеточного экстракта или кондиционированной среды, полученные из ННАЛРС или потомства ННАЛРС, можно оценить на стадии (с) выше для оценки метаболизма, элиминации и токсикологии химических веществ, неорганических соединений, биологических веществ, бактерий, вирусов или клеток путем анализа общих признаков, таких как морфология клеток или жизнеспособность (например, в тестах на цитотоксичность). Однако могут быть включены альтернативные или дополнительные критерии, такие как активация или подавление специфических для печени (или неспецифических) белков или любое изменение (например, деградация, агрегация, активация или ингибирование) белков в продукте ННАЛРС (например, ННАЛРС, потомстве ННАЛРС или клеточном экстракте или кондиционированной среде, полученной из ННАЛРС или потомства ННАЛРС).

Альтернативно (или в сочетании с критериями, оцененными для ННАЛРС или потомства ННАЛРС и полученных биологических материалов), стадия (с) может предусматривать анализ того, как эти один или несколько экзогенных компонентов были интернализированы и/или модифицированы или не модифицированы ННАЛРС или потомством ННАЛРС и производными биологическими материалами. Эти аналитические критерии варьируют в зависимости от типа экзогенных компонентов, как описано в литературе, например, деградация, связывание с другими белками, стойкость в клеточной культуре, агрегация, инфекционность (для вирусов) или дифференциация или жизнеспособность (для клеток).

В литературе по исследованиям *in vitro*, включающим клетки и производные продукты (например, клеточные экстракты, кондиционированные среды), можно дать рекомендации о том, как ННАЛРС или потомство ННАЛРС в виде клеток, композиций и производных биологических материалов (например, продуктов ННАЛРС) могут быть использованы *in vitro*, как указано в стадиях (а)-(с), например, относительно концентрации, времени, условий культивирования и анализа, а также аналитических технологий. Аналогичные анализы могут быть также выполнены путем введения ННАЛРС или потомства ННАЛРС животным, таким как отличные от человека животные, на стадии (а), а затем введения одного или нескольких экзогенных компонентов животным на стадии (b) для определения на стадии (с) того, если и как указанный один или несколько компонентов модифицируют ННАЛРС или потомство ННАЛРС (или родственные биологические материалы) и/или модифицируются с помощью ННАЛРС или потомства ННАЛРС у этих животных.

Продукты ННАЛРС, ННАЛРС и потомство ННАЛРС, в частности, могут применяться для способов *in vivo* (например, для терапевтического применения таких клеток) и *in vitro* (например, для фармакотоксикологических целей), включающих химические или биологические вещества, описанные выше в наборе. В частности, набор может содержать помимо таких клеток (или производных биологических материалов) дополнительные элементы, которые позволяют использовать и/или обнаруживать их и их активность, когда они подвергаются воздействию группы соединений (в результате по меньшей мере одного изменения в структуре, метаболите и/или концентрации исследуемого соединения), а также эталонных соединений, растворов и/или других клеток, которые помогут сравнить и оценить эффекты, которые наблюдаются в анализах, связанных с использованием ННАЛРС и потомства ННАЛРС.

Следовательно, ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут обеспечить модели *in vitro*, включающие в себя непрерывные и легкодоступные клетки с ограниченной вариабельностью в гепатоцитоподобной структуре ферментов, стабильные с течением времени в культуре и от партии к партии, в частности в качестве альтернативных клеток по отношению к первичным гепатоцитам в "ADMET" (введение, распределение, метаболизм, элиминация и токсикология) или тестам на цитотоксичность (т.е. на жизнеспособность гепатоцитов и/или функциональную эффективность).

ННАЛРС и потомство ННАЛРС могут применяться в способах для исследования средств для лечения инфекций печени или для обеспечения эффективной репликации вируса, который, в частности, инфицирует печень и гепатоциты. ННАЛРС и потомство ННАЛРС можно дифференцировать и/или генетически модифицировать до или после того, как они подверглись воздействию вируса (например, вирус гепатита). Затем инфицированную клеточную популяцию можно подвергнуть действию предварительного количества потенциального соединения для лечения инфекции для наблюдения любого полезного эффекта (например, при вирусной репликации), используемого для очистки вирусных частиц, или для оценки любого потенциального *in vivo* эффекта вирусной инфекции, как показано для других клеток-предшественников печени в связи с инфекцией гепатита С, фиброзом печени или канцерогенезом (Wu X. et al., 2012; Wang C. et al., 2012; Torres D.M. и Harrison S.A., 2012).

Идеи всех ссылок, конкретно указанных в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки. Настоящее изобретение будет теперь проиллюстрировано с помощью следующих примеров, которые никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1. Анализ белков клеточной поверхности на ННАЛРС.

Материалы и способы.

Выделение и размножение ННАЛРС в культуре клеток.

ННАЛРС восстанавливали после первичной культуры паренхиматозной клеточной фракции печени,

полученной после двухступенчатой коллагеназной перфузии, фильтрации и низкоскоростного центрифугирования, как описано в другой публикации (Najimi M. et al., 2007), с использованием пяти отдельных доноров. Такие клетки печени суспендируют в среде для криоконсервирования, которую готовят в растворе ViaSpan, а затем поддерживают в жидком азоте с использованием соответствующих флаконов, мешков или другой системы для длительного хранения и сбережения клеток человека. Криоконсервированные суспензии клеток печени используют, быстро оттаивая их при температуре 37°C и промывая их дважды в 10-кратном объеме альбумина человека в концентрации 5%, дополненного глюкозой в концентрации 2,5 г/л, бикарбонатом в концентрации 0,084 г/л и гепарином LEO® в концентрации 5000 МЕ/мл. После центрифугирования при 224 g в течение 10 мин при температуре 4°C осадок клеток суспендируют в требуемой среде для культивирования клеток.

ННАЛРС культивировали в колбах CellBIND® (Corning®) в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM), содержащей глюкозу в концентрации 4,5 г/л (Invitrogen), с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco) и 1% пенициллина/стрептомицина (Invitrogen), при температуре 37°C в полностью увлажненной атмосфере (5% CO₂). При достижении конfluence 80% клетки поднимали с помощью 0,05% трипсина-ЭДТА (Invitrogen) и пересевали с плотностью 5000 клеток/см². Композиция сред и буферов может быть адаптирована к фактическим требованиям Правил организации производства и контроля качества лекарственных средств с использованием дополнительных или альтернативных реагентов GMP. Жизнеспособность восстановленных клеток оценивали с использованием способа исключения посредством красителя трипанового синего.

Скрининг маркера клеточной поверхности посредством проточной цитометрии с использованием технологии BD Lycoplate.

Для характеристики ННАЛРС использовали скрининговую панель маркеров клеточной поверхности BD Lycoplate™ (№ 560747, BD Biosciences, Гейдельберг, Германия). Набор содержит 242 очищенных моноклональных антитела к маркерам клеточной поверхности, а также изотипический контроль для оценки неспецифического фона. Перед применением планшеты, содержащие лиофилизированные антитела, центрифугировали при 300 g в течение 5 мин. Затем антитела восстанавливали в 110 мл стерильного натрий-фосфатного буферного раствора Дюльбекко (DPBS).

Анализ проводили с ННАЛРС, которые получали от каждого из пяти доноров, в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, АДНЛРС собирали в пассаже 5, используя трипсин-ЭДТА в концентрации 0,05%. После промывания в DPBS клетки ресуспендировали в окрашивающем буфере Pharmingen, содержащем 5 мМ ЭДТА, в концентрации 1,25×10⁶ клеток/мл. Восемьдесят микролитров клеточной суспензии на лунку затем переносили в 96-луночные планшеты и окрашивали специфическими первичными антителами в количестве 20 мкл в течение 30 мин на льду. После этого клетки дважды промывали окрашивающим буфером Pharmingen, содержащим 5 мМ ЭДТА, и окрашивали меченым Alexa Fluor 647 антимишиным или антикрысиным вторичным антителом в объеме 100 мкл (разведенным 1:200 в буфере для окрашивания Pharmingen, содержащем 5 мМ ЭДТА) в течение 30 мин на льду. После промывания клетки фиксировали буфером для фиксации BD Cytotfix и переносили из 96-луночных планшетов в одиночные пробирки BD FACS. Флуоресценцию измеряли с помощью цитометра BD FACS Canto II на 10000 клеток с использованием программного обеспечения FACSDiva. Для анализа фоновую флуоресценцию устанавливали вручную для каждого образца на основе его соответствующего изотипа с использованием программного обеспечения FlowJo. Результаты выражаются в процентах от положительных клеток в популяции или средней интенсивности флуоресценции (MFI).

Исследование ННАЛРС с помощью проточной цитометрии с другими антителами.

Клетки собирают, суспендируют в концентрации 500-1000/мкл в буфере PBS (№ в каталоге SH30028.03, Thermo Fisher) и инкубируют в течение 30 мин при температуре 4°C со следующими мечеными флуорохромом антителами, специфическими к указанным антигенам, которые используются в концентрации, указанной производителями, или в соответствии с инструкциями для антител, включенных в BD Lycoplate. Соответствующие антитела изотипического контроля используют для оценки неспецифического связывания моноклональных антител. Затем клетки промывают и суспендируют в PBS/BSA для считывания с помощью проточного цитометра FACSCanto II BD Biosciences.

Для окрашивания CXCR4 (CD184) клетки печени сначала инкубировали с DPBS-бычьим сывороточным альбумином (BSA) в концентрации 1,5% в течение 20 мин при температуре 4°C для предотвращения неспецифического связывания. Затем клетки промывали DPBS-BSA в концентрации 1,5% и окрашивали 5 мкл PE крысиного антитела к человеческому CXCR4/CD184, APC мыши к человеческому CD90 или их соответствующими изотипами (BD Biosciences) в течение 30 мин на льду. Наконец, клетки промывали и фиксировали, используя стабилизирующий фиксатор (BD Biosciences). Для внутриклеточного окрашивания клетки печени фиксировали и пермеабелизовали с помощью буфера cytofix/cytoperm в количестве 200 мкл (BD Biosciences) в течение 20 мин при температуре 4°C. Затем клетки промывали буфером для проницаемости/отмывания и окрашивали PE крысиным антителом к человеческому CD184 или его изотипом, разбавленным в буфере для проницаемости/отмывания в течение 30 мин на льду. Затем клетки дважды промывали и фиксировали стабилизирующим фиксатором (BD Biosci-

ences). Флуоресценцию измеряли с помощью цитометра BD FACS Canto II на 10000 клетках с использованием программного обеспечения FACSDiva. Анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения FlowJo. Контрольное окрашивание антителами к CD90 подтвердило правильность протокола в этих экспериментальных условиях.

ПЦР в реальном времени.

Общую РНК экстрагировали из четырех доноров с использованием реагента для выделения TriPure (Roche, Мангейм, Германия), следуя инструкциям производителя. Вкратце, $1,5 \times 10^6$ клеток гомогенизировали в реакторе TriPure, смешивали с хлороформом, энергично встряхивали в течение 15 с и центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин при температуре 4°C. РНК в верхней водной фазе осаждали изопропанолом, промывали в 75% этаноле, сушили на воздухе и растворяли в воде без РНКазы. Образцы РНК хранили при температуре -80°C после количественной оценки с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). кДНК синтезировали из 1 мкг общей РНК путем полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием набора большой емкости (Applied Biosystems). После этого 10 г продукта ОТ осаждали в каждой лунке матрицы TaqMan® внеклеточного матрикса человека и молекул адгезии (Invitrogen), как указано изготовителем. Планшеты считывали с использованием системы ПЦР в режиме реального времени Applio Biosystems StepOnePlus.

Результаты.

Клетки ADHLSC и HNALPC представляют собой клеточные популяции, которые обе могут быть получены из препаратов криоконсервированных первичных клеток печени человека, которые производятся с использованием нормальной печени взрослого человека (в условиях не-GMP и GMP, соответственно) и которые могут быть дифференцированы *in vitro* в клетки, имеющие гепатоцитоподобную активность и морфологию с некоторыми маркерами, которые являются общими для клеток ADHLSC, HNALPC и гепатоцитов и других отличительных HNALPC в качестве мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (Najimi M. et al., 2007).

Однако терапевтическое преимущество мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (MSC), таких как клетки ADHLSC и HNALPC, для ряда заболеваний, включая в себя заболевания печени, сильно зависит от эффектов их препарата GMP на фактический уровень приживления. Известно, что такие клетки экспрессируют, по меньшей мере, некоторые из рецепторов, связанных с уровнями приживления, и используют механизм, подобный лейкоцитам и гемопоэтическим стволовым клеткам, для приживления в поврежденных органах, опираясь на различные рецепторы для роллинга, прочной адгезии и трансмиграции через эндотелий. Пассажи клеточной культуры и условия могут влиять на то, как такие рецепторы действительно присутствуют и функционируют в клеточных препаратах для применения у людей.

HNALPC требуют конкретных критериев производства и качества, таких как соблюдение условий GMP, улучшение темпов роста и уровня удвоения популяции, а также соблюдение спецификаций качества до криоконсервирования и клинического применения (т.е. клетки должны оставаться жизнеспособными и недифференцированными, презентировать данную комбинацию положительных/отрицательных маркеров, сохраняя при этом способность дифференцироваться в функциональные гепатоциты). Этот расширенный процесс, который требовал оптимизации некоторых параметров культуры клеток, первоначально выполняли в многослойном флаконе (например, Corning Cell Stack), а затем переносили на многопланшетный биореактор (например, PALL Xpansion 10), подтверждая, что клетки-предшественники печени, такие как HNALPC, могут поставяться в промышленном масштабе, характеризуясь однородным качеством и количеством (Egloff M. et al., 2013). HNALPC культивировали и размножали в течение 5 пассажей в условиях крупномасштабной культуры на пластике CellBIND® (обработали для облегчения адгезии в отсутствие EGF) перед всесторонним скринингом на уровне белков клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии с использованием набора BD Lyoplate™, с целью определения влияния препарата GMP на панель из более чем 200 маркеров клеточной поверхности человека, охватывающих костимулирующие молекулы, рецепторы цитокинов/хемокинов и т.д., используя HNALPC, которые получали из пяти разных доноров печени (таблица).

Клетки от всех пяти доноров были положительны в отношении серии мезенхимальных маркеров на клеточной поверхности вместе с адгезионными свойствами, серии тетраспанинов (включая в себя CD81, представляющего особый интерес, поскольку он ответственен за подверженность гепатоцитов к инфекции Plasmodium, Yalaoui S et al., 2008), переносчика аминокислот, такого как CD98, и только специфическому хемокиновому рецептору (CD140b, соответствующему PDGFRbeta), в то время как все другие рецепторы цитокинов не экспонируются на поверхности клеток HNALPC. Другие маркеры, включая в себя некоторые маркеры адгезии (CD54, CD164, CD165 и CD166), рецепторы клеточной поверхности (CD95) и связанные с комплементом белки (CD46, CD55 и CD59), все же были обнаружены последовательно, но на более низких уровнях у доноров (таблица). Интенсивность сигналов подтвердила, что HNALPC экспрессируют на очень низком уровне маркеры клеточной поверхности для других клеточных линий (гемопоэтических, эпителиальных и/или эндотелиальных), такие как CD45, CD117, CD34 или HLA-DR. Более того, несколько других маркеров MSC/плюрипотентности были последовательно обнаружены у всех доноров, включая в себя CD13 и, что интересно, CD105, чья экспрессия на клеточной поверхности силь-

но возрастает после культивирования на CellBIND по сравнению с клетками ADHLS (Najimi et al., 2007).

ННАЛРС, как клетки ADHLS, не экспрессировали основные рецепторы для индукции иммунного ответа и иммунной модуляции (такие как CD1, CD7, CD70, HLA-/-DR, CD27, CD28, CD40, CD80 или CD112) у всех доноров, подтверждая их слабый иммуногенный фенотип. Эти клетки экспрессируют на разных уровнях у доноров некоторые маркеры адгезии (включая в себя CD26, CD49a, CD49d, CD58, CD61, CD71, CD142, CD146, CD201, CD340 и HLA-A/-B/-C, таблица). Те из маркеров, которые были определены выше, как изменчиво связанные с ННАЛРС, могут считаться полезными либо как положительные маркеры, либо отрицательные маркеры, когда они обнаружены в ННАЛРС, в зависимости от конечного применения клеток (являющихся терапевтическим применением конкретными пациентами).

Общие признаки ННАЛРС, определенные BD Lyoplate

Средние значения интенсивности флуоресценции в анализе BD Lyoplate	Обнаруженный BD Lyoplate антиген
Превосходно до 750 во всех образцах	Мезенхимальные или плюрипотентные маркеры (CD13, CD73, CD90 и CD105)
	Адгезионные маркеры (CD29, CD44, CD47, CD49b, CD49c, CD49e и CD147)
	Тетраспанины (CD9, CD63, CD81 и CD151)
	Рецепторы клеточной поверхности (CD140b)
	Иммунomodуляция (β 2-микроглобулин)
	Транспортный белок (CD98)
Превосходно до 250 во всех образцах	Маркеры адгезии (CD54, CD164, CD165 и CD166)
	Рецепторы клеточной поверхности (CD95)
	Дополнение (CD46, CD55 и CD59)
Изменчиво в образцах	CD26, CD49a, CD49d, CD58, CD61, CD71, CD142, CD146, CD201, CD340 и HLA-A/-B/-C

Другие маркеры клеточной поверхности, которые включены в анализ, были охарактеризованы как экспрессируемые на очень низких уровнях или отрицательные, включая в себя маркеры клеточной поверхности, ранее описанные для клеток ADHLS (такие как CD34, CD45, CD117 и HLA-DR) или не охарактеризованы для клеток ADHLS, а скорее для иммунного ответа (включая в себя CD28, CD30, CD200, CD229, CD275, CD279, CD300 и CD357).

ННАЛРС могут быть также измерены как положительные для ряда других маркеров и активностей, не связанных с белками клеточной поверхности. В перспективе применение ННАЛРС в конкретных клинических показаниях и для оптимизации производственного процесса исходные критерии могут быть улучшены путем идентификации дополнительных маркеров (являющихся белками клеточной поверхности, секретруемыми белками или связанными с ферментативной активностью), которые позволяют характеризовать качество клеток и оптимизировать каждый шаг такого процесса (например, выбор первичных клеток печени, условий культивирования клеток, состав, хранение и/или выбор пациента). Основываясь на этом наборе данных, дополнительное сравнение на основе протеомики/транскриптомики образцов ННАЛРС и первичных гепатоцитов человека может предложить дополнительные соответствующие маркеры, которые могут быть протестированы при использовании проточной цитометрии, ELISA или других коммерческих наборов, либо на уровне анализа единственного маркера, либо посредством множественного параллельного анализа (например, с использованием антител для маркеров клеточной поверхности, отличных от тех, которые содержатся в наборе BD Lyoplate™).

Отрицательные данные BD Lyoplate подтверждали на уровне мПНК для некоторых маркеров, таких как CD162 (PSGL-1), фукозилтрансфераза IV (SSEA-1) или сиалил-Льюис X (SLeX), тетрасахаридный компонент PSGL-1, необходимый для связывания E-селектина на их поверхности. Отсутствие таких ферментов, обеспечивающих рецепторы относящимися к адгезии сахарами, такими как CD44, делает такие рецепторы, даже если они экспрессируются на поверхности клетки, возможно, не функционирующими в качестве адгезионного белка. Содержание других рецепторов, таких как VLA-2 (CD49b, связывание с коллагеном), VLA-3 (CD49c, связывание с ламинином) и VLA-5 (CD49e, связывание с фибронектином), является высоким на уровне мПНК и посредством проточной цитометрии (фиг. 1А). Такое же наблюдение не подтверждено для VLA-4 (представляет собой только β -субъединицу CD29, сильно экспрессированную, а не ее α -субъединицу CD49d, или из-за манипуляций во время подготовки клеток, приводящей к потере части ее внеклеточного домена) и в основном важных CXCR4/CD184.

Экспрессия CXCR4 важна для белка, участвующего в процессе приживления/хоминга HSC и MSC. В сайтах повреждения CXCR4 связывает высвобожденный SDF-1, что облегчает миграцию клеток в органы (Marquez-Curtis L.A. and A. Janowska-Wieczorek, 2013). Было показано, что применение антагониста CXCR4 AMD3100 во время инфузии клеток ингибирует миграцию MSC к пораженным почкам (Liu N. et al., 2013). Однако сообщалось, что экспрессия CXCR4 быстро уменьшается после выделения MSC и только очень небольшой процент клеток или вообще никто из них не экспрессирует CXCR4 после нескольких пассажей (Wynn R.F. et al., 2004). Фактически, экспансия MSC *in vitro* индуцирует прогрессирующую интернализацию CXCR4 как способ адаптации клеток к условиям культуры до такой степени, что на их поверхности отсутствует CXCR4 (Pelekanos R.A. et al., 2014). Поэтому поверхностную экспрессию CXCR4 оценивали в каждом пассаже с помощью проточной цитометрии, и было обнаружено, что все исследуемые доноры показали очень низкую экспрессию поверхностных рецепторов, когда клетки не проницаемы. Однако когда клетки были проницаемы, значительная часть клеточной популяции экспрессировала CXCR4, предполагая, что большая часть популяции уже начала интернализировать CXCR4 (фиг. 1B).

Некоторые исследовательские группы решили индуцировать экстернализацию CXCR4 на поверхности MSC, что является ключевым моментом для улучшения хоминга MSC. Для повышения эффективности CXCR4 использовали различные способы, такие как культивирование в присутствии вальпроевой кислоты (Gul H. et al., 2009), SDF-1 (Jones G.N. et al., 2012) или цитокиновый коктейль (Shi M. et al., 2007). Тем не менее, ни цитокиновый коктейль, ни предварительная инкубация с SDF-1, по-видимому, не влияют на экстернализацию CXCR4, оставляя другие возможности для развития HNALPC с улучшенными свойствами приживления.

HNALPC являются сильно положительными в отношении ограниченного числа маркеров клеточной поверхности среди различных категорий белков, что позволяет использовать антитела, такие как к CD140b, к CD105, к CD9, к CD47, к CD49c, к CD49e, к CD29, к CD147, к CD73, к CD81, к CD151 и/или к CD98, для оценки качества, чистоты и/или идентичности HNALPC во время их изготовления и/или до их применения. Вместе с другими критериями, указанными в литературе (Najimi M. et al., 2007), и (если имеется) клинической информацией о субъекте-человеке, который предоставил первичный препарат клеток печени, обнаружение перечисленных выше маркеров клеточной поверхности может позволить дальнейшую оптимизацию наиболее подходящего терапевтического применения и/или субъекта-человека для введения HNALPC.

Результаты, полученные с использованием BD Lycoplate в различных препаратах HNALPC от разных доноров, обеспечивают руководство для определения того, какие дополнительные маркеры и биологические активности могут быть связаны с HNALPC, а затем улучшают их производство GMP, а также их применение *in vitro* или *in vivo*. Однако профиль экспрессии некоторых белков адгезии, которые важны для приживления HNALPC, может быть результатом процесса культивирования. Идентификация множественных маркеров клеточной поверхности поможет определить, какие условия культивирования клеток GMP могут улучшить приживление клеток и, таким образом, улучшить пригодность HNALPC для медицинских целей, требующих репопуляции печени человека с помощью гепатоактивных клеток (таких как при определенных врожденных метаболических нарушениях печени или острых/травматических крупных травмах печени или как альтернатива трансплантации печени), а также возможность применения таких клеток для системной доставки ферментов, факторов роста и других белков, которые либо естественно экспрессируются функциональными гепатоцитами (такими как связанные с коагуляцией, циррозом или фиброзом, в случае пациентов, страдающих от родственных нарушений), либо непеченочных белков, которые соответствующим образом экспрессируются генетически модифицированными HNALPC (такими как антитела или гормоны, которые могут быть применимы при лечении широкого спектра показаний, таких как злокачественная опухоль, сахарный диабет или воспалительные заболевания). В литературе были рассмотрены дополнительные доклинические модели и подходы к проверке введения HNALPC в отношении репопуляции и регенерации печени (см. книгу "Основные механизмы регенерации печени, соответствующие модели и клинические применения", Edit: Udayan M. Apte, Elsevier 2015).

Пример 2. Валидация терапевтических свойств HNALPC.

Материалы и способы.

Подготовка и введение HNALPC пациентам, страдающим от нарушений цикла обмена мочевины.

HNALPC получали из суспензий клеток печени здоровых людей и культивировали в пяти пассажах, как указано в примере 1, а затем собирали, криоконсервировали в CryoStor-10 (10% диметилсульфоксид) и хранили в жидком азоте. Перед применением HNALPC оттаивали и промывали в растворе альбумина, а затем составляли в асептической среде на установке GMP в виде клеточной суспензии, содержащей 250×10^6 клеток в 0,084 бикарбоната натрия, 5% человеческого альбумине и 500 МЕ гепарина в пластиковом мешке объемом 50 мл. HNALPC вводили внутривенно через чрескожный транспепатический портальный катетер, который вводили под общим наркозом путем прямой транспепатической пункции правой/левой портальной вены в основную портальную вену в сплено-мезентериальном слиянии под рентгенологическим и ультразвуковым наведением при скорости потока 0,5-2 мл/мин. Каждую инфузию вы-

полняли при умеренной антикоагулянтной терапии бивалирудином (Stephene X. et al., 2012), а затем сопровождали терапией (иммунодепрессивное лечение и регулярное лечение каждого пациента от нарушения цикла обмена мочевины).

Пациентов контролировали в соответствии со стандартными протоколами для таких нарушений. Кроме того, образование мочевины *in vivo* оценивали с использованием стабильных нерадиоактивных изотопов для оценки действительной активности цикла мочевины путем измерения включения ^{13}C в мочевины в плазму из ^{13}C -меченого предшественника, который пациенты принимали в виде ацетата натрия, как описано в литературе (Yudkoff M. et al., 2010).

Подготовка и введение ННАЛРС пациентам, страдающим гемофилией.

ННАЛРС получали, как описано в примере 1 и выше, но частично подвергали мечению радиоактивной меткой перед их окончательным составлением и введением с использованием ^{111}In . Вкратце, 25 миллионов ННАЛРС суспендировали в 5 мл NaCl 0,9%, инкубировали 15 мин при комнатной температуре с ^{111}In -ДТРА в концентрации 20 мкКи/1,10⁶ клеток при осторожном встряхивании. Затем клетки промывали, эффективность мечения измеряли с помощью калибратора дозы (Calintec Radioisotope Calibrator CRC12) и рассчитывали следующим образом: [Радиоактивность от клеток]/[Радиоактивность от (супернатант + клетки)] × 100. Эффективность мечения оценивали в 79%.

ННАЛРС (радиоактивно меченые или нет) составляли в 5% альбумине человека (Hibumine, Baxter), дополненном глюкозой (0,025 г/л, Stereop), бикарбонатом натрия в концентрации 6,5 мг/мл (B52 Braun), гепарином в концентрации 10 МЕ/мл (LeoPharma) и 0,78% лизомуцилом (Zambon). ННАЛРС вводили через периферический внутривенный катетер, помещенный в предплечье, с одной начальной инфузией 25 миллионов клеток, помеченных индием, с последующими четырьмя инфузиями 250 миллионов клеток каждые 2 недели. Клинический мониторинг параметров сердечно-дыхательной системы и коагуляции проводили во время и после инфузии клеток. В течение этого периода инфузии проводили как профилактическое лечение рекомбинантным фактором VIII, так и стандартную иммуносупрессию (с метилпреднизолоном и такролимусом). В качестве параметров оценки биохимического ответа принимали дозировка уровня фактора VIII в крови и профиля коагуляции, включая тромбозластограмму. Оценивали требования к фактору VIII и клинические характеристики кровотечения пациента.

Динамическую сцинтиграфию в течение всего времени инфузии и сцинтиграфию всего тела в указанные моменты времени после инфузии клеток проводили с помощью визуализации СПЕКТ. Печеночное удержание сигнала ^{111}In -ДТРА рассчитывали как отношение представляющих интерес областей к захвату всего организма с помощью программы анализа РМОД.

Результаты.

Введение ННАЛРС представляет собой терапевтический раствор для серии унаследованных или приобретенных нарушений, требующих восстановления поврежденных тканей печени (например, в случае хронического или острого повреждения вследствие вирусной инфекции, воздействия токсических соединений, фиброзных нарушений или злокачественной опухоли) или клеток печени, экспрессирующих функциональные белки, которые проявляют свою активность на внутриклеточном уровне (например, для метаболических функций) или во внеклеточных компартментах (например, в виде секретируемых белков, оказывающих иммуномодулирующую активность в тканях печени или другие активности в тканях, где такие белки транспортируются путем циркуляции крови). В зависимости от нарушения и статуса пациентов ННАЛРС могут быть получены, составлены и введены с использованием различных подходящих подходов.

Терапевтическую применимость ННАЛРС исследовали в клинических условиях, демонстрируя, что ННАЛРС представляет собой продукт клеточной терапии с несколькими интересными свойствами и подходит для различных способов введения и показаний.

В качестве первого примера введение ННАЛРС может увеличить образование мочевины у пациентов, страдающих нарушениями цикла обмена мочевины, унаследованными метаболическими заболеваниями, связанными со значительными медицинскими осложнениями, и с процедурами, которые являются ограниченными и паллиативными, что накладывает тяжелое бремя на пациентов и семьи. Способы лечения на основе клеток могут обеспечить достаточные метаболические функции печени для ослабления клинического течения, по меньшей мере, до тех пор, пока не станет возможной аллогенная трансплантация печени.

Фармацевтические композиции, изготовленные на основе GMP, содержащие хорошо охарактеризованные ННАЛРС, можно вводить через воротную вену. В первом исследовании, в котором участвовали пациенты-дети с различными заболеваниями, весом и возрастом, ННАЛРС вводили в разных дозировках (от 12,5×10⁶ до 200×10⁶ клеток/кг при переменном количестве инфузий в течение 1-4 дней), измеряя серию метаболических критериев и критериев безопасности в течение нескольких месяцев. В частности, метаболический эффект ННАЛРС на функциональность цикла обмена мочевины оценивали путем измерения образования мочевины *in vivo* с использованием меченого предшественника мочевины. Эта связанная с заболеванием биологическая активность оказывает положительное влияние на введение ННАЛРС, которое переносится пациентами, которые уже подвергаются хроническим долгосрочным

поддерживающим способам лечения, таким как поглотители азота (фиг. 2).

Другим примером является гемофилия А, связанные с X-хромосомой нарушения кровотечения, вызванные дефицитом фактора VIII коагуляции, при которых, следовательно, введение пациентам осуществляется с помощью профилактических, периодических внутривенных инъекций. Такой текущий стандарт оказания медицинской помощи связан с развитием нейтрализующих антител к фактору VIII у нескольких пациентов, с нарушенной эффективностью и увеличением стоимости лечения (см. Kabel A., 2014 для обзора нарушений кровотечения и терапевтического управления ими). Лечение на основе клеток, которое позволяет обеспечить фактор VIII, эндогенно и локализованно, может обеспечить пациентов более длительной продолжительностью ответа при меньших осложнениях. Поскольку сама печень представляет собой основной сайт синтеза фактора VIII, и показано, что мезенхимальные стволовые клетки контролируют кровотечение на животных моделях гемофилии, клетки-предшественники печеночного происхождения, которые проникают в печень человека и слабо иммуногенны, такие как HNALPC, могут применяться для обеспечения пациентов с гемофилией А фактором VIII, по меньшей мере, для уменьшения введения рекомбинантного экзогенного фактора VIII.

Пациента, страдающего тяжелой гемофилией А с рецидивирующими эпизодами гемартроза, которые вызывают нарушение функционирования правой лодыжки (несмотря на профилактическую инъекцию фактора VIII в высоких дозах), лечили внутривенным введением HNALPC. Эту клиническую внутривенную инфузию таких клеток, естественно экспрессирующих фактор VIII, как HNALPC, проводили параллельно с регулярным введением фактора VIII и после изучения как биораспределения в соответствующих тканях, так и анализа и влияния на потребности пациента в факторе VIII (фиг. 3). Изображения во время инфузий показали, что меченные HNALPC первоначально задерживались в легких, но затем быстро, в течение 1 ч, клетки также обнаруживали в печени в количестве, значительно превосходящем легкие и селезенку. Интересно, что через 4 ч после инфузий HNALPC можно было также обнаружить в правой лодыжке, которая была участком повторного гемартроза у пациента, что указывает на то, что HNALPC могут оказывать потенциальное облегчение и этому нарушению. Действительно, потребность пациента в факторе VIII резко снизилась в течение 15 недель после окончания инъекций HNALPC, причем фактор VIII вводили только тогда, когда был эпизод кровотечения. В течение этого периода ответа биохимические маркеры не проявляли значительных изменений, но у пациента наблюдалось гораздо меньшее число эпизодов кровотечения при осуществлении физических упражнений даже без предварительной профилактической инфузий фактора VIII с одним эпизодом гемартроза, для которого ему понадобилось 1000 МЕ фактора VIII для нормализации, в то время как в целом он бы ввел 5000 IU для того же результата. У него было субъективное ощущение способности к более интенсивной физической активности без эпизодов кровотечения при отсутствии профилактического введения фактора VIII.

Таким образом, HNALPC обеспечивает лекарственный продукт, который можно применять в соответствии с различными схемами лечения, составами и клиническими параметрами для достижения терапевтического эффекта, связанного не только с метаболической связанной с печенью активностью, но также с секрецией белков, таких как фактор VIII (или другие белки), которые могут оказывать свертывающее или иммуномодулирующее действие в разных местах, например, в пределах суставов, снижая применение других лекарственных средств, нацеленных на такие места, прямо или косвенно.

В другом примере внутривенное введение HNALPC проводили у пациента, страдающего от нарушений цикла обмена мочевины, для контроля толерантности и потенциального побочного эффекта и для изучения распределения HNALPC в печени после инфузий. Партии HNALPC получали в условиях GMP и вводили пациенту, страдающему от дефицита OTC, с повышенными уровнями аммиака и глутамина в сочетании с низкими уровнями аргинина и цитруллина.

Пациент получал 940×10^6 клеток-предшественников ($16,3 \times 10^6$ клеток/кг массы тела) (235×10^6 клеток на введение). Жизнеспособность клеток оценивали сразу после восстановления, и она составляла от 84 до 88%. HNALPC вводили внутривенно через периферический катетер. Внутривенную глюкозу вводили во время каждой процедуры инфузии параллельно с бивалиридином ($1,75$ мг/кг/ч) в качестве превентивной меры тромбоза. Измерения АСТ (время активации коагуляции, измеренное на свежей цельной крови) собирали на каждой стадии инфузии, но во время инфузий не регистрировалось аномальное значение АСТ (все значения АСТ ниже 350 с). Иммуносупрессивное лечение, данное пациенту, включало Evérolimus (Certican) с суточной дозой 1,5 мг.

Сразу после периода инфузий содержание аммиака в крови было стабильным в течение 2-месячного периода. После этого у пациента наблюдалась тенденция к проявлению более высокого содержания аммиака в плазме, но содержание глутамина в крови были нормализовано на более длительный период (фиг. 4). Клиническая оценка после инфузий клеток показала некоторые клинические улучшения. Через пять месяцев после первой инфузии пациент был описан исследователем как более динамичный, активный с уменьшением эпизодов усталости, о котором сообщал сам пациент.

Таким образом, клинические улучшения, связанные с основанным на HNALPC лечением, были показаны для различных патологий и с использованием различных способов введения, схем лечения и дозровок.

СЫЛКИ.

- Alépée N et al., ALTEX (2014). 31:441-77.
- Azuma H et al., Hepatology (2003). 37: 1385-94.
- Bale S et al., Exp Biol Med (2014). 239:1180-91.
- Berardis S et al., PLoS One (2014), 9:e86137.
- Berardis S et al., World J Gastroenterol (2015). 21: 742-758.
- Bieback K. Transfus Med Hemother (2013). 40:326-35.
- Caralt M et al., Organogen (2014). 10: 250-9.
- Cheng H et al., Biomaterials (2012). 33:5004-12.
- Christ B et al., Trends Mol Med (2015). 21: 673-686.
- Cigognini D et al., Drug Discov Today (2013). 18: 1099-108.
- Dan YY, Methods Mol Biol (2012). 826: 11-23.
- Darwiche H and Petersen BE, Prog Mol Biol Transl Sci (2010). 97: 229-49.
- Ebrahimkhani M et al., Adv Drug Deliv Rev (2014). 69-70:132-57.
- Egloff M et al., BMC Proceedings (2013) 7(Suppl 6):P6.
- Forbes S et al., J Hepatol (2015) 62(1 Suppl): S157-169.
- Gerets HH et al., Cell Biol Toxicol (2012). 28: 69-87.
- Gomez-Lechon MJ et al., Methods Mol Biol (2012). 806: 87-97.
- Gul H et al., Stem Cells Dev (2009)18:831-8.
- Herrera MB et al., Stem Cells (2006). 24: 2840-50.
- Hook LA, Drug Discov Today (2012). 17: 336-42.
- Ibars E et al., World J Gastroenterol (2016). 22: 874-886.
- Jones GN et al., Stem Cells Transl Med (2012). 1:70-8.
- Kabel A, Int J Hematol Dis (2014). 1: 22-26.
- Kavanagh D et al., Stem Cell Rev (2014). 10:587-99.
- Khuu DN et al., Cell Transplant (2011). 20: 287-302.
- Kim JY et al., Biomol Ther (2015). 23(6):517-24.
- Lancaster MA et al., Science (2014). 345:1247125.
- Lee J et al., Biomacromol (2014). 15: 206-18.
- Lin C et al., Expert Opin Drug Discov (2015). 10:519-40.
- Liu N et al., J Cell Biochem (2013). 114:2677-89.
- Maerckx C et al., World J Gastroenterol. (2014). 20:10553-63.
- Marquez-Curtis LA and A Janowska-Wieczorek, Biomed Res Int (2013):561098.
- Massie I et al., Tissue Eng Part C Methods (2011). 17: 765-74.
- Muscari C et al., J Biomed Sci. (2013). 20:63.

- Nagase K et al., *Biomacromolecules* (2015). 16:532-40.
- Najar M et al., *Int Immunopharmacol* (2013). 15: 693-702.
- Najimi M et al., *Cell Transplant* (2007). 16: 717-28.
- Nash M et al., *Stem Cell Rev* (2013). 9: 148-57.
- Pelekanos RA et al., *BMC Cell Biol* (2014) 15:15.
- Raicevic G et al., 2015. *Cytotherapy*. 17: 174-85.
- Sahin MB et al., *Liver Transpl* (2008). 14: 333-45.
- Sana G et al., *Cell Transplant* (2014). 23:1127-42.
- Santamaria E et al., *Methods Mol Biol* (2012). 909: 165-80.
- Sarkar D et al., *Blood* (2011). 118:e184-91.
- Scheers I et al., *Cell Transplant* (2012). 21: 2241-55.
- Schmelzer E et al., *J Exp Med* (2007). 204: 1973-87.
- Shi M et al., *Haematologica* (2007) 92:897-904.
- Shiojiri N and Nitou M, *Methods Mol Biol* (2012). 826: 3-10.
- Sison-Young R et al., *Toxicol Sci* (2015). 147:412-24.
- Slany A et al., *J Proteome Res* (2010). 9: 6-21.
- Stephene X et al., *PLoSone* (2012). 7: e42819.
- Tanaka M and Miyajima A, *Methods Mol Biol* (2012). 826: 25-32.
- Torres DM and Harrison SA, *Hepatology* (2012). 56: 2013-5.
- Wan X et al., *Glycobiology* (2013). 23:1184-91.
- Wang C et al., *Hepatology* (2012). 55: 108-20.
- Wu X et al., *PLoS Pathog* (2012). 8: e1002617.
- Wynn RF et al., *Blood* (2004) 104:2643-5.
- Yalaoui S et al., *PLoS Pathog* (2008). 4:e1000010.
- You J et al., *ACS Nano* (2013). 7:4119-28.
- Yu J et al., *PLoS One* (2012). 7: e35230.
- Yudkoff M et al., *Mol Genet Metab* (2010). 100 suppl. 1: S37-41.
- Zeng W et al., *Sci Rep* (2015). 5:11100.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка-предшественник взрослой печени для лечения заболевания печени или наследственных нарушений свертываемости крови, характеризующаяся тем, что указанная клетка положительна по отношению к
 - (a) мезенхимальным или плюрипотентным маркерам CD13, CD73, CD90 и CD105;
 - (b) маркерам адгезии CD29, CD44, CD47, CD49b, CD49c, CD49e и CD147;
 - (c) тетраспанинам CD9, CD63, CD81 и CD151, а также
 - (d) CD98, CD140b и β 2-микроглобулину.
2. Клетка по п. 1, характеризующаяся тем, что клетка дополнительно положительна по отношению к
 - (a) по меньшей мере одному маркеру, выбранному из маркеров адгезии CD54, CD164, CD165 и CD166, и/или
 - (b) по меньшей мере одному маркеру, выбранному из CD46, CD55, CD59 и CD95.
3. Клетка по п.1 или 2, характеризующаяся тем, что клетка дополнительно положительна по меньшей мере по отношению к одному маркеру, выбранному из CD26, CD49a, CD49d, CD58, CD61, CD71, CD142, CD146, CD201, CD340 и HLA-A/-B/-C.
4. Клетка по п.1 или 2, характеризующаяся тем, что клетка дополнительно отрицательна по меньшей мере по отношению к одному маркеру, выбранному из
 - (a) CD26, CD49a, CD49d, CD58, CD61, CD71, CD142, CD146, CD201, CD340 и HLA-A/-B/-C и/или
 - (b) одному или нескольким из CD45, CD117, CD34 и HLA-DR.
5. Клетка по пп.1-4, характеризующаяся тем, что клетка дополнительно

(a) положительна по меньшей мере по отношению к одному печеночному маркеру, выбранному из альбумина, HNF-4 и CYP3A4;

(b) положительна по меньшей мере по отношению к одному мезенхимальному маркеру, выбранному из виментина, α -гладкомышечного актина (ASMA), а также

(c) отрицательна по отношению к цитокератину-19 (СК-19).

6. Клетка по п.1, характеризующаяся тем, что клетка дополнительно

(a) положительна по отношению к CD54, CD164, CD165, CD166, CD46, CD55, CD59, CD95, альбумину и виментину, а также

(b) отрицательна по отношению к CD45, CD117, CD34, HLA-DR и цитокератину-19.

7. Выделенная клеточная популяция для лечения заболевания печени или наследственных нарушений свертываемости крови, содержащая по меньшей мере 60% клеток по любому из предшествующих пунктов.

8. Выделенная клеточная популяция для лечения заболевания печени или наследственных нарушений свертываемости крови, содержащая от 60 до 99% клеток по любому из предшествующих пунктов.

9. Клетка или популяция клеток по любому из предшествующих пунктов, причем указанная клетка или клетки указанной популяции клеток дифференцируются в клетки, характеризующиеся специфическими для печени активностями.

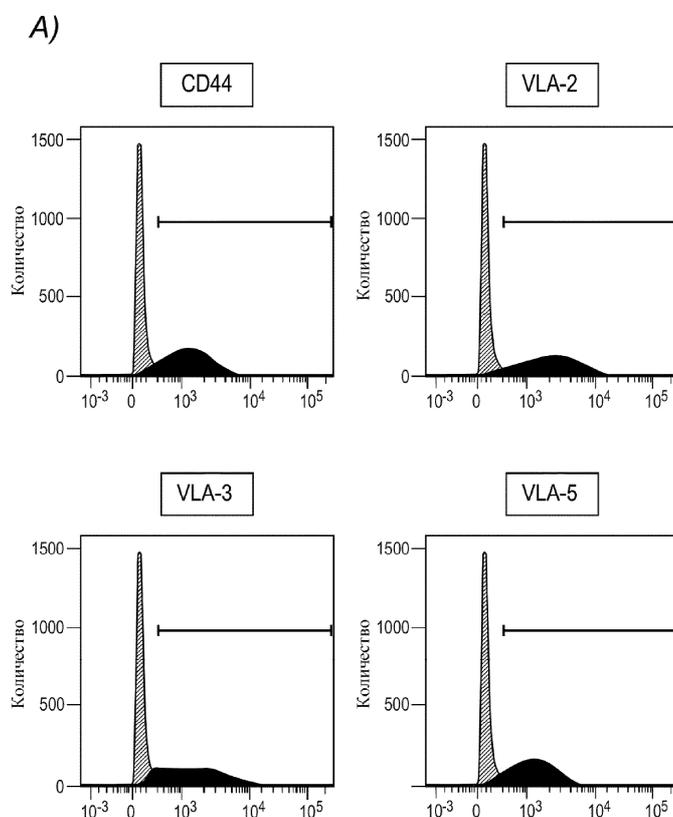
10. Клетка или клеточная популяция по любому из предшествующих пунктов, причем указанная клетка или клетки указанной популяции клеток модифицированы путем обработки клеток факторами роста и/или трансдуцирования клеток с микроРНК или лентивирусными векторами, экспрессирующими факторы транскрипции, которые влияют на производство представляющих терапевтический интерес специфических белков.

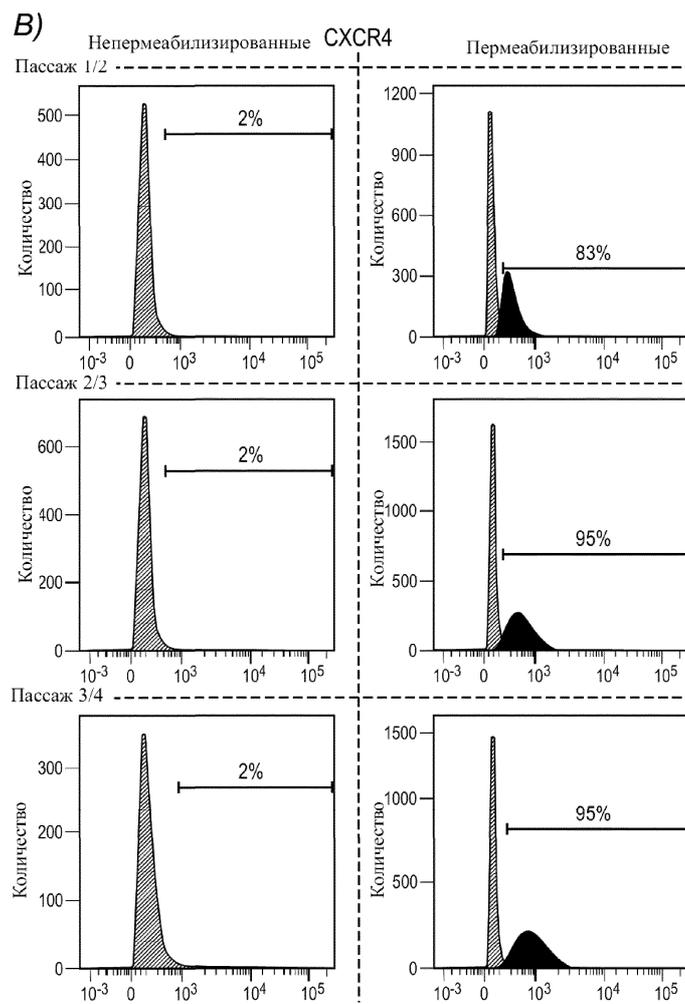
11. Композиция для лечения заболевания печени или наследственных нарушений свертываемости крови, содержащая клетку по любому из пп.1-6, 9 или 10 или клеточную популяцию по любому из пп.7-10.

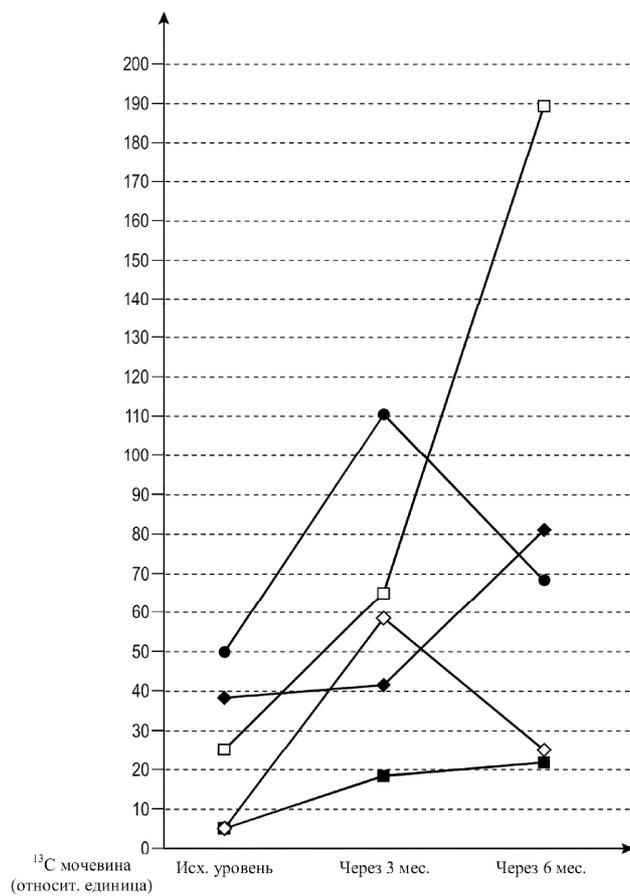
12. Применение клетки по любому из пп.1-6, 9 или 10 для лечения заболевания печени.

13. Применение клетки по любому из пп.1-6, 9 или 10 для лечения наследственных нарушений свертываемости крови.

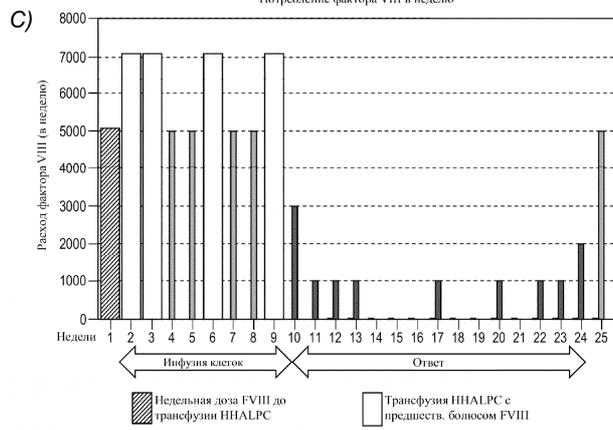
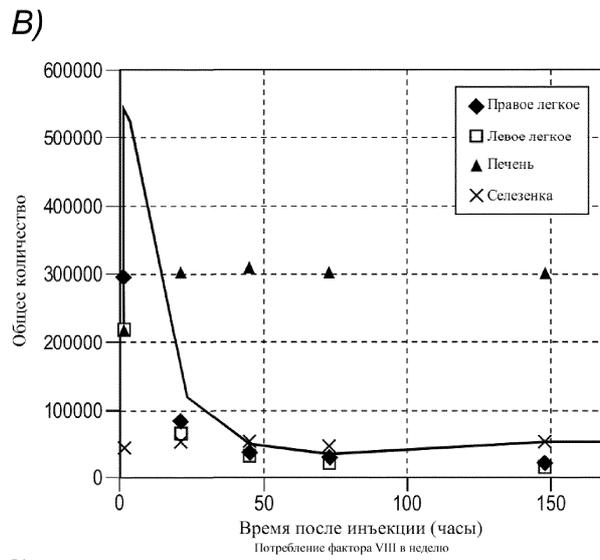
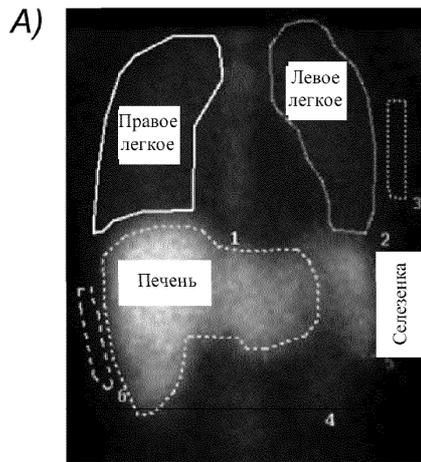
14. Набор для лечения заболевания печени или наследственных нарушений свертываемости крови, отличающийся тем, что он содержит клетку по любому из пп.1-6, 9 или 10, или клеточную популяцию по любому из пп.7-10, или композицию по п.11.



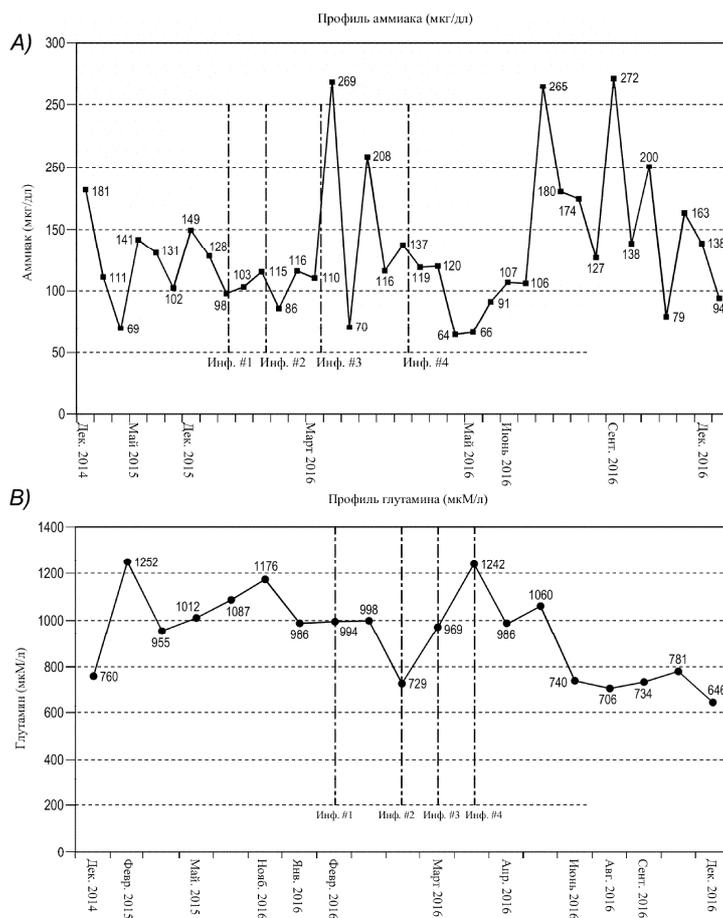




Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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